

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

**EFEITO DO COBRE E DO SELENITO DE SÓDIO NO
ESTRESSE OXIDATIVO, PROTEÍNAS SÉRICAS E
CARGA PARASITÁRIA DE CORDEIROS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR
*Haemonchus contortus***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Costa Fausto

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**EFEITO DO COBRE E DO SELENITO DE SÓDIO NO ESTRESSE OXIDATIVO,
PROTEÍNAS SÉRICAS E CARGA PARASITÁRIA DE CORDEIROS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE POR *Haemonchus contortus***

por

Guilherme Costa Fausto

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

Orientadora: Profa. Marta Lizandra do Rêgo Leal

Santa Maria, RS, Brasil

2011

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO COBRE E DO SELENITO DE SÓDIO NO ESTRESSE OXIDATIVO,
PROTEÍNAS SÉRICAS E CARGA PARASITÁRIA DE CORDEIROS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE POR *Haemonchus contortus***

Elaborado por
Guilherme Costa Fausto

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

Comissão Examinadora

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

Sérgio da Silva Fialho, Dr, UFSM

Maria Elisabeth Aires Berne, Dr^a, UFPEL

Santa Maria, 25 março de 2011.

A minha família por sempre acreditar em mim e sem nunca
medir esforços para a realização de meus sonhos.
A minha “Gauchinha”, o grande amor da minha vida, pelo apoio
incondicional e toda confiança na certeza do nosso sucesso.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Marta Lizandra do Rêgo Leal, pela confiança, amizade e sabedoria em conduzir esse trabalho.

A todos estagiários do Laboratório de Endocrinologia e Metabologia Animal, que sempre me ajudaram sem medir esforços. Em especial a Thirssa Helena Grandó e ao Carlos Alberto Cadore que participaram de todas as etapas deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, em especial as Professora Sônia Terezinha dos Anjos Lopes e Cinthia Melazzo Mazzanti, e aos colegas Francine Chimelo Paim pelas análises bioquímicas e ao Márcio Machado Costa pela eletroforese e estatística.

Ao Laboratório de Bioquímica Toxicológica, em especial ao Professor João Batista Teixeira da Rocha e ao Daniel Henrique Roos.

Ao Professor Marcelo Beltrão Molento do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento das primeiras larvas para replicação do montante necessário para o experimento.

Aos funcionários do Hospital Veterinário.

Ao Governo Federal, através do Programa REUNI, pela concessão da bolsa indispensável para viver tão longe de casa.

A Universidade Federal de Santa Maria, por possibilitar a realização desse trabalho.

RESUMO

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

EFEITO DO COBRE E DO SELENITO DE SÓDIO NO ESTRESSE OXIDATIVO, PROTEÍNAS SÉRICAS E CARGA PARASITÁRIA DE CORDEIROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Haemonchus contortus*

AUTOR: GUILHERME COSTA FAUSTO
ORIENTADORA: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL
Santa Maria, 25 de março de 2011

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil oxidativo e de proteínas séricas de cordeiros experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e cobre. Foram utilizados 28 cordeiros mestiços Corriedale e Texel, alocados em quatro grupos experimentais com sete animais cada: G1-animais infectados; G2-infectados e suplementados com 0,2 mg/kg de peso vivo (PV) de selenito de sódio por via intramuscular (IM); G3-infectados e suplementados com 3,5 mg/kg PV de cobre por via sub-cutânea (SC); G4-infectados e suplementados com 0,2 mg/kg PV de selenito de sódio IM e 3,5 mg/kg PV de cobre SC. A infecção foi realizada por via oral, com 500 larvas L3 de *Haemonchus contortus* por animal a cada dois dias, durante vinte dias a partir do dia zero. As amostras sanguíneas utilizadas para as análises bioquímicas foram coletadas nos dias zero (T0), 20 (T1), 40 (T2), 60 (T3) e 80 (T4) por venopunção da jugular utilizando-se tubos vacutainer[®]. Nestes mesmos períodos foram realizadas pesagens e a determinação dos ovos por grama de fezes dos animais. O aumento gradativo nos valores de TBARS e catalase em todos os grupos demonstrou estresse oxidativo e processo inflamatório em decorrência da parasitose. Houve um aumento na atividade da GSH-Px nos cordeiros suplementados com selênio no T0, T1 e T4 em relação ao grupo controle e no T4 quando comparado com o G3. A suplementação com o selênio promoveu uma maior ação antioxidante nos animais parasitados. O uso do cobre causou um incremento no ganho de peso dos animais experimentais. A utilização de selenito de sódio associado ao cobre demonstrou maior eficácia em aumentar os níveis de proteínas totais, albumina e gamaglobulina nos ovinos ao final do experimento (T4), quando também foram obtidos os menores valores de OPG e carga parasitária.

Palavras chave: codeiros, estresse oxidativo, proteínas séricas, *H.contortus*

ABSTRACT

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

EFFECT OF COPPER AND OF SODIUM SELENITE ON OXIDATIVE STRESS, SERUM
PROTEINS AND PARASITIC LOAD IN LAMBS EXPERIMENTALLY INFECTED
WITH *Haemonchus contortus*

AUTHOR: GUILHERME COSTA FAUSTO
ADVISOR: MARTA LIAZANDRA DO RÊGO LEAL
Santa Maria, March, 2011.

This study aimed to evaluate the oxidative status and electrophoresis of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and copper. We used 28 Corriedale and Texel crossbred lambs were divided into four groups with seven animals each: G1 consisted of animals infected with larvae of G2 were infected with larvae in lambs supplemented with 0.2 mg / kg body weight (LW) of sodium selenite intramuscular (IM), G3 were infected with larvae and supplemented with 3.5 mg / kg BW of copper by subcutaneous (SC); G4 consisted of animals infected with larvae and supplemented with 0.2 mg / kg BW IM sodium selenite and 3.5 mg / kg LW SC copper. All groups were infected orally with 500 L3 larvae of *Haemonchus contortus* per animal every other day for a period of twenty days from the day zero. The blood samples used for biochemical analysis were collected on days zero (T0), 20 (T1), 40 (T2), 60 (T3) and 80 (T4) by jugular venipuncture using vacutainer tubes[®]. Weights and determination of eggs per gram of feces of animals occurred in these experimental times. The gradual increase in catalase and TBARS values in all groups showed oxidative stress and inflammation due to parasitic infection. There was an increased activity of GSH-Px in G2 at T0, T1 and T4 as compared to G1 and T4 when compared with G3. Selenium supplementation promoted a greater antioxidant activity in parasitized animals. The use of copper caused an increase in weight gain of experimental animals. The use of sodium selenite associated with copper was more effective in increasing levels of total protein, albumin and gamma globulin in T4, which were also obtained the lowest FEC and worm burden.

Key words: lambs, oxidative stress, serum proteins, *H. contortus*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 (Figure 1) – Weight gain during the course of the experiment. Control group: infected by *H. contortus*; Selenium group: infected by *H. contortus* and supplemented with selenium; Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper; Selenium+Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper and selenium. T0 refers to day 0, T1 day 20, T2 day 40, T3 day 60 and T4 day 80..... 28

FIGURA 2 (Figure 2) – Fecal egg count values. Control group: infected by *H. contortus*; Selenium group: infected by *H. contortus* and supplemented with selenium; Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper; Selenium+Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper and selenium. T0 refers to day 0, T1 day 20, T2 day 40, T3 day 60 and T4 day 80..... 29

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Valores referentes a proteína total. Grupo Controle: infectado por *H. contortus*; Grupo Selênio: infectado por *H. contortus* e suplementado com selênio; Grupo Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com cobre; Grupo Selênio+Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com Selênio e Cobre. O T0 é referente ao dia zero, T1 vinte, T2 quarenta, T3 sessenta e T4 oitenta dias..... 43

FIGURA 2 – Valores referentes a gamaglobulina. Grupo Controle: infectado por *H. contortus*; Grupo Selênio: infectado por *H. contortus* e suplementado com selênio; Grupo Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com cobre; Grupo Selênio+Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com Selênio e Cobre. O T0 é referente ao dia zero, T1 vinte, T2 quarenta, T3 sessenta e T4 oitenta dias..... 44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 (table 1) – Means and standard deviations of glutathione peroxidase activity (GSH-Px), thiobarbituric acid–reactive substances (TBARS), catalase activity, weight, fecal egg count (\log_{10} EPG) and parasite load of treatment groups. Control group: infected by *H. contortus*; Selenium group: infected by *H. contortus* and supplemented with selenium; Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper; Selenium+Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper and selenium. T0 refers to day 0, T1 day 20, T2 day 40, T3 day 60 and T4 day 80..... 27

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Valores médios e desvio padrão do perfil protéico de cordeiros infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e cobre, contagem de ovos por grama de fezes (Log10 OPG) dos grupos experimentais. Grupo Controle: infectado por *H. contortus*; Grupo Selênio: infectado por *H. contortus* e suplementado com selênio; Grupo Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com cobre; Grupo Selênio+Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com Selênio e Cobre. O T0 é referente ao dia zero, T1 vinte, T2 quarenta, T3 sessenta e T4 oitenta dias..... 41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. CAPÍTULO 1. The effect of copper and parenteral sodium selenite on oxidative stress and parasite load in lambs experimentally infected with <i>Haemonchus contortus</i>	16
Abstract.....	17
Introduction.....	17
Material and methods.....	19
Results.....	21
Discussion.....	22
Acknowledgment.....	24
References.....	24
3. CAPÍTULO 2. Efeito do cobre e do selenito de sódio nas proteínas séricas de cordeiros infectados experimentalmente com <i>Haemonchus contortus</i>	30
Resumo.....	31
Introdução.....	31
Material e métodos.....	33
Resultados.....	34
Discussão.....	35
Agradecimentos.....	38
Referências.....	38
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos foram a segunda espécie animal a ser domesticada pelo homem. Adaptados a vida nômade, estes espalharam-se pelas zonas áridas e montanhosas do planeta. Com a fixação do homem à terra foi imposto aos rebanhos a necessidade de permanência em um mesmo local por muitas gerações possibilitando o desenvolvimento de populações específicas de parasitas gastrintestinais.

Na produção de ovinos, uma das maiores barreiras enfrentadas é a verminose (COSTA et al., 1986). Os parasitas são responsáveis por grandes perdas econômicas na ovinocultura, devido à queda da produção e qualidade da lã, redução no ganho de peso e mortalidade de animais infectados (ECHEVARRIA, 1988). Segundo GASBARRE (1997) as perdas anuais nos Estados Unidos da América chegam a US\$ 2 bilhões. Os cordeiros desmamados constituem a categoria etária mais acometida pela verminose (ECHEVARRIA et al, 1989). Ovinos até cinco ou seis meses de idade são altamente predispostos a infecção, pois apresentam baixa resposta imunitária à infecções parasitárias (CHRISTIE, 1970). Segundo FERNANDES et al. (2004), o *Haemonchus contortus* é predominante em diversas regiões do Brasil, onde é considerado o principal parasita de ovinos. MOLENTO (2004) acrescenta ainda o grande número de mortes causadas por esse parasita devido à ingestão contínua de sangue na região do abomaso do hospedeiro.

O ciclo de vida do *Haemonchus contortus* tem duas fases. A primeira é de vida livre, ocorre nas pastagens, sendo caracterizada pelo desenvolvimento de um ovo embrionado até a fase de larva infectante (L3). A segunda se dá no hospedeiro após a ingestão da L3 dando prosseguimento ao desenvolvimento larval até a fase adulta. Nesse momento cada fêmea em postura chega a ingerir 0.05ml de sangue ao dia (ORTOLANI, 1997).

O *H. contortus* é um dos mais patogênicos entre todos os nematódeos gastrintestinais. Grande parte desta patogenicidade é proveniente de sua hematofagia. Esta perda de sangue implica também na perda de outros elementos figurados sanguíneos, macro e microelementos, vitaminas, hormônios, proteína, etc. A grande mortalidade de ovinos acometidos pela haemoncose é decorrente da anemia causada pela ingestão de sangue pelos parasitas no abomaso do hospedeiro (MOLENTO, 2004). Assim, animais com intensa parasitose, principalmente os jovens, podem apresentar leucopenia (HARNESS et al, 1970; ADAMS, 1993) por linfopenia; perdas protéicas que caracterizam uma hipoproteïnemia com hipogamaglobulinemia (SAHAI, 1966; NICOLODI et al., 2010).

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 (GARCIA, 2003). O ambiente promovido pelo hospedeiro não é passivo, reage à 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. (WAKELIN et al, 1984).

Entre vários agentes químicos produzidos pelo hospedeiro contra os parasitas, citam-se também a produção de radicais livres (KAZURA and 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 oxirredução com o propósito de estabilizar sua configuração eletrônica. Cedendo ou captando elétrons de espécies vizinhas, os radicais livres buscam estabilizar-se (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, fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (RIEGEL, 2002). Esta deteriorização oxidativa dos lipídios polinsaturados é chamada de lipoperoxidação (NORDBERGER and ARNER, 2001). Uma forma de determinar esta peroxidação lipídica é através do método de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por OHKAWA et al., 1979.

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 (ERO) (CHIHUAILAF et al., 2002; HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2007). As ERO incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^-) 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; HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2007).

Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agente óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. 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 pelas enzimas glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e pela vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico e pelas enzimas glutathiona-redutase (GSH-Rd), GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986; HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2007).

A GSH-Px é assinalada como o principal sistema antioxidante do organismo, inativando derivados das ERO do metabolismo aeróbico, sendo responsável pela proteção da membrana das células que funcionam em presença de oxigênio (MILLER et al., 1993). Esta enzima também participa da cadeia de reações que catalizam a formação de prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (STADTMAN, 1990), e se relaciona com o funcionamento normal do sistema imunológico (HURLEY and DOANE, 1989). A presença de selênio (Se) na estrutura da 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 as células expostas à ação nociva das ERO, o que produz alterações na estrutura de lipídios, proteínas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas celulares (MILLER et al., 1993).

A superóxido dismutase (SOD) é outra enzima que participa no processo de detoxificação de radicais livres transformando dois ânions radical superóxido em um peróxido de hidrogênio menos reativo que o anterior (AMES et al., 1993). A importância da SOD pode ser demonstrada pelo fato de ser a enzima mais abundante do organismo, ao mesmo tempo em que também é a quinta proteína mais abundante nos tecidos (HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2007). Esta enzima está presente no citoplasma das células e é dependente do cobre e do zinco como cofatores para seu adequado funcionamento (RIEGEL, 2002).

Em células de hospedeiros infectados com diferentes espécies de parasitas as quantidades de ERO que causam lipoperoxidação são elevadas, provocando danos em tecidos e células orgânicas (DEGER, 2008). O desequilíbrio entre a produção de ERO e a remoção dos mesmos pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica com elevada concentração de ERO que causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A erradicação do *Haemonchus contortus* é impraticável e geralmente mais de uma medida são necessárias para que se possa controlá-lo. O sucesso de um programa de controle

parasitário não depende somente de um esquema de tratamento eficaz, mas também de uma combinação de práticas de manejo que possam ser adotadas em várias ocasiões.

A resistência anti helmíntica do *H. contortus* em ovinos constitui no principal problema sanitário com que se defronta a indústria ovinícola no Brasil (MOLENTO, 2004). Em decorrência do insuficiente repasse de tecnologia ou mesmo da pouca informação quanto a frequência de tratamento e a utilização correta das drogas antiparasitárias em ruminantes, foi observado uma grande diminuição da eficácia destes produtos nas principais regiões produtoras brasileiras com o aparecimento de cepas resistentes a vários grupos químicos, originando a resistência anti helmíntica múltipla (VIEIRA and CAVALCANTE, 1999). Aliado a utilização criteriosa de anti-helmínticos, se faz necessário o uso de elementos que possam potencializar a resistência do animal frente às ações nocivas desse parasita. Nesse sentido, o selênio e o cobre dentre outros minerais tem sido foco de pesquisas por exercer estímulo ao sistema imune de ovinos. Resultados prévios demonstraram que esses elementos, quando em deficiência, afetam negativamente as habilidades dos animais em desenvolver competência imune frente à Haemoncose (LEAL et al., 2010; SOLI et al., 2010).

O selênio está envolvido em várias funções fisiológicas, possui efeito antioxidante e atua como modulador do sistema imune, agindo nas barreiras contra infecções e atuando 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 e, conseqüentemente, dos títulos de imunoglobulinas (HALLIWELL et al., 2000; ARTHUR et al., 2003). A suplementação de selênio aos animais torna-se interessante, portanto, como agente antioxidante. Para fugir da rota metabólica extensa, que o selênio suplementado via oral necessita percorrer, OBLITAS et al. (2000), testaram em animais deficientes em selênio, uma dose de 5mg/100kg de peso, de selenito de sódio injetável, e avaliaram o efeito desse mineral na atividade da enzima glutathiona peroxidase sanguínea e no ganho de peso dos bovinos. Os autores concluíram que esta dose produz um incremento na atividade da glutathiona peroxidase dos 30 aos 90 dias após a aplicação.

O cobre é conhecido como um nutriente essencial ao metabolismo do ferro e ativação biológica de algumas enzimas e mono-enzimas, como a superóxido dismutase (CuZnSOD), que protege as células contra os efeitos tóxicos do metabolismo do oxigênio, e a citocromo c oxidase, enzima necessária para a cadeia de transporte de elétron durante a respiração aeróbia (BERGER, 2002). O cobre (Cu) e o zinco (Zn) são elementos-traço essenciais para a manutenção de vários processos biológicos, tais como metabolismo energético, homeostase

de ferro e mecanismos de proteção antioxidante através da atividade da cobre-zinco superóxido dismutase. A síntese desta metaloenzima é induzida pela presença dos elementos Cu e Zn no organismo (McDOWELL, 1992). Por estar envolvida no mecanismo de oxidação a deficiência da CuZnSOD pode ocasionar redução das defesas orgânicas principalmente aquelas mediadas por granulócitos (GONZÁLES and SILVA, 2003). Dessa forma a ingestão adequada de Cu/Zn é importante para assegurar o bom desempenho dos mecanismos de defesa orgânico frente ao estresse oxidativo.

Face à escassez de informações concretas acerca da resposta de ovinos suplementados com selênio e cobre, em ovinos infectados por nematóides gastrointestinais, este trabalho objetiva avaliar o efeito da suplementação com esses elementos no estresse oxidativo, proteínas séricas de cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus*. Nessa dissertação o experimento foi dividido em dois artigos e serão apresentados sob a forma de capítulos.

2. CAPÍTULO 1

Effect of copper and sodium selenite on oxidative stress and parasite load in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*

Guilherme Costa Fausto^a; Thirssa Helena Grando^a; Daniel Henrique Roos^b; Jéssie Haigert Sudati^b; Caroline Wagner^b; Márcio Machado Costa^a; João Batista Teixeira da Rocha^b,
Marcelo Beltrão Molento^c; Marta Lizandra do Rêgo Leal^{a*}

(Submitted to Experimental Parasitology, number EP-11-46)

- a) Animal Endocrinology and Metabology Laboratory. Post-Graduated Program in Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria.
- b) Post-Graduated Program in Biochemical Toxicology from UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil
- c) Parasitic Disease Laboratory. Post-Graduated Program in Veterinary Medicine. Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

*Corresponding author. Federal University of Santa Maria. Large Animal Department. Animal Endocrinology and Metabology Laboratory. Veterinary Hospital. Avenida Roraima 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. e-mail martali@usp.br. 55+55 32208815

Abstract

The objective of this study was to assess the oxidative stress and parasite load in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with copper and/or selenium. The study used 28 crossbred Corriedale x Texel lambs divided into four experimental groups, each consisting of seven animals: infected animals; infected lambs supplemented with 0.2 mg/kg live weight (LW) of sodium selenite intramuscularly (IM); infected lambs supplemented with 3.5 mg/kg LW of copper subcutaneously (SC); and infected animals supplemented with sodium selenite and copper in the same doses as above. The lambs were given 500 *H. contortus* larvae (L3) orally, every 48 hours for 20 days. Blood samples for biochemical analyses were collected at days 0 (T0), 20 (T1), 40 (T2), 60 (T3) and 80 (T4). The weight of the animals and the egg count per gram of feces (EPG) were determined on the same days. The gradual increase in the values of thiobarbituric acid-reactive substances, with an activity peak at 60 days in all groups, demonstrated oxidative stress and the inflammatory process due to parasitosis. Catalase exhibited greater activity at T4 in lambs supplemented with copper. GSH-Px activity was increased in the group supplemented only with selenium at T0, T1 and T4 in relation to control and at T4 compared to those given only copper. Selenium supplementation promoted greater antioxidant activity in animals infected by *H. contortus*. Copper, whether combined with selenium or not, promoted an increase in the weight of the animals. Selenium+copper supplementation caused a considerable reduction in EPG and in the parasite load in lambs infected by *H. contortus*.

Keywords: *Haemonchus contortus*, oxidative stress, copper, sodium selenite, lambs.

1. Introduction

The gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus* is the main cause of economic losses in small ruminant production in areas of temperate and tropical climates (Bambou et al., 2009). Chemoprophylaxis is the method more used to prevent severe losses caused by nematode infections, however the indiscriminate use causes emergence of resistant populations the anthelmintics (Papadopoulos, 2008). The indiscriminate use of chemical products also causes contamination by residues in the final product and in the environment and increases production costs. Due to these factors, studies have been conducted to develop

alternatives to reduce the use of anthelmintics in the control of nematode gastroenteritis, such as oral administration of minerals such as copper (Soli et al., 2010).

The response to the host against *H. contortus* infection is not passive; it reacts to the presence of parasites by generating potentially destructive factors (Woodbury et al., 1984), such as reactive oxygen species (ROS), causing damage to the nematode and promoting oxidative stress.

ROS cause oxidative stress due to their oxidant properties. The main ROS linked to oxidative stress are the superoxide anion radical (O_2^-), the hydroxyl radical (OH^\cdot), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide and peroxynitrite (Halliwell and Gutteridge, 2007). ROS production by phagocytes (macrophages, eosinophils, neutrophils) of the host is one defensive mechanism to expel the parasites (Kotze, 2003); however, this mechanism can cause serious damage to the health of the animal due to the immunosuppression caused by the intense oxidative process. ROS can be neutralized by an elaborate antioxidant defense system. The enzymatic defenses are mainly represented by the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GSH-Rd) and the non-enzymatic defenses by reduced glutathione (GSH) and vitamins A, C and E (Gianni et al., 2004; Fridovich, 1999).

Glutathione peroxidase (GSH-Px) is part of the chain reaction that catalyzes the formation of prostaglandins, leukotrienes, prostacyclins and thromboxanes (Leal et al., 2010; Stadtman, 1990) and is related to the normal functioning of the immune system (Hurley and Doane, 1989). The presence of selenium in the structure of GSH-Px allows for a high correlation between selenium concentration in blood and tissue and the activity of this enzyme. Selenium deficiency reduces the activity of GSH-Px, leaving the cell exposed to the harmful effects of ROS (Miller et al., 1993), causing changes in the structure of lipids, proteins, polysaccharides, DNA and other cellular macromolecules (Halliwell and Gutteridge, 2007). Therefore, selenium is closely involved in the adequate functioning of the immune system (Leal et al., 2010; Rooke et al., 2004).

Copper and zinc are essential trace elements for the maintenance of several biological processes, such as energy metabolism, iron homeostasis and antioxidant protection mechanisms through the activity of copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD). The synthesis of this metalloenzyme is induced by the presence of copper and zinc in the organism (McDowell, 1992). Because of its involvement in the oxidation mechanism, CuZnSOD deficiency may impair organic defenses, especially those mediated by granulocytes (González and Silva, 2003). Therefore, adequate intake of copper and zinc is important to ensure the

proper functioning of organic defense mechanisms against infectious diseases and oxidative stress.

This study is based on the hypothesis that oxidative stress, which occurs in response to infection by *H. contortus*, causes damage and tissue lesions, resulting in the reduced productivity of lambs. Supplementing these animals with copper and selenium parenterally could aid in maintaining the integrity of the cellular membranes that are susceptible to this damage, improving the immunocompetence and responsiveness of the host and assisting in the combat of *H. contortus*. The objective of this study was to evaluate the effects of selenium and copper on oxidative stress and parasite load in lambs experimentally infected with *H. Contortus*.

2. Materials and Methods

2.1 Compounds

Sodium selenite was acquired from Merck Brazil in powder and diluted in physiologic solution (0,9%) resulting in a final concentration of 1,67%. Cooper utilized is a commercial product (Laboratórios Agroinsumos, Buenos Aires, Argentina)

2.2 *Haemonchus contortus* infection

All groups were infected orally with 500 larvae (L3) per animal, every two days, for a period of 20 days (Rowe et al. 2008), starting at T0. The larvae (L3) were obtained by coproculture technique (Roberts and O'Sullivan, 1950).

2.3 Experimental animals

The study used 28 crossbred Corriedale x Texel male lambs aged five months. Before the experimental infection, the animals were kept in holding pens (one per group), located at the Teaching Veterinary Hospital of UFSM, for 40 days to adapt to the diet (oat hay (*Avena sativa*) and concentrate, totaling 15% of crude protein) and to the experimental environment. During this period, the animals were given anthelmintic treatment (two doses at an interval of 15 days) with a combination of closantel and albendazole (Closalben®, Ceva Santé Animale, Paulínia, São Paulo, Brazil). The copper and selenium content in the feed that was given to the animals was determined at the Chemical Analyses Laboratory of the Federal University of

Santa Maria. Procedure was approved by the Ethics and Animal Research Committee from the Federal University of Santa Maria, number 82/2009.

2.4 Experimental groups

The study used 28 crossbred Corriedale x Texel male lambs, aged five months, distributed into four treatment groups: Control group ($n=7$), animals infected with *H. contortus*; Selenium group ($n=7$), animals infected with *H. contortus* and supplemented with sodium selenite at a dose of 0.2 mg/kg live weight (LW) delivered intramuscularly (IM) (Merck Brasil, Jacarepaguá, RJ, Brazil); Copper group ($n=7$), animals infected with *H. contortus* and supplemented with 3.5 mg/kg LW of copper delivered subcutaneously (SC); Selenium+Copper group ($n=7$), animals infected with *H. contortus* and supplemented with 0.2 mg/kg LW IM sodium selenite and 3.5 mg/kg LW SC copper. Sodium selenite supplementation was carried out 20 days before the start of the experiment and repeated at day 0 of the experiment (T0). Copper was administered at T0 and 30 days after the start of the experiment.

2.5 Sample collection and analyses

Blood was collected by the Vacutainer® system for biochemical analyses. The samples were obtained at days 0 (T0, before parasite infection), 20 (T1), 40 (T2), 60 (T3) and 80 (T4). After the blood was collected, the samples were centrifuged, processed and stored at -70°C for later analysis. Catalase activity was measured by the technique described by Aebi et al. (1995). Lipid peroxidation was determined by measuring thiobarbituric acid reactive-substances (TBARS) (Ohkawa et al., 1979). GSH-Px was measured based on the reduction of dithio-nitrobenzene (Hu et al., 1988). GSH-Px activity was expressed in international units per milliliter of erythrocytes. Analyses were performed in the Laboratory of Biochemical Toxicology of the Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil. Fecal samples for the quantification of eggs per gram (EPG) were collected at T0, T1, T2, T3 and T4 and processed according to the technique described by Gordon and Whitlock (1939). The animals were weighed at the same experimental periods. After the end of the experiment, three animals from each group were euthanized (10 mg intravenous (IV) acepromazine; 2g IV sodium thiopental; then 100 ml IV potassium chloride), and their parasite loads were determined (Ueno and Gonçalves, 1998).

2.6 Statistic analysis

The data were first subjected to a normality test (Kolmogorov-Smirnov). For normally distributed data (catalase, TBARS, GSH-Px and weight), analysis of variance (ANOVA) was carried out, followed by comparison of means by Tukey's test. Data that did not show parametric distribution (EPG, parasite load) were subjected to logarithmic transformation (\log_{10}). Pearson's test was used to analyze the correlation between variables TBARS and catalase. The level of significance was set at 5%.

3. Results

The results obtained in this study are shown in Table 1 and Figures 1 and 2. Higher EPG values found for all groups at T1, T2, T3 and T4, in comparison to T0, indicate the success of the experimental infection (Table 1 and Figure 2). At T1, T3 and T4, there was greater weight gain in lambs supplemented with Copper and Selenium+Copper in relation to the Control and Selenium groups (Table 1 and Figure 1). At T2, the Selenium+Copper group had higher weight in relation to the Control and Selenium groups. The Selenium group supplemented showed higher weight gain at T3 in relation to the Control group. The weight earnings in the group Copper was of 31,4% and in the group Selenium+Copper was of 27,9%, while in the groups Control and Selenium they were of 22,2% and 22,9% respectively. Parasite load and EPG were decreased at T4 in the Selenium+Copper group in relation to the other treatment groups (Table 1 and Figure 2), that difference was of 61% when compared to the group Control. Higher catalase activity was observed at T4 for the Copper group in comparison with the Control group (Table 1). The TBARS values (Table 1) for lambs supplemented with selenium were higher in relation to those exhibited by the Control and Selenium+Copper animals at T2. With the increase of parasitic infection (EPG) (Table 1 and Figure 2), higher TBARS values were detected at T3 in all groups studied. At the end of the experimental period (80 days), the groups supplemented with Selenium and Selenium+Copper had reduced TBARS in relation to the Control and Copper groups. The activity of GSH-Px was higher in the Selenium group in relation to the Control group at T0 and T1. At the last collection time (T4), the GSH-Px levels in the Selenium and Selenium+Copper groups were higher than in the Control and Copper groups. There was an average correlation between catalase and TBARS ($r=0.37$).

4. Discussion

The analysis of the concentration of copper and selenium in the diet given to the animals showed only traces of these elements. Although all animals were given the same diet, the lambs from the Copper and Selenium+Copper groups gained more weight than the non-copper-injected groups (Table 1 and Figure 1). This was probably due to the effectiveness of copper to reduce the parasite load of adult *H. contortus* in the abomasum, leading to better food absorption. In a recent study conducted to evaluate the oral administration of 2 g of copper oxide in a slow-release protected core (copper oxide wire particles, COWPs) to lambs infected naturally by *H. contortus*, the COWP-treated lambs exhibited a 62.7% reduction in parasite load in relation to the untreated group (Soli et al., 2010). In a study performed by Gonçalves and Echevaria (2004), at 56 days, there were no significant effects of the use of COWPs on the number of EPG. Some authors tested the effectiveness of the use of COWPs for the control of parasitic nematodes resistant to benzimidazoles in dairy goats; COWPs showed 75% effectiveness in the reduction of *H. contortus* load (Chartier, 2000). The result of this study show that the association of copper with selenium, administered parenterally, resulted in a considerable reduction of parasite load and EPG at 80 days. It is important to note that copper administered orally is partially degraded in the rumen, and that only small quantities reach the abomasum. COWPs consist of a pure copper central core covered with a mixture of cuprous oxide and cupric oxide. After oral administration, the COWP capsules are dissolved in the rumen, and the particles then reach the abomasum intact and become lodged in the mucosal folds. However, the use of COWPs is more costly when compared to the parenteral administration of copper. In the studies conducted by Soli et al. (2010), Gonçalves and Echevaria (2004) and Chartier (2000), the authors do not report the effect of copper on the weight gain of the animals.

The production of ROS by phagocytes performs an important role in the attempt to combat the parasitic infection by damaging lipids, proteins and nucleic acids of the parasites (Smith 1989; Kotze, 2003). During this event, ROS also cause severe damage to the host organism (Bagnal and Kotze, 2004; Menzies et al., 2010). Selenium is present as a selenocysteine residue in the active site of several enzymes, such as GSH-Px (Wingler and Brigelius-Flohé 1999). Given the large number of selenoproteins, there are mechanisms that control the priority of selenium use according to the needs of the organism (Rooke et al., 2004). This hierarchy affects not only the use of selenium in tissue but also the retention of selenium in other organs (Rooke et al., 2004). The data from this study suggest that the lambs

infected with *H. contortus* had selenium deficiency due to the negligible concentration of this mineral in the diet given to the animals. The increase in GSH-Px activity in erythrocytes is the result of greater availability of selenium in blood, because this enzyme depends on this element (Rooke et al., 2004) and indirectly determines the organic concentration of selenium (Halliwell and Gutteridge, 2007). The TBARS results show a gradual increase in oxidative stress caused by parasitic infection in all groups at 60 days. The highest GSH-Px values at T0 and T1 for the group supplemented with selenium, in comparison to other groups, were related to the previous administration of selenium (20 days before the start of the experiment), because selenium reaches its peak within 60 days after its administration (Ramirez-Bribiesca et al., 2005). The increased GSH-Px activity at T4 in the Selenium and Selenium+Copper groups in relation to the Control and Copper groups, with a simultaneous reduction of lipid peroxidation as assessed by the smaller TBARS contents at T4 in the Selenium group, demonstrates the antioxidant action of this mineral. In a study that assessed the effects of vitamin E, selenium and the association of these two elements in small ruminants infected by *H. contortus*, Leal et al. (2010) observed that the administration of selenium alone improved the immune response of animals. In dairy cows with retained placentas, in buffalo cows with dystocia and in sheep infected experimentally by *H. contortus*, supplementation with selenium associated with vitamin E promoted a reduction in lipid peroxidation and an increase in the blood concentrations of GSH-Px (Gupta et al., 2005; Sathya et al., 2007; Nicolodi et al., 2010). However, Morgante et al. (1999) did not observe a reduction in the incidence of clinical mastitis in sheep supplemented with selenium associated with vitamin E. In our study, the use of copper did not promote an antioxidant effect in the lambs infected by *H. contortus*. On the other hand, the antioxidant action of selenium, improving the immune status of animals, associated with the depressant effect of copper on *H. contortus* larvae, led to a considerable reduction in the parasite load and EPG of lambs treated with selenium+copper.

Catalase decomposes H_2O_2 , a toxic by-product of metabolism, into water and molecular oxygen (Gaetani et al., 1989). When H_2O_2 is present in low concentrations (physiological conditions), GSH-Px is responsible for transforming it into water, nullifying its oxidizing effect. According to Halliwell and Gutteridge (2007), higher catalase activity is observed when the H_2O_2 level exceeds the detoxification capacity threshold of GSH-Px. The moderate positive correlation between TBARS and catalase indicated the presence of oxidative stress and the inflammatory process. In this study, the highest catalase activity values were observed in the groups supplemented with copper at 80 days. Therefore, it is suggested that copper may increase the production of cellular H_2O_2 . Selenium

supplementation promotes good antioxidant protection against the oxidative stress caused by the experimental infection of lambs with *H. contortus*. Copper combined or not with selenium causes increased weight gain of lambs parasitized by *H. contortus*. The combination of these two elements considerably reduces the infection caused by *H. contortus*.

5. Acknowledgment

Professionals of the American Journal Expert for translating this article

6. References

- Aebi H., 1984. Catalase “*in vitro*”. *Methods in Enzymology* 105: 121-127.
- Bagnal, N.H., Kotze, A.C., 2004. cDna cloning and expression patterns of a peroxiredoxin, a catalase and glutathione peroxidase from *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research* 94, 283–289.
- Bambou, J.C., Garcia, E.G., Chevrotiere, C., Aruqet, R., Vachier, N., Mandonnet, N., 2009. Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole Kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminants Research* 82, 34–39.
- Chartier, S.C. 2000. Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goat. *Veterinary Research Communications* 24,389-399.
- Fridovich I., 1999 Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what’s, the matter with oxygen? *Annals New York Academic Science* 893, 13-8.
- Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M., Kirkiman, H.N., 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73, 334-339.
- Gianni, P., Jan, K.J, Douglas, M.J, Stuart, P.M, Tarnopolsky, M.A., 2004. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Experimental Gerontology* 39, 1391-1400.
- Gonçalves, I.G., Echevarria, F.A.M., 2004. Control of gastrointestinal worms in sheep using copper. *Ciência Rural* 34, 183-188.
- González, F.H., Silva, S.C., 2003. *Introduction to Veterinary Biochemistry*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal Council Science in Australian* 12, 50–52.

- Gupta, S., Gupta, H.K., Soni, J., 2005. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 64, 1273–1286.
- Halliwell B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 6th ed. Oxford University, New York, EUA.
- Hu, M.L., Dillard, C.J., Tappel, A.L., 1988. Aurothioglucose Effect on Sulfhydryls and glutathione-metabolizing enzymes - InVivo inhibition of selenium-dependent glutathione peroxidase, announced in *Pathology. Pharmacology and Chemistry* 59, 147–160.
- Hurley, W.L., Doane, R.M., 1989. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *Journal of Dairy Science* 72, 784-804.
- Kotze, A.C., 2003. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide in vitro. *Journal Parasitology* 33, 392-400.
- Leal, M.L.R., Camargo, E.V., Roos, D.H, Molento, M.B., Lopes, S.T.A., Rocha, J.B.T., 2010. Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research Communications* 34, 549-555.
- McDowell, L.R., 1992. *Minerals in animal and human nutrition*. Academic Press, San Diego.
- Menzies, M., Reverter, A., Andronicos, N., Hunt, P., Windon, R., Ingham, A., 2010. Nematode challenge induces differential expression of oxidant, anti-oxidant and mucus genes down the longitudinal axis of the sheep gut. *Parasite Immunology* 32, 36–46.
- Miller, K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal Dairy Science* 76, 2812–2823.
- Morgante, M., Beghelli, D., Pauselli, M., Dall'ara, P., Capucella, M., Ranucci, S., 1999. Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes. *Journal Dairy Science* 82, 623-631.
- Nicolodi, P.R.S.J., Camargo, E.V., Zeni, D., Rocha, R.X., Cyrillo, C.F., Souza, F.N., Della Libera, A.M.M.P., Bondan, C., Leal, M.L.R., 2010. Protein profile and oxidative metabolism of lambs experimentally by *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. *Ciência Rural* 40, 561–567.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
- Papadopoulos, E., 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminants Research* 76 (1–2), 99-103.

- Ramirez-Bribiesca, J.E., Tortora, J.L., Huerta, M., Crosby, M.M., 2005. Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on Mexican plateau. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia* 57, 77-84.
- 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 Journal Agricultural Research* 1, 99–102.
- Rooke, J.A., Robinson, J.J., Arthur, J.R., 2004. Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. *Journal Agricultural Science* 142, 253–262.
- Rowe, A., Gondro, C., Emery, D., Sangster, N., 2008. Genomic analyses of *Haemonchus contortus* infection in sheep: Abomasal fistulation and two *Haemonchus* strains do not substantially confound host gene expression in microarrays. *Veterinary Parasitology* 154,71-81.
- Sathya, A., Prabhakar, S., Sangha, S.P.S., Ghuman, S.P.S., 2007. Vitamin E and selenium supplementation reduces plasma cortisol and oxidative stress in dystocia-affected buffaloes. *Veterinary Research Communications* 31, 809–818.
- Smith, N.C., 1989. The role of free oxygen radicals in the expulsion of primary infections of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology Research* 75, 423–438.
- Stadtman, T.C., 1990. Selenium biochemistry. *Annual Review Biochemistry* 59, 111-127.
- Soli, F., Terrill, T.H., Shaik, A.S., Getz, W.R., Miller, J.E., Vanguru, M., Burke, J.M., 2010. Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. *Veterinary Parasitology* 168, 93-96.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual for diagnosis of helminthiasis in ruminants. Salvador : Press Color, 143p.
- Wingler, K., Brigelius-Flohé, R., 1999. Gastrointestinal glutathione peroxidase. *Biofactors* 10, 245-249.
- Woodbury RG, Miller HRP, Huntley JF, Newlands GFJ, Palliser AC, Wakelin D (1984) Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nat* 312: 450-452.

Table 1 – Means and standard deviations of glutathione peroxidase activity (GSH-Px), thiobarbituric acid–reactive substances (TBARS), catalase activity, weight, fecal egg count (\log_{10} EPG) and parasite load of treatment groups. Control group: infected by *H. contortus*; Selenium group: infected by *H. contortus* and supplemented with selenium; Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper; Selenium+Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper and selenium. T0 refers to day 0, T1 day 20, T2 day 40, T3 day 60 and T4 day 80.

	Collection time	Groups			
		Control	Se	Cu	Se+Cu
Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\mu\text{g}$ protein/min)	T0	13.33 \pm 4.97 ^a	9.72 \pm 5.05 ^a	10.79 \pm 5.20 ^a	12.11 \pm 6.45 ^a
	T1	17.24 \pm 7.10 ^a	9.72 \pm 5.09 ^a	16.76 \pm 12.75 ^a	13.94 \pm 9.04 ^a
	T2	15.23 \pm 5.69 ^a	18.16 \pm 11.27 ^a	19.61 \pm 4.61 ^a	14.94 \pm 4.29 ^a
	T3	23.24 \pm 8.49 ^a	20.47 \pm 8.00 ^a	20.23 \pm 6.91 ^a	24.76 \pm 6.40 ^a
	T4	19.98 \pm 3.83 ^b	23.21 \pm 8.27 ^{ab}	30.08 \pm 12.54 ^a	25.77 \pm 5.46 ^{ab}
TBARS (Mda/g Hb)	T0	196.32 \pm 23.58 ^a	114.8 \pm 25.74 ^a	111.29 \pm 52.56 ^a	147.41 \pm 79.06 ^a
	T1	177.58 \pm 25.28 ^a	232.25 \pm 85.44 ^a	189.26 \pm 86.67 ^a	224.93 \pm 72.96 ^a
	T2	198.34 \pm 72.87 ^b	494.23 \pm 80.86 ^a	335.31 \pm 80.32 ^{ab}	269.83 \pm 70.08 ^b
	T3	563.64 \pm 74.41 ^a	678.7 \pm 90.45 ^a	605 \pm 42.84 ^a	707.92 \pm 64.94 ^a
	T4	426.8 \pm 91.16 ^a	280.59 \pm 60.22 ^b	420.6 \pm 45.41 ^a	331.18 \pm 71.24 ^b
GSH-Px (mU/ml erythro.)	T0	30.78 \pm 22.65 ^b	74.52 \pm 36.45 ^a	64.76 \pm 39.12 ^{ab}	62.43 \pm 22.72 ^{ab}
	T1	40.39 \pm 17.46 ^b	109.05 \pm 73.57 ^a	58.19 \pm 43.00 ^{ab}	83.28 \pm 27.06 ^{ab}
	T2	75.51 \pm 11.80 ^a	77.44 \pm 11.11 ^a	56.95 \pm 25.75 ^a	54.22 \pm 26.71 ^a
	T3	61.17 \pm 28.21 ^a	81.81 \pm 18.65 ^a	64.71 \pm 30.53 ^a	79.14 \pm 26.91 ^a
	T4	51.72 \pm 27.96 ^b	77.84 \pm 21.61 ^a	35.68 \pm 21.61 ^b	78.73 \pm 24.91 ^a
Weight (kg)	T0	21.50 \pm 0.00 ^a	22.84 \pm 1.10 ^a	23.86 \pm 0.89 ^a	25.35 \pm 0.25 ^a
	T1	21.76 \pm 1.56 ^b	22.91 \pm 1.88 ^b	26.29 \pm 0.33 ^a	27.83 \pm 2.20 ^a
	T2	25.08 \pm 3.90 ^b	24.00 \pm 4.09 ^b	27.71 \pm 2.97 ^{ab}	30.50 \pm 1.53 ^a
	T3	24.43 \pm 2.26 ^c	27.36 \pm 1.97 ^b	30.50 \pm 1.00 ^a	31.36 \pm 2.08 ^a
	T4	26.29 \pm 2.45 ^b	28.07 \pm 1.57 ^b	31.36 \pm 1.21 ^a	32.43 \pm 1.77 ^a
EPG†	T0	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
	T1	714.28 \pm 320 ^a	471.43 \pm 210 ^a	385.71 \pm 150 ^a	614.28 \pm 240 ^a
	T2	8328.57 \pm 230 ^a	6700 \pm 290 ^a	4557.14 \pm 160 ^a	5214.3 \pm 250 ^a
	T3	5300 \pm 380 ^a	4728.57 \pm 210 ^a	5628.57 \pm 170 ^a	3957.15 \pm 240 ^a
	T4	7028.57 \pm 190 ^a	4671.43 \pm 550 ^a	6257.14 \pm 120 ^a	3542.86 \pm 610 ^b
Parasite Load †	T4	567.33 \pm 0.54 ^a	526.66 \pm 0.36 ^a	430 \pm 0.12 ^a	346 \pm 1.46 ^b

Data are expressed as mean \pm standard deviation. Means followed by different letters horizontally indicate differences between groups ($P < 0.05$).

Figure 1 – Weight gain during the course of the experiment. Control group: infected by *H. contortus*; Selenium group: infected by *H. contortus* and supplemented with selenium; Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper; Selenium+Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper and selenium. T0 refers to day 0, T1 day 20, T2 day 40, T3 day 60 and T4 day 80.

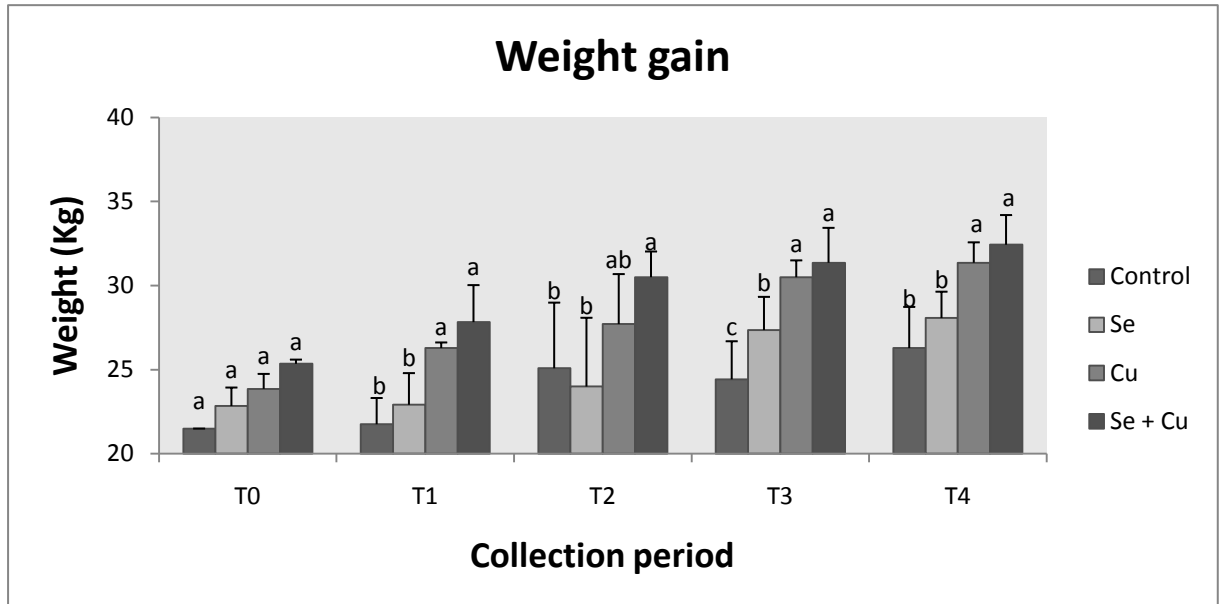
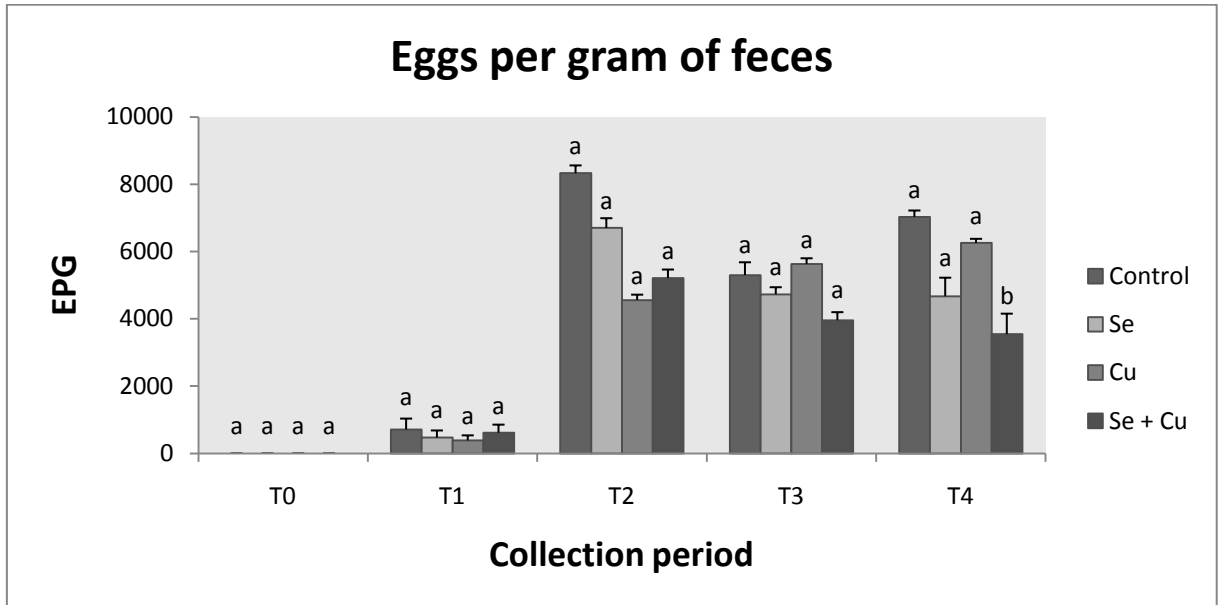


Figure 2 –Fecal egg count values. Control group: infected by *H. contortus*; Selenium group: infected by *H. contortus* and supplemented with selenium; Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper; Selenium+Copper group: infected by *H. contortus* and supplemented with copper and selenium. T0 refers to day 0, T1 day 20, T2 day 40, T3 day 60 and T4 day 80.



3. CAPÍTULO 2

Efeito do cobre e do selenito de sódio nas proteínas séricas de cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus*

Guilherme Costa Fausto^{1*}, Márcio Machado Costa¹, Francine Chimelo Paim¹, Sônia Terezinha dos Anjos Lopes¹, Cinthia Melazzo Mazzanti¹, Marta Lizandra do Rêgo Leal¹

(Artigo a ser submetido à tradução e posterior avaliação no periódico Research in Veterinary Science)

- 1) Laboratório de Endocrinologia e Metabologia Animal. Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
- 2) Laboratório de Análises Clínicas Veterinária. Departamento de Clínica de Pequenos Animais da UFSM.

*Autor para correspondência: Laboratório de Endocrinologia e Metabologia Animal. Hospital veterinário Universitário. Avenida Roraima 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. e-mail: gilhermefausto@hotmail.com . 55+55 32208815

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil protéico em cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus* e suplementados com cobre e selenito de sódio. Foram utilizados 28 cordeiros mestiços Corriedale e Texel, divididos em quatro grupos experimentais com sete animais cada: G1 animais infectados; G2 cordeiros infectados e suplementados com 0,2 mg/kg de peso vivo (PV) de selenito de sódio por via intramuscular (IM); G3 cordeiros infectados e suplementados com 3,5 mg/kg PV de cobre por via subcutânea (SC); G4 animais infectados e suplementados com selenito de sódio e cobre na mesma dose do G2 e G3. Os cordeiros receberam por via oral 500 larvas (L3) de *H. contortus* a cada 48 horas durante 20 dias. As amostras de sangue para as análises bioquímicas foram coletadas nos dias zero (T0), 20 (T1), 40 (T2), 60 (T3) e 80 (T4). A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada nos mesmos momentos experimentais e a carga parasitária determinada após a necropsia de três indivíduos de cada grupo. A utilização de selenito de sódio associado ao cobre demonstrou maior eficácia em aumentar os níveis de proteínas totais, albumina e gamaglobulina no T4, onde também foram obtidos os menores valores de OPG e carga parasitária.

Palavras chave: cordeiros, *H. contortus*, perfil bioquímico, selênio, cobre, ovinos

1. Introdução

O parasitismo gastrointestinal pelo *Haemonchus contortus* é o principal responsável por perdas produtivas na produção de pequenos ruminantes (Bambou et al., 2009). O principal efeito patogênico do *H. contortus* 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, bem como perda de proteína caracterizada por hipoproteinemia com hipoalbuminemia, sendo a anemia a principal característica da infecção (Adams, 1993; Macedo et al., 2008). Acredita-se que ao realizar a hematofagia estes nematóides injetam uma substância anticoagulante no ferimento da mucosa causado pelo parasita, de modo que os ruminantes continuam a perder sangue, durante cinco a seis minutos após os parasitos abandonarem o local da adesão na mucosa gástrica. O tempo gasto pelo parasito para se alimentar é cerca de doze minutos. (Bowman, 2003).

Um dos principais efeitos das parasitoses gastrointestinais é a alteração do metabolismo protéico. Esta ocasiona um desvio da síntese protéica dos músculos e ossos com o intuito de reparar e reagir aos danos da parede intestinal, para produzir muco e repor as perdas de sangue total ou plasma (Borba, 1996). Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no sistema orgânico, a avaliação dos teores séricos das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas) obtidas por eletroforese representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico (Rizzoli et al., 2006).

O único entre os tecidos e órgãos cujo conteúdo absoluto de proteína se altera continuamente, em função do padrão de consumo alimentar e do metabolismo é o fígado, sendo considerado um órgão importante na utilização da proteína da dieta (Coles, 1984). Uma vez que, as proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e sensíveis às influências nutricionais, fatores que devem ser interpretados e considerados na hipoproteinemia e na hipoalbuminemia (Lopes, 1996). A síntese de proteína do fígado está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal, especialmente com os teores de proteína e de vitamina A, bem como com a funcionalidade hepática (González e Silva, 2003).

Através do proteinograma pode-se dividir as proteínas séricas do organismo em albumina e globulinas. A albumina 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 gama globulinas, sendo esta última associada ao sistema imune por incluir os diferentes tipos de anticorpos (Wittwer, 1998; Leal et al., 2003).

O cobre (Cu) e o zinco (Zn) são elementos-traço essenciais para a manutenção de vários processos biológicos, tais como metabolismo energético e protéico, homeostase de ferro e mecanismos de proteção antioxidante através da atividade da cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD). Dessa forma a ingestão adequada de Cobre é importante para assegurar o bom desempenho dos mecanismos de defesa orgânico frente à processos infecciosos. 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).

Este estudo parte da hipótese de que a infecção provocada por *H. contortus* produz danos e lesões teciduais, resultando em diminuição da produtividade dos cordeiros. A suplementação desses animais com selênio e cobre poderia auxiliar no combate à infecção gerada pelo *H. contortus*, bem como melhorar a absorção alimentar. O objetivo deste estudo

foi avaliar o efeito do cobre e do selenito de sódio sobre as proteínas séricas de cordeiros infectados experimentalmente com *H. Contortus*.

2. Material e Métodos

Foram utilizados 28 cordeiros machos, com cinco meses de idade, mestiços Corriedale e Texel, distribuídos em quatro grupos experimentais: G1 ($n=7$) grupo controle com animais infectados com *H. contortus*; G2 ($n=7$) animais infectados com *H. contortus* e suplementados com selenito de sódio com 0,2 mg/kg de peso vivo (PV); G3 ($n=7$) animais infectados com *H. contortus* e suplementados com Cuprhormone® 3,5mg/kg de PV; G4 ($n=7$) constituído por animais infectados com *H. contortus* e suplementados com selenito de sódio com 0,2 mg/kg de PV e Cuprhormone® 3,5mg/kg de PV. A suplementação com o selenito de sódio (Merck Brasil, Jacarepaguá, RJ, Brasil) foi feita pela via intramuscular (IM) 20 dias antes do início do experimento e repetida no dia zero (T0). A administração do Cuprhormone® (Laboratórios Agroinsumos, Buenos Aires, Argentina) foi realizada por via sub-cutânea (SC) no T0 e repetido 30 dias após o início do experimento.

Antes da infecção experimental, os animais foram mantidos em baias coletivas (uma por grupo), localizadas no Hospital Universitário Veterinário da UFSM, durante 40 dias para a adaptação a dieta (feno de aveia (*Avena sativa*) e concentrado, totalizando 15% de proteína bruta) e ao ambiente experimental. Durante este período, os animais receberam tratamento antihelmíntico (duas doses com um intervalo de 15 dias) com uma combinação de closantel e albendazol (Closalben ® - Ceva Santé Animale, Paulínia, São Paulo - Brasil). Todos os animais foram infectados por via oral com 500 larvas (L3) por animal a cada dois dias durante um período de vinte dias a partir de T0. As L3 foram obtidas mediante técnica de coprocultura (Roberts and O'Sullivan, 1950).

As amostras de sangue para determinação das proteínas séricas foram coletadas por meio de venopunção da jugular pelo sistema Vacutainer ®. O sangue foi obtido no dia zero (T0, antes da infecção parasitária), 20 (T1), 40 (T2), 60 (T3) e 80 (T4). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas, processadas e armazenadas a -70°C para posterior análise. O perfil eletroforético das proteínas (proteína total, albumina, alfa, beta e gamaglobulinas) foi realizado em cuba de eletroforese, sendo utilizadas fitas de acetato de celulose (Leal et al., 2003).

As amostras de fezes para a quantificação de ovos por grama (OPG) foram coletadas nos dias zero, 20, 40, 60 e 80 e processadas segundo técnica descrita por Gordon e Whitlock (1939). Os animais foram pesados nos mesmos tempos experimentais. Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia de três animais de cada grupo (Barbiturico-tiopental 1g seguido de administração de 100 ml de cloreto de potássio IV) e foi determinada a carga parasitária desses animais (Ueno and Gonçalves, 1998).

Os dados inicialmente foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Para os dados que apresentaram distribuição normal foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida de comparação de médias, pelo teste de Tukey. Os dados que não apresentaram distribuição paramétrica (OPG, Carga parasitária) foram submetidos à transformação logarítmica (log 10). O nível de significância utilizado foi de 5%.

Este trabalho foi conduzido de acordo com os princípios adotados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, e autorizada pela mesma comissão através do parecer número 82/2009.

3. Resultados

Os resultados deste estudo estão apresentados na Tabela 1 e Figuras 1 e 2. Maiores valores de OPG obtidos no T1, T2, T3 e T4 em relação ao T0 em todos os grupos experimentais demonstraram o sucesso na infecção experimental. Quanto a carga parasitária e ao OPG observou-se diminuição dos valores no T4 do grupo Selênio+Cobre em relação aos demais grupos experimentais.

No T1, T3 e T4 observou-se aumento no ganho de peso dos cordeiros suplementados com Cobre e Selênio+Cobre em relação aos grupos Controle e Selênio (Tabela 1). No T2 o grupo Selênio+Cobre demonstrou valores superiores de ganho de peso em relação aos grupos Controle e Selênio. O grupo suplementado apenas com selênio exibiu valores mais elevados do ganho de peso no T3 em relação ao grupo controle (Tabela 1). O ganho de peso dos cordeiros ao longo do experimento foi de 31,4% nos animais do grupo Cobre e de 27,9% no grupo Selênio+Cobre, enquanto nos grupos Controle e Selênio o ganho foi de 22,2% e 22,9%, respectivamente (Tabela 1).

A proteína total apresentou no T1 uma redução significativa nos dados do grupo Cobre em relação aos grupos Controle e Selênio+Cobre e no T4 o grupo Se+Cu teve maiores valores em relação aos demais grupos experimentais (Tabela 1 e Figura 1). Ao longo do tempo o

grupo Controle apresentou redução significativa na proteína total no T2 comparado com o T0, e nos grupos Selênio e Cobre houve redução dos dados da proteína total em todos os tempos experimentais quando comparados aos do início do trabalho (T0). Já o grupo Selênio+Cobre foi o único em que houve um aumento (Tabela 1 e Figura 1), mesmo que este não seja significativo, nos dados da proteína total no final do período experimental comparados com o início do trabalho.

Nos resultados obtidos acerca da albumina, nenhuma diferença significativa foi encontrada (Tabela 1), porém o comportamento observado nos dados do grupo Selênio+Cobre quando comparado aos demais grupos experimentais, mostra que a associação entre os dois minerais apresentou aumento numérico desta proteína no T4 em relação ao T0.

A gamaglobulina mostrou um aumento significativo no grupo Selênio+Cobre em relação aos outros grupos experimentais no último dia de avaliação (T4), e ao longo dos tempos experimentais houve uma redução dos dados comparados ao T0 no grupo Selênio.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos dados obtidos da fração betaglobulina, porém numericamente os resultados do grupo Selênio+Cobre foram os únicos a demonstrar um leve aumento desta globulina. No grupo Selênio houve uma redução nos resultados em todos os tempos experimentais em relação ao T0, no grupo Cobre a diferença foi na redução dos dados encontrados em T2 e T4 comparados a T0.

A alfa globulina não apresentou variação significativa durante este estudo.

4. Discussão

Vários fatores fisiológicos afetam os níveis de proteínas séricas, incluindo idade, hormônios, sexo, gravidez, lactação (Thomas, 2006; Eckersall, 2008) e a estação climática do ano (Shaffer et al., 1981). Fatores estes não foram um problema para a realização desta pesquisa tendo em vista a metodologia adotada.

As infecções por parasitas gastrointestinais em ruminantes são responsáveis por interferências no proteinograma sérico, incluindo diminuição das proteínas totais e albumina (Fernandez et al., 2006; Lawal et al., 2007). As proteínas totais e suas frações avaliadas neste estudo exibiram comportamento similar, sendo os níveis mensurados do grupo Selênio+Cobre os únicos a apresentarem aumento na comparação dos dados do final (T4) com os do início do experimento (T0).

Alguns dos efeitos sistêmicos observados em um animal infectado por *H. contortus* são as diminuições dos componentes do eritrograma e da concentração sérica de proteínas

totais, notadamente a albumina (Blackburn et al., 1992). Todavia, os animais do grupo Selênio+Cobre apesar de terem recebido, durante todo o período experimental, uma dieta com níveis satisfatórios de proteína, exibiram um incremento significativo na produção de proteínas totais e um aumento numérico de albumina no T4, em comparação com os animais dos demais grupos experimentais onde as concentrações de proteínas totais e suas frações sofreram redução durante o todo o período experimental. De acordo com Ramirez-Bribiesca et al. (2005), o pico de ação do selênio pode ocorrer em até 60 dias após sua aplicação, sendo, provavelmente, a suplementação desse mineral, juntamente com o cobre, responsável pelo melhor desempenho protéico nos cordeiros desse grupo. No grupo Controle, os menores valores obtidos de proteína total foram no T2 e estão relacionados, possivelmente, com a carga parasitária, uma vez que neste mesmo período foram encontrados os maiores valores de OPG para este grupo. A diminuição dos valores de proteína total nos grupos Selênio e Cobre em todos os tempos experimentais comparados ao T0 (Tabela 1 e Figura 1) demonstra que a administração destes minerais não foi eficiente na manutenção ou no incremento das concentrações de proteínas séricas.

Ovinos experimentalmente infectados por *H. contortus* apresentaram decréscimo nas proteínas totais, albumina, e níveis alfa e beta globulinas e aumento nos níveis de gamaglobulina (Ahmad et al., 1990). O mesmo não aconteceu com as concentrações de gamaglobulinas de todos os grupos experimentais deste trabalho, exceto o grupo Selênio+Cobre que demonstrou ser capaz de manter os níveis desta fração de proteína, sem nenhuma variação significativa durante todo o estudo (Tabela 1 e Figura 2). Nas gamaglobulinas, estão presentes os diferentes tipos de imunoglobulinas como IgM, IgA, IgE e IgG (Eckersall, 2008), sendo então a dosagem dessa proteína uma forma indireta de avaliar o estado imune de animais (Leal et al., 2003; Kaneko, et al., 2008). Segundo Arthur (2003) animais que possuem deficiência em selênio tem seu sistema humoral afetado, diminuindo os títulos de gamaglobulinas, porém os dados do grupo Selênio demonstram que a dose utilizada foi incorreta ou que o selênio necessita de um coadjuvante para atingir níveis satisfatórios assim como Spears (2000) afirmou que a resposta de anticorpos é mais significativa quando a vitamina E é administrada concomitantemente com selênio.

A fração betaglobulina é constituída de algumas proteínas transportadoras, com, por exemplo, a transferrina, a ferritina e outras lipoproteínas (Costa et al., 2010). O leve aumento da porção betaglobulina sugere que seja em decorrência do comportamento da proteína total e da albumina (Tabela 1). Os resultados podem estar associados ao fato de o selênio e o cobre serem metabolizados pelo fígado e de que o aumento das betaglobulinas no grupo Se+Cu no

T4 ocorra associado ao aumento no metabolismo hepático (Paula e Silva et al., 2008; Nicolodi et al., 2010).

Em trabalho recente realizado com objetivo de avaliar a administração de 2g de oxido de cobre (COWP), administrado por via oral em capsula de liberação lenta, em cordeiros infectados naturalmente pelo *H. contortus* observou-se redução 62,7% da carga parasitária em relação ao grupo não tratado (Soli et al., 2010). Resultados similares foram observados em animais jovens, onde observou-se diminuição de significativa no número de *Haemonchus* recuperados na necropsia (Bang et al., 1990; Burke and Miller, 2006). Esses resultados corroboram com ao achados obtidos nesse estudo quanto à ação do cobre sobre a carga parasitária (Tabela 1). O que possivelmente pode estar ligado com o ganho de peso maior dos animais dos grupos que foram suplementados com cobre. No entanto, o cobre em capsula de liberação lenta é mais oneroso quanto comparado a administração do produto por via parenteral.

O ganho de peso além de poder estar ligado a capacidade do cobre em reduzir a carga parasitária, também pode ter influência da manutenção dos níveis séricos das proteínas totais, principalmente albumina, no grupo tratado com Selênio+Cobre. Porém não tem relação com o ganho de peso no grupo que recebeu o cobre separadamente, já que os níveis de proteínas totais e suas frações neste grupo sofreram uma redução ao longo do tempo, assim como o grupo Controle e o grupo Selênio, e mesmo assim foi o obteve o maior ganho de peso ao longo do experimento com 31,4% de ganho médio. O cobre é componente de várias enzimas, como a citocromo oxidase, necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica; lisil oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina; ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina; superóxido dismutase que protege as células dos efeitos tóxicos no metabolismo do oxigênio (NRC, 2001).

A utilização de selenito de sódio associado ao cobre demonstrou ser mais eficiente na manutenção dos níveis de proteínas séricas, principalmente a proteína total e a fração gamaglobulina de cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus*. Contribuindo portanto na redução da carga parasitária ao final do experimento do que quando usados separadamente.

5. Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

6. Referências

- Adams, D.B. 1993. Systemic responses to challenges infection with *Haemonchus contortus* in immune merino sheep. *Veterinary Research Commuinations*, v. 17, p.23-35.
- Ahmad, A., Anwar-ul-Hassan, C., Anwar-ul-Haq, A., Majeed, M.A. 1990. Serum proteinogram of lambs experimentally induced *Haemonchus contortus* infection. *Veterinarsk*, 60: 195-200.
- Arthur, J. R. et al. 2003. Selenium in the imune system. *Journal nutrition*, v. 133, p.1457-1459.
- Bambou, J.C., Garcia, E.G., Chevrotiere, C., Aruqet, R., Vachiery, N., Mandonnet, N. 2009. Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole Kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminants Research* 82, 34–39.
- Bang, K.S., Familton, A.S., Sykes, A.R., 1990. Effect of copper oxide wire particle treatment on establishment of major gastrointestinal nematodes in lambs. *Res. Vet. Sci.* 49, 132–137.
- Blackburn, H.D., et al., 1992. Interactions of parasitism and nutrition in goats effects on haematological parameters, correlations and other statistical associations. *Veterinary Parasitology*. 44: 183-197
- Borba, M.F.S. 1996. Efeitos do parasitismo gastrintestinal sobre o metabolismo do hospedeiro. IN: *Nutrição de ovios*. Jaboticabal: FUNEP, p. 213-241.
- Bowman, D. D., et al. 2003 *Georgis's Parasitology for Veterinarians*. 8 ed. Saunders Publishing Company, St. Louis, Missouri, p.422.

- Burke, J.M., Miller, J.E., 2006. Evaluation of multiple low doses of copper oxide wire particles compared with levamisole for control of *Haemonchus contortus* in lambs. *Vet. Parasitol.* 139, 145–149.
- Coles, E. H. 1984. *Patologia Clínica Veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole, p.566.
- Costa, M.M., et al. 2010. Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Preventive Veterinary Medicine.* 95: 301-304.
- Eckersall, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 2008. 6.ed. San Diego: Academic Press. cap.5, p. 117-148
- Fernández, S.Y., Jesus, E.E.V., Paule, B.J.A., Uzeda, R.S., Almeida, M.A.O., Guimaraes, J.E. 2006. Proteinograma de caprinos da raça Pardo-Alpina infectados naturalmente por parasitos gastrintestinais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58: 279-282
- González, F.H., Silva, S.C., 2003 *Introdução à bioquímica veterinária*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Kaneko, J.J. et al. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 2008. 6.ed. New York: Academic, p.896.
- Lawal, I.A., Esievo, K.A.N., Bisalla, M., Ibrahim, N.D.G. 2007. Serum proteins, thyroid hormones and alkaline phosphatase concentrations in acute experimental *Trypanosoma congolense* infection in yankasa sheep immunomodulated with levamisole. *J. Anim. Vet. Adv.*, 6: 586-590.
- Leal, M. L. R., et al. 2003. Proteinograma sérico de bezerras sadias, da raça holadesa, no primeiro mês pós-nascimento. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.40, n.2.

- Lopes, R. S. Infecção experimental por *Haemonchus placei* (PLACE, 1893) RANSOM, 1911 em bezerros Nelores (*Bos indicus*, LINNAEUS, 1758) e Holandeses (*Bos taurus*, LINNAEUS, 1758). Botucatu, SP. 1996. 177p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Macedo, V.P. et al. 2008. Verminose ovina com ênfase em haemoncose: uma revisão. PUBVET, v.2, n. 16.
- Nicolodi, P.R.S.J., Camargo, E.V., Zeni, D., Rocha, R.X., Cyrillo, C.F., Souza, F.N., Della Libera, A.M.M.P., Bondan, C., Leal, M.L.R., 2010. Protein profile and oxidative metabolism of lambs experimentally by *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. Ciência Rural. 40, 561–567.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th. Ed., National Academy Press: Washington D.C., 2001. 381p.
- Paula e Silva, R. O., et al. 2008. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Revista Médica de Minas Gerais. v. 18, n. 2, p. 116-122.
- Rizzoli, F.W., Fagliari, J.J., Silva, D.G., Silva, S.L., Jorge, R.R.L. 2006. Proteinograma e teores de cálcio, fósforo, magnésio e ferro de bezerros recém-nascidos que mamaram colostro diretamente na vaca ou em mamadeira. ARS Veterinária, v.22, p. 10-17.
- Shaffer, L., Roussel, J.D., Koonce, K.L. 1981. Effects of age, temperature-season and breed on blood characteristics of dairy cattle. J. Dairy Sci., 64: 62-70
- Sobrinho, A.G.C., et al. 1996. Nutrição de ovinos. Jaboticabal: FUNEP, p. 258.
- Soli, F., Terrill, T.H., Shaik, A.S., Getz, W.R., Miller, J.E., Vanguru, M., Burke, J.M. 2010. Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. Veterinary Parasitology 168: 93-96.
- Spears, J.W. 2000. Micronutrients and immune function in cattle. Proceedings of the Nutrition Society, n. 59, p.587-594.

Thomas, J.S., 2006. Overview of Plasma Proteins. In: Schalm's Veterinary Hematology, Felfman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. 5th Ed., Blackwell Publishing, Ames, 891-898

Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual for diagnosis of helminthiasis in ruminants Salvador : Press Color, 143p.

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

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão do perfil protéico de cordeiros infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e cobre, contagem de ovos por grama de fezes (Log10 OPG) dos grupos experimentais. Grupo Controle: infectado por *H. contortus*; Grupo Selênio: infectado por *H. contortus* e suplementado com selênio; Grupo Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com cobre; Grupo Selênio+Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com Selênio e Cobre. O T0 é referente ao dia zero, T1 vinte, T2 quarenta, T3 sessenta e T4 oitenta dias.

	Tempos de coleta	Grupos			
		Controle (G1)	Se (G2)	Cu (G3)	Se + Cu (G4)
Prot. Total (g/L)	T0	7,98 ± 0,40 ^{Aa}	8,41 ± 0,07 ^{Aa}	7,80 ± 0,47 ^{Aa}	7,64 ± 0,41 ^{Aa}
	T1	7,81 ± 0,49 ^{Aab}	7,36 ± 0,41 ^{ABb}	6,92 ± 0,35 ^{Bb}	7,80 ± 0,58 ^{Aa}
	T2	6,79 ± 0,95 ^{Ab}	7,05 ± 0,80 ^{Ab}	6,66 ± 0,59 ^{Ab}	7,25 ± 0,69 ^{Aa}
	T3	7,30 ± 0,50 ^{Aab}	6,83 ± 0,62 ^{Ab}	6,67 ± 0,49 ^{Ab}	7,45 ± 0,67 ^{Aa}
	T4	6,96 ± 0,92 ^{Bab}	6,99 ± 0,88 ^{Bb}	6,62 ± 0,54 ^{Bb}	7,94 ± 0,76 ^{Aa}
Albumina (g/L)	T0	3,14 ± 0,36 ^{Aa}	3,49 ± 0,32 ^{Aa}	3,24 ± 0,23 ^{Aa}	3,18 ± 0,24 ^{Aa}
	T1	3,30 ± 0,48 ^{Aa}	3,22 ± 0,26 ^{Aa}	3,04 ± 0,28 ^{Aa}	3,42 ± 0,27 ^{Aa}
	T2	3,13 ± 0,47 ^{Aa}	3,20 ± 0,34 ^{Aa}	2,95 ± 0,15 ^{Aa}	3,28 ± 0,37 ^{Aa}
	T3	3,29 ± 0,66 ^{Aa}	3,11 ± 0,35 ^{Aa}	2,98 ± 0,32 ^{Aa}	3,38 ± 0,28 ^{Aa}
	T4	3,12 ± 0,42 ^{Aa}	3,17 ± 0,51 ^{Aa}	3,19 ± 0,40 ^{Aa}	3,43 ± 0,37 ^{Aa}
Alfa (g/L)	T0	0,89 ± 0,11 ^{Aa}	0,92 ± 0,15 ^{Aa}	0,83 ± 0,09 ^{Aa}	0,82 ± 0,06 ^{Aa}
	T1	0,88 ± 0,09 ^{Aa}	0,81 ± 0,12 ^{Aa}	0,77 ± 0,09 ^{Aa}	0,85 ± 0,08 ^{Aa}
	T2	0,73 ± 0,08 ^{Aa}	0,74 ± 0,09 ^{Aa}	0,73 ± 0,08 ^{Aa}	0,74 ± 0,15 ^{Aa}
	T3	0,77 ± 0,07 ^{Aa}	0,80 ± 0,12 ^{Aa}	0,71 ± 0,14 ^{Aa}	0,84 ± 0,16 ^{Aa}
	T4	0,82 ± 0,1 ^{Aa}	0,88 ± 0,89 ^{Aa}	0,83 ± 0,13 ^{Aa}	0,93 ± 0,15 ^{Aa}
Beta (g/L)	T0	0,61 ± 0,12 ^{Aa}	0,59 ± 0,06 ^{Aa}	0,51 ± 0,07 ^{Aa}	0,51 ± 0,06 ^{Aa}
	T1	0,52 ± 0,08 ^{Aa}	0,49 ± 0,08 ^{Ab}	0,45 ± 0,08 ^{Ab}	0,56 ± 0,13 ^{Aa}
	T2	0,42 ± 0,9 ^{Aa}	0,42 ± 0,04 ^{Ab}	0,38 ± 0,07 ^{Ab}	0,42 ± 0,06 ^{Aa}
	T3	0,51 ± 0,17 ^{Aa}	0,47 ± 0,06 ^{Ab}	0,42 ± 0,07 ^{Ab}	0,47 ± 0,10 ^{Aa}
	T4	0,50 ± 0,16 ^{Aa}	0,47 ± 0,11 ^{Ab}	0,38 ± 0,07 ^{Ab}	0,55 ± 0,14 ^{Aa}
Gama (g/L)	T0	2,54 ± 0,38 ^{Aa}	2,75 ± 0,35 ^{Aa}	2,58 ± 0,51 ^{Aa}	2,45 ± 0,17 ^{Aa}
	T1	2,49 ± 0,37 ^{Aa}	2,29 ± 0,21 ^{Ab}	2,20 ± 0,25 ^{Aa}	2,37 ± 0,16 ^{Aa}
	T2	2,08 ± 0,28 ^{Aa}	2,17 ± 0,31 ^{Ab}	2,10 ± 0,39 ^{Aa}	2,27 ± 0,24 ^{Aa}
	T3	2,14 ± 0,22 ^{Aa}	1,96 ± 0,26 ^{Ab}	2,04 ± 0,28 ^{Aa}	2,35 ± 0,43 ^{Aa}
	T4	2,17 ± 0,37 ^{Ba}	2,17 ± 0,25 ^{Bb}	2,15 ± 0,38 ^{Ba}	2,56 ± 0,31 ^{Aa}
Peso (Kg)	T0	21,50 ± 0,00 ^a	22,84 ± 1,10 ^a	23,86 ± 0,89 ^a	25,35 ± 0,25 ^a
	T1	21,76 ± 1,56 ^b	22,91 ± 1,88 ^b	26,29 ± 0,33 ^a	27,83 ± 2,20 ^a
	T2	25,08 ± 3,90 ^b	24,00 ± 4,09 ^b	27,71 ± 2,97 ^{ab}	30,50 ± 1,53 ^a
	T3	24,43 ± 2,26 ^c	27,36 ± 1,97 ^b	30,50 ± 1,00 ^a	31,36 ± 2,08 ^a
	T4	26,29 ± 2,45 ^b	28,07 ± 1,57 ^b	31,36 ± 1,21 ^a	32,43 ± 1,77 ^a
OPG†	T0	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A
	T1	714,28 ± 320 ^A	471,43 ± 210 ^A	385,71 ± 150 ^A	614,28 ± 240 ^A
	T2	8328,57 ± 230 ^A	6700 ± 290 ^A	4557,14 ± 160 ^A	5214,3 ± 250 ^A
	T3	5300 ± 380 ^A	4728,57 ± 210 ^A	5628,57 ± 170 ^A	3957,15 ± 240 ^A
	T4	7028,57 ± 190 ^A	4671,43 ± 550 ^A	6257,14 ± 120 ^A	3542,86 ± 610 ^B
Carga parasit.†	T4	568,33 ± 0,54 ^A	526,66 ± 0,36 ^A	430 ± 0,12 ^A	365 ± 1,46 ^B

Dados são expressos em média ± desvio padrão. Desvio padrão acompanhado de letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey).

† Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis para dado não normais. Desvio padrão acompanhado de letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

FIGURA 1 – Valores referentes a proteína total. Grupo Controle: infectado por *H. contortus*; Grupo Selênio: infectado por *H. contortus* e suplementado com selênio; Grupo Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com cobre; Grupo Selênio+Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com Selênio e Cobre. O T0 é referente ao dia zero, T1 vinte, T2 quarenta, T3 sessenta e T4 oitenta dias.

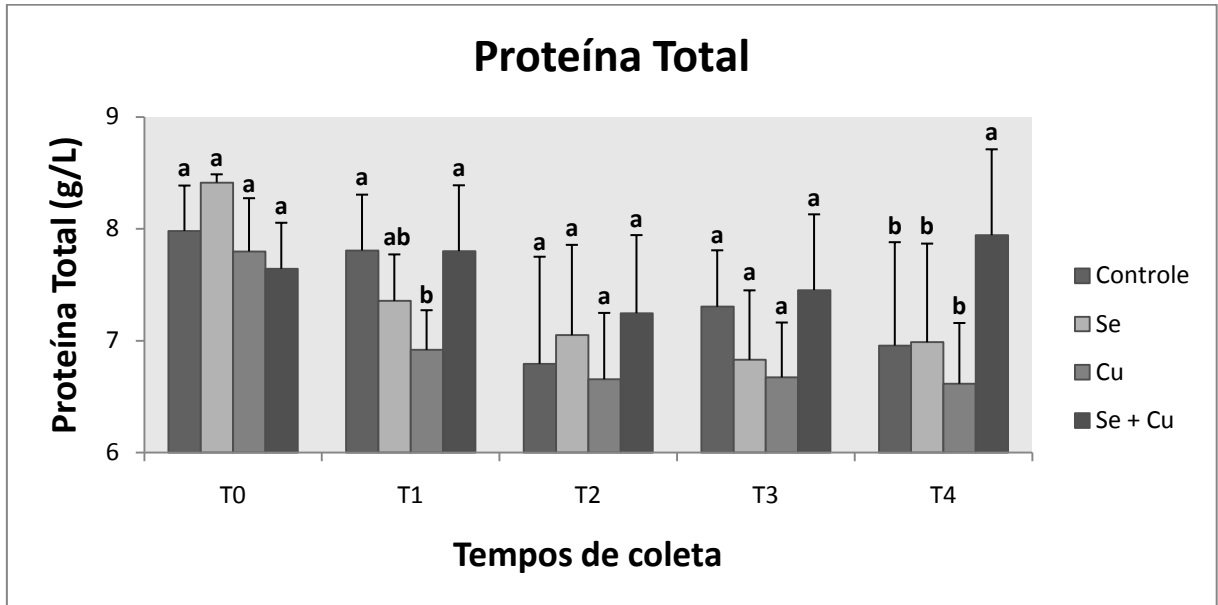
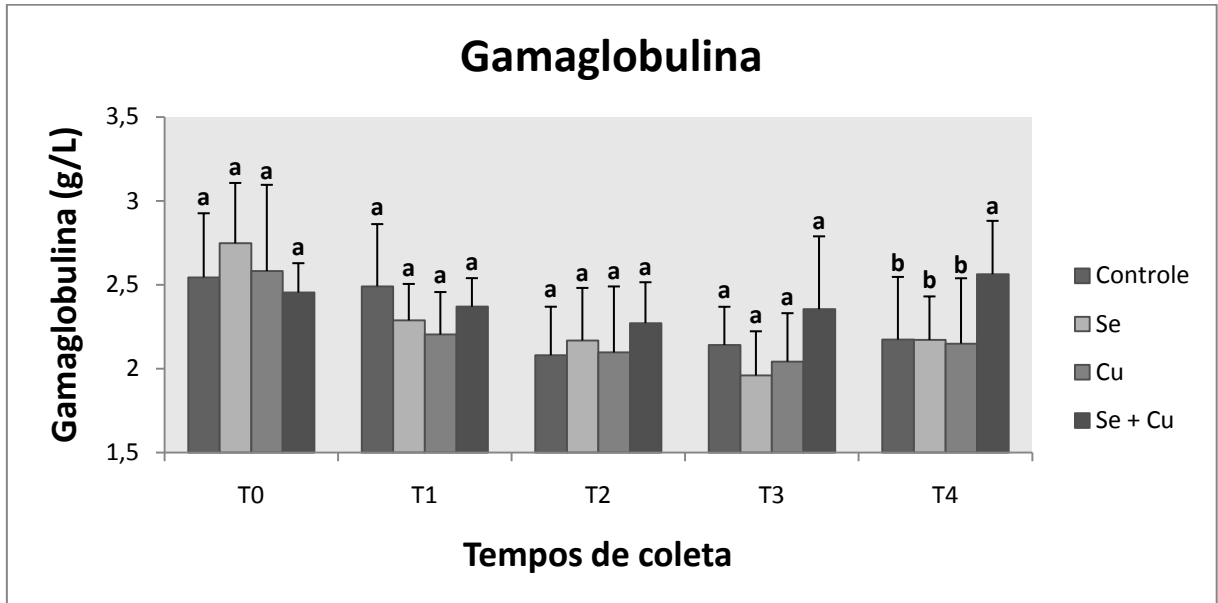


FIGURA 2 – Valores referentes a gamaglobulina. Grupo Controle: infectado por *H. contortus*; Grupo Selênio: infectado por *H. contortus* e suplementado com selênio; Grupo Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com cobre; Grupo Selênio+Cobre: infectado por *H. contortus* e suplementado com Selênio e Cobre. O T0 é referente ao dia zero, T1 vinte, T2 quarenta, T3 sessenta e T4 oitenta dias.



4. CONCLUSÕES

- A suplementação com selênio promove uma boa proteção antioxidante frente ao estresse oxidativo provocado pela infecção experimental com *H. contortus* em cordeiros. O cobre gera incremento no ganho de peso de cordeiros parasitados pelo *H. contortus*; e a associação desses dois elementos reduz a carga parasitária dos animais.
- A utilização de selenito de sódio associado ao cobre demonstrou ser mais eficiente na manutenção dos níveis de proteínas séricas, principalmente a proteína total e a fração gamaglobulina de cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus*. Contribuindo, portanto na redução da carga parasitária ao final do experimento do que quando usados separadamente.

5. 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.
- AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the neurodegenerative diseases of aging. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, 90, 7915-7922, 1993.
- ARTHUR, J. R. et al. Selenium in the imune system. **Journal nutrition**, v. 133, p. 1457-1459. 2003
- BERGER, L.L., 2002. Copper Toxicity in Sheep. Treasure Valley Sheep Producers, **Drylake Road Nampa**, Idaho.
- CHRISTIE, M.G. The fate of very large doses on *Haemonchus contortus* and their effect on conditions in the ovine abomasum. **Journal Comparative Pathology**, v.80, p. 89-100, 1970.
- CHIHUAULAF, R.H., et al Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation inanimal health. **Vetereniry of Méxican**, v.33, n.3, p.265-283. 2002.
- COSTA,C.A.F.; VIEIRA,L.S.; PANT,K.P. Valores de eritrócitos e eosinófilos em cordeiros deslanados, antes e depois de medicações anti-helmínticas. **Pesq.Agrop.Bras.**, v.21, n.2, p.193-201, 1986.
- DEGER, Y. et al. Lipid Peroxidation and Antioxidant Potential of Sheep Liver Infected Naturally with Distomatosis. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v.32, p.23-26, 2008.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.
- ECHEVARRIA, F.A.M. Doenças parasitárias de ovinos e seu controle. **In: SIMPÓSIO PARANAENSE DE OVINOCULTURA**, 3., 1988, Guarapuava, Anais...: Londrina: IAPAR. p.46-47.

ECHEVARRIA, F.A.M.; PINHEIRO, A.C.; CORREA, M.B.C. Controle estratégico da verminose ovina no Rio Grande do Sul. **In: CURSO DE PARASITOLGIA ANIMAL**, 2. Bagé, RS: Anais...: CBPV, 1989, p.159-163.

FERNANDES, L. H.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE A. F. T.; SOUZA, H.; BELLUZZO C. E. C. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p. 733-740, 2004.

GARCIA, J.P. Aproximación al concepto de fenótipo ovino resistente a la gastroenteritis parasitaria producida por tricostrongilidos em raza churra. 2003. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidad de Leon, Leon.

GASBARRE, L. C. Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. **Vet Parasito**, v.72, p.327-337, 1997.

GONZÁLEZ F.H.; SILVA S.C., Introdução à bioquímica veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 2003

GORDON, H.M., WHITLOCK, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Science in Australian**, 12, 50–52.

HALLIWELL, B. et al. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radicals Research**, v.33, n.6, p.819-830. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 6a ed. Oxford University, 2007.

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.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal 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. **Seminars in Hematology**, v.26, p.277-285, 1989.

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.

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

LEAL MLR, Camargo EV, Ross DH, Molento MB, Anjos Lopes ST, Rocha JBT (2010) Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Vet Res Commun** 34: 549-555.

McDOWELL L.R., 1992. Minerals in animal and human nutrition. **Academic Press**, San Diego.

MILLER, J.K., BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., MADESEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2812-2823, 1993.

MOLENTO, M.B. Resistencia de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n.13, p.81-87, 2004.

NICOLODI, P.R.S.J., CAMARGO, E.V., ZENI, D., ROCHA, R.X., CYRILLO, C.F., SOUZA, F.N., DELLA LIBERA, A.M.M.P., BONDAN C., LEAL, M.L.R. 2010 Protein profile and oxidative metabolism of lambs experimentally by *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. **Ciência Rural** 40: 561–567.

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.

OBLITAS, F.; CONTRERAS, P.A; BÖHMWALD, T.M; et al. Efecto de la suplementación con selenio sobre la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y ganancia de peso

em bovinos selenio deficientes mantidos a pastoreio. **Arquivos de Medicina Veterinária**, v.32, n.1, 2000.

OHKAWA, H.; Ohishi, N.; Yagi, K., 1979: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** 95, 351-358.

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

RIEGEL, R.E. Radicais livres. In_____. Bioquímica. 3.ed. São Leopoldo: Unisinos, p. 507-536, 2002.

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. **Ciência Hoje**, v.27, n. 158, p.60-62, 2000.

SOLI F, Terrill TH, Shaik AS, Getz WR, Miller JE, Vanguru M, Burke JM (2010) Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. **Veterinary Parasitology** 168: 93-96.

STADTMAN, T.C. Selenium biochemistry. **Annual Review Biochemistry**, n.59, p.111-127, 1990.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R. Anthelmintic resistance in goat herds in the State of Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, p.99-103, 1999.

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