

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

Andressa Salvadori Schafer

**ÓXIDO DE COBRE ASSOCIADO AO CLOSANTEL EM OVINOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Haemonchus contortus*:  
METABOLISMO OXIDATIVO, HEPÁTICO E IMUNOLÓGICO**

Santa Maria, RS  
2019

**Andressa Salvadori Schafer**

**ÓXIDO DE COBRE ASSOCIADO AO CLOSANTEL EM OVINOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Haemonchus contortus*:  
METABOLISMO OXIDATIVO, HEPÁTICO E IMUNOLÓGICO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Clínica Médica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Orientador: Cinthia Melazzo de Andrade

Santa Maria, RS  
2019

Schafer, Andressa Salvadori  
ÓXIDO DE COBRE ASSOCIADO AO CLOSANTEL EM OVINOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Haemonchus contortus*:  
METABOLISMO OXIDATIVO, HEPÁTICO E IMUNOLÓGICO / Andressa  
Salvadori Schafer.- 2019.  
99 p.; 30 cm

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. Hemoncose 2. Minerais 3. Antioxidantes 4. Anti  
helmíntico 5. Ovinocultura I. Melazzo de Andrade, Cinthia  
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

---

© 2019

Todos os direitos autorais reservados a Andressa Salvadori Schafer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Fone: (55) 999949003 – E-mail: andressasalvadori@hotmail.com

**Andressa Salvadori Schafer**

**ÓXIDO DE COBRE ASSOCIADO AO CLOSANTEL EM OVINOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Haemonchus contortus*:  
METABOLISMO OXIDATIVO, HEPÁTICO E IMUNOLÓGICO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Clínica Médica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 15 fevereiro de 2019:**

---

**Cinthia Melazzo de Andrade, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Patrícia Wolkmer, Dra. (UNICRUZ)**

---

**Alexandre Krause, Dr. (UFSM)**

---

**Luís Antônio Sangioni, Dr. (UFSM)**

---

**Andressa Bueno, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2019

*A minha mãe por todo amor dedicado durante toda essa jornada e a minha filha  
Helena, razão do meu viver e do meu crescimento emocional e pessoal.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e força para concluir essa etapa.

Ao meu Santo Expedito e Padre Pio por me estender a mão nos momentos de aflição.

A minha mãe e a minha filha Helena por serem meu incentivo e minha alegria todos os dias.

Ao meu marido Ciriaco, companheiro nessa trajetória, obrigada pela ajuda no experimento e por ser sempre meu companheiro.

A minha família, que sempre me incentivou a seguir meus estudos e me proporcionou o necessário para chegar até aqui hoje.

À Universidade Federal de Santa Maria a qual me acolheu no mestrado e doutorado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao longo de meu doutorado.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Cinthia Melazzo de Andrade, por ter permitido trabalhar com ovinos, mesmo não sendo a área dela e também por ter me dado todo apoio durante a minha gravidez, nunca vou esquecer tamanha bondade e carinho.

A minha eterna orientadora Prof<sup>a</sup> Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, por ter acreditado em mim, sem a senhora não estaria concluindo essa etapa.

Agradeço a colaboração e amizade de toda a equipe do Lacvet, com quem tive a oportunidade de conviver e aprender grandemente, em especial a Cássia por ter me ajudado tanto na fase final do meu doutorado.

Ao laboratório de Parasitologia Veterinária e a Prof<sup>a</sup> Silvia Gonzalez Monteiro pelo acolhimento durante esses anos de doutorado.

A Prof<sup>a</sup> Marta Lizandra do Rego Leal por ter cedido o espaço para o meu experimento na Clínica de Grandes Animais e por toda a ajuda no desenvolvimento do projeto.

A todas as pessoas que estiveram comigo nesses últimos anos e que me auxiliaram para realização deste trabalho, fica expresso o meu muito obrigada.

## RESUMO

### ÓXIDO DE COBRE ASSOCIADO AO CLOSANTEL EM OVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Haemonchus contortus*: METABOLISMO OXIDATIVO, HEPÁTICO E IMUNOLÓGICO

AUTOR: Andressa Salvadori Schafer  
ORIENTADORA: Cinthia Melazzo de Andrade

O *Haemonchus contortus* é o mais prevalente e patogênico parasito de ovinos e o surgimento da resistência parasitária à maioria das classes de anti-helmínticos tornou a infecção por este parasito um dos principais desafios para criação de ovinos. O closantel é um antiparasitário que vem demonstrando uma notável propensão para o desenvolvimento da resistência ao parasito *H. contortus*. Estudos vêm sendo realizados visando o desenvolvimento de meios alternativos para reduzir a resistência parasitária e prolongar o uso de anti-helmínticos, além de proporcionar um incremento na resposta imune do hospedeiro perante o parasito ou até mesmo a redução na postura de ovos pelo *H. contortus*. Neste sentido, a cápsula com partículas de óxido de cobre (COWP), que inicialmente foi desenvolvida para superar a deficiência de cobre nos ruminantes em pastagens, destaca-se por seu efeito profilático no estabelecimento de larvas infectantes de *H. contortus*. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação da COWP, isolada ou associada ao closantel, sobre marcadores de estresse oxidativo sistêmico e em tecidos, resposta imune, OPG, carga parasitária, perfil hematológico, bioquímico e metabolismo energético hepático em ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus*. Para isso foram utilizados trinta ovinos da raça Corriedale, machos, de aproximadamente oito meses de idade, com peso médio de 30 kg. Os animais foram distribuídos em cinco grupos com 6 animais cada: Controle: (controle negativo) composto por animais saudáveis livre de parasitos; HC: (controle positivo), composto por animais infectados por *H. contortus* e não tratados; HC+Cu: infectado com *H. contortus* e tratado com cápsulas de óxido de cobre; HC+CL: infectado com *H. contortus* tratados com closantel; HC+CL+Cu: infectado com *H. contortus* e tratado com closantel e cápsulas de óxido de cobre. Os ovinos infectados foram inoculados com 5.000 larvas (L3) de *H. contortus*. A cápsula de óxido de cobre e o closantel foram fornecidos por via oral aos cordeiros em dose única. Amostras de sangue foram coletadas para avaliações anteriormente citadas e de fezes para o monitoramento da infecção parasitária. Os ovinos foram acompanhados por 50 dias, após foram abatidos para coleta de tecidos e contagem parasitária no abomaso. Os animais suplementados com cápsulas de óxido de cobre (isolado ou associado ao closantel) apresentaram redução na contagem de ovos por gramas de fezes bem como redução na contagem de larvas adultas no abomaso, sendo que a associação dos tratamentos obteve 100% de eficácia. O tratamento reduziu a atividade de butirilcolinesterase (BuChE) e mieloperoxidase (MPO). Ainda, preveniu a inibição da atividade das enzimas adenilato quinase (AK) e piruvato quinase (PK), mantendo o equilíbrio entre o consumo e a produção de ATP celular. Todos os tratamentos foram capazes de reduzir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e prevenir a depleção da atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e tióis totais (PSH), quando comparados ao grupo infectado e não tratado, obtendo-se melhores resultados para aqueles suplementados com cobre. A COWP modulou positivamente a resposta imunológica nos animais tratados, aumentando os níveis das imunoglobulinas IgE e IgG. Não se observou indícios de intoxicação pela COWP no fígado dos ovinos tratados e o cobre plasmático se manteve baixo durante todo o período experimental. Concluímos que a COWP associada ao anti-helmíntico closantel é uma excelente alternativa para produtores de ovinos que sofrem prejuízos econômicos com o parasito *H. contortus* devido à resistência múltipla a anti-helmínticos, pois acarretou na redução de 100% na contagem parasitária dos ovinos, ainda, incrementou a ação antioxidante e a resposta imune dos ovinos.

**Palavras-chave:** Hemoncose. Minerais. Antioxidante. Anti-helmíntico. Ovinocultura.

## ABSTRACT

### COPPER OXIDE ASSOCIATED TO CLOSANTEL IN EXPERIMENTALLY INFECTED LAMBS WITH *Haemonchus contortus*: OXIDATIVE, HEPATIC AND IMMUNOLOGICAL METABOLISM

AUTHOR: Andressa Salvadori Schafer

ADVISER: Cinthia Melazzo de Andrade

*Haemonchus contortus* is the most prevalent and pathogenic parasite of sheep and the emergence of parasitic resistance to most classes of anthelmintic made the infection by this parasite one of the main obstacles to sheep rearing. Closantel is an antiparasitic that demonstrate a remarkable propensity for development of resistance to *H. contortus* parasite. Studies have been carried out aiming at the development of alternative means to reduce the use of anthelmintics, providing an increment in the host's immune response to the parasite or even reducing the *H. contortus* egg laying. In this sense, the capsule with copper oxide wire particles (COWP), which was originally developed to overcome copper deficiency in ruminants in pasture, is highlighted by its prophylactic effect in the establishment of infective larvae of *H. contortus*. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of COWP supplementation, isolated or associated with closantel, on oxidative stress markers, immune response, hematological and biochemical profile and hepatic energetic metabolism in sheep experimentally infected with *H. contortus*. For this, thirty Corriedale sheep, males, with approximately eight months of age and an average weight of 30 kg were used. The animals were distributed in five groups with 6 animals each: Control (negative control) consisting of healthy animals and free of parasites; HC: (positive control), consisting of animals infected by *H. contortus*; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated with COWP; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with closantel; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated with closantel and COWP. Infected sheep were inoculated with 5,000 *H. contortus* larvae. The copper oxide capsule and closantel were orally supplied to the lambs. Sheep were monitored for 50 days. Blood and feces samples were collected weekly for evaluation and monitoring of parasitic infection. Animals supplemented with COWP (isolated or associated with closantel) showed a reduction in egg counts per gram of faeces as well as a reduction in adult larval counts in the abomasum, and the association of treatments was 100% effective. The treatment reduced butyrylcholinesterase (BuChE) and myeloperoxidase (MPO) activities, demonstrating that copper oxide exerts anti-inflammatory effects, in addition, prevents the inhibition of adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) activities, maintaining the balance between consumption and production of cellular ATP. All treatments were able to reduce the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and increase the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and the levels of glutathione (GSH) and total thiols (PSH) when compared to the infected and untreated group, better results were obtained for those supplemented with copper. COWP positively modulated the immune response in treated animals, by increasing immunoglobulins levels (IgE and IgG). There was no evidence of COWP intoxication in the treated sheep's liver and plasma copper remained low throughout the experimental period. We conclude that COWP associated with closantel is an excellent alternative for sheep producers suffering economic losses with *H. contortus* infection due to the multiple resistance to anthelmintic, as it resulted in a reduction of 100% in parasite count of infected lambs, also demonstrated antioxidant action and increased the immune response of sheep.

**Keywords:** Hemoncose. Minerals. Antioxidant. Anti-helminthic. Sheep farming.



## LISTA DE FIGURAS

### MANUSCRITO I

- Figure 1** – Nematode eggs count (EPG) of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. \* $p < 0.05$  (n = 06 per group). ...46
- Figure 2** – Serum butyrylcholinesterase and plasma myeloperoxidase activities of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 21, 35, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. (A) Butyrylcholinesterase - BuChE; (B) Myeloperoxidase - MPO. Different letters in the same day indicate significant difference between groups at  $p < 0.05$  (n = 06 per group).....47
- Figure 3** – Serum albumin and total protein of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 21, 35, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. (A) Albumin; (B) Total protein. Different letters in the same day indicate significant difference between groups at  $p < 0.05$  (n = 06 per group).....48
- Figure 4** – Serum biochemical analysis of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 21, 35, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. (A) Aspartate aminotransferase - AST; (B) Alkaline phosphatase - ALP. Different letters in the same day indicate significant difference between groups at  $p < 0.05$  (n = 06 per group).....49

### MANUSCRITO II

- Figura 1** – Concentração de cobre no fígado de cordeiros (n=06) não infectados (Control); experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com óxido de cobre (HC+Cu); e infectados com *H. contortus* e tratados com closantel associado ao óxido de cobre (HC+CL+Cu) no dia 49 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0.05$ )..... 84

- Figura 2** – Perfil antioxidante no abomaso de cordeiros (n=06) não infectados (Control); infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais cápsula de óxido de cobre (HC+CL+Cu), no dia 50 p.i. (A) Catalase (CAT); (B) Glutathiona (GSH); (C) Superóxido Dismutase (SOD); (D) Tiois Totais (PSH). Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0.05$ ). ..... 84
- Figura 3** – Perfil antioxidante no fígado de cordeiros (n=06) não infectados (Control); infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais cápsula de óxido de cobre (HC+CL+Cu), no dia 50 p.i. (A) Catalase (CAT); (B) Glutathiona (GSH); (C) Superóxido Dismutase (SOD); (D) Tiois Totais (PSH). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0.05$ ). ... 85
- Figura 4** – Perfil antioxidante nos rins de cordeiros (n=06) não infectados (Control); infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais cápsula de óxido de cobre (HC+CL+Cu), no dia 50 p.i. (A) Catalase (CAT); (B) Glutathiona (GSH); (C) superóxido Dismutase (SOD); (D) Tiois Totais (PSH). Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0.05$ ). ..... 85
- Figura 5** – Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no abomaso (A), fígado (B) e rins (C) de cordeiros (n=06) não infectados (Control); infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais cápsula de óxido de cobre (HC+CL+Cu), no dia 50 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0.05$ ). ..... 86
- Figura 6** – Níveis séricos de (A) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS; (B) Glutathiona - GSH e (C) Tiois Totais – PSH, em cordeiros (n=06) não infectados (Control); infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais cápsula de óxido de cobre (HC+CL+Cu), nos dias 0, 21, 35 e 49 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0.05$ ). ..... 87
- Figura 7** – Imunoglobulinas (A) IgG e (B) IgE no soro de cordeiros (n=06) não infectados (Control); infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais cápsula de óxido de cobre (HC+CL+Cu), nos dias 0, 21, 35 e 49 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de

partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam  
diferença estatística ( $p < 0.05$ )..... 88

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO I

<b>Table 1</b> - Hepatic adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) activities of lambs experimentally infected with <i>Haemonchus contortus</i> . .....	50
--	----

### MANUSCRITO II

<b>Tabela 1</b> – Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de cordeiros experimentalmente infectados com <i>Haemonchus contortus</i> , tratados ou não com closantel, cobre ou closantel associado ao cobre. ....	89
<b>Tabela 2</b> – Contagem parasitaria do abomaso de cordeiros experimentalmente infectados com <i>Haemonchus contortus</i> , tratados ou não com closantel, cobre ou closantel associado ao cobre, no dia 50 p.i. ....	90
<b>Tabela 3</b> – Concentração plasmática de cobre em cordeiros experimentalmente infectados com <i>Haemonchus contortus</i> , tratados ou não com closantel, cobre ou closantel associado ao cobre. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de Adenosina
AK	Adenilato Quinase
ATP	Trifosfato de Adenosina
AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
AMP	Monofosfato de Adenosina
AOPP	Produtos Proteicos de Oxidação Avançada
AST	Aspartato Aminotransferase
BuChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
COWP	Cápsula de óxido de cobre
ER	Espécies Reativas
ERO	Espécies Reativas Oxigênio
FA	Fosfatase Alcalina
FRAP	Capacidade de Redução Férrica do Plasma
GGT	Gama Glutamiltransferase
GSH	Glutathiona
GPX	Glutathiona Peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HC	<i>Haemonchus contortus</i>
HOCL	Ácido Hipocloroso
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
MPO	Mieloperoxidase
MDA	Malondialdeído
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion Superóxido
O <sub>3</sub>	Ozônio
OH <sup>-</sup>	Radical Hidroxil
PK	Piruvato Quinase
p.i	Pós-infecção
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
PSH	Tióis Totais
TOS	Estado de Oxidação Total
TAC	Capacidade Antioxidante Total

## SUMÁRIO

	<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I – MANUSCRITO I – COPPER OXIDE IN THE TREATMENT OF SHEEP EXPERIMENTALLY INFECTED BY <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>: EFFECTS OF ENERGY METABOLISM AND INFLAMMATORY PROCESS.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II – MANUSCRITO II – CÁPSULA DE ÓXIDO DE COBRE ASSOCIADA OU NÃO AO CLOSANTEL: INCREMENTO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E ANTIOXIDANTE EM CORDEIROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados e as metodologias que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois manuscritos, os quais abordam a pesquisa com ovinos infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com cápsulas de liberação lenta de óxido de cobre associado ou não ao closantel, para controle da hemoncose. O experimento foi desenvolvido na Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria e as análises laboratoriais nos laboratórios de Análises Clínicas Veterinária; de Bioquímica e Estresse Oxidativo e de Parasitologia da mesma instituição, sob a coordenação e orientação das professoras Dr<sup>a</sup>. Cinthia Melazzo de Andrade, Dr<sup>a</sup> Marta Lizandra do Rego Leal e Dr<sup>a</sup> Silvia Gonzalez Monteiro.

Esse documento segue as normas do manual de dissertações e teses da UFSM (MDT – 2015). O item DISCUSSÃO, encontrado no final da tese, apresenta as interpretações sob um ponto de vista que buscou estabelecer uma conectividade entre os objetivos e resultados obtidos. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem no item INTRODUÇÃO.

Os artigos estão estruturados conforme as normas das revistas para as quais foram submetidos. Portanto, o MANUSCRITO I de acordo com as normas da *Experimental Parasitology*, enquanto o MANUSCRITO II está descrito conforme as normas da revista *International Journal for Parasitology*.

## 1 INTRODUÇÃO

A hemoncose representa atualmente um dos principais problemas para os criadores de ovinos em todo o mundo. A população de ovinos de acordo com o IBGE (2017) era de 17,97 milhões em 2017, a região Sul figura em segundo lugar no Brasil, representando aproximadamente 23,6% do efetivo da espécie, a primeira é o Nordeste concentrando aproximadamente 64,2% do rebanho nacional no último ano.

A sustentabilidade da atividade ovina para os produtores rurais é determinada principalmente pelo controle de nematódeos gastrointestinais. O *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) é o principal parasito gastrointestinal que acomete rebanhos ovinos em todo o mundo, especialmente em regiões quentes e úmidas (CRAIG, 2009). Esse nematódeo coloniza o abomaso, sendo essencialmente hematófago, ou seja, durante a vida parasitária, alimenta-se de sangue do hospedeiro e, como consequência, os animais portadores de alta carga parasitária podem apresentar anemia e hipoproteinemia acentuada, além de elevada taxa de mortalidade (AMARANTE, 2001).

O ciclo de vida do *H. contortus* tem duas fases, a de vida livre e a parasitária. A fase de vida livre ocorre no ambiente e se inicia pela eliminação de ovos junto às fezes, seguido da eclosão e desenvolvimento da larva até o estágio infectante (terceiro estágio, L3). Esse desenvolvimento compreende uma série de etapas e processos que sofrem influência constante das condições climáticas e do microclima da pastagem (O'CONNOR et al., 2006). Assim, a ocorrência de chuvas estimula o desenvolvimento e a migração das L3 presentes nas fezes para a planta forrageira, e conseqüentemente, a contaminação dos animais durante o pastoreio (ROCHA et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Na fase parasitária, após a ingestão, as L3 sofrem duas mudas no trato gastrintestinal do hospedeiro, para larva de quarto estágio (L4) e larva de quinto estágio (L5 - forma adulta), se diferenciando em machos e fêmeas. Os parasitos adultos são encontrados preferencialmente parasitando o abomaso e, após a cópula, uma fêmea do parasito *Haemonchus* spp. libera junto às fezes aproximadamente 5.000 ovos/dia (LE JAMBRE, 1983). Aspectos relativos à genética, nutrição, estados fisiológicos, manejo do rebanho, taxa de lotação, regime de criação e aspectos relativos ao bem-estar animal impacta o desenvolvimento dos nematódeos (VIEIRA et al., 2002), sendo que as principais categorias susceptíveis ao parasitismo são os animais jovens e as fêmeas no período do periparto, devido a menor eficiência de sua reposta imunológica (ROCHA et al., 2008).



O diagnóstico dessa parasitose pode ser realizado pela avaliação clínica e contagem de ovos por gramas de fezes (OPG). Essa técnica ainda é a mais utilizada no meio científico para avaliar a infecção dos ovinos (DOMKE et al., 2012). No entanto, a técnica tem como fator limitante a sua sensibilidade, uma vez que ovinos com alta carga parasitária podem apresentar fezes com pouco ou sem ovos do parasito devido ao fenômeno densidade dependente, em que fêmeas de *H. contortus* cessam a produção de ovos para evitar crescimento populacional excessivo (ZAJAC, 2006). A coprocultura é outra técnica utilizada no diagnóstico que possibilita distinguir quais gêneros de helmintos estão presentes na amostra de fezes. Nessa técnica obtêm-se as larvas L3, após sete dias de incubação a 27°C (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950).

A infecção pelo *H. contortus* causa alterações no perfil hematológico de ovinos, auxiliando no diagnóstico desta parasitose. Animais com hemonose podem apresentar redução nos valores de hematócrito, de hemoglobina, do número total de eritrócitos e proteína (DA SILVA et al., 2013). Tais reduções ocorrem em decorrência da hematofagia realizada pelo parasito, sendo que uma fêmea adulta é capaz de consumir aproximadamente 200µl de sangue por dia (ZHONG et al., 2014), o que em cargas parasitárias elevadas desencadeia sinais clínicos como anemia e edema submandibular devido à perda de proteínas (AMARANTE, 2014).

A resposta imune possui papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e constitui o principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas associadas com alto índice de mortalidade. Para que o animal esteja realmente protegido contra parasitos e microrganismos, é necessário que tenham um sistema imunológico atuando de maneira eficiente e efetiva (JANEWAY, 2001).

A habilidade de animais tornarem-se susceptíveis ou resistentes à infecção é determinada por células do sistema imune, linfócitos T CD4+, que direciona a resposta dominante para Th1 ou Th2 (GILL et al., 1993). Caracterizar as condições que determinam essas diferentes respostas no animal infectado torna o parasitismo por *H. contortus* um grande desafio aos pesquisadores. A resposta do tipo Th2 para controle de helmintos, incluindo componentes inatos e adaptativos, é caracterizada por elevação dos níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL13, IL-17 e IL-21, eosinófilos, mastócitos, basófilos, hiperplasia das células globulares e produção imunoglobulinas (Ig), que em infecções por *H. contortus* encontram-se em maiores concentrações (SCHAFER et al., 2014). Contudo, o mecanismo de eliminação dos parasitos difere para cada espécie de helminto (ANTHONY et al., 2007). Por outro lado, se a resposta for direcionada ao Th1, o animal desenvolve infecção crônica, com predomínio de

mediadores do tipo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sendo, muitas vezes, incapaz de eliminar os nematódeos, necessitando de tratamentos com medicamentos antiparasitários (JASMER et al., 2007).

A produção de IgE mediada por células T *helper*2 (Th2) é essencial no controle da carga de helmintos, sendo evidenciado na reação de autocura em ovinos infectados com nematódeos gastrointestinais particularmente o *H. contortus*. Enquanto embebidos na mucosa intestinal e abomasal, esses parasitos secretam antígenos, a combinação desses antígenos com as IgE ligadas a mastócitos desencadeiam degranulação e liberação de moléculas vasoativas e proteases. Essas moléculas estimulam a contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular fazendo com que o parasito se desprenda da mucosa (TIZARD, 2013). Já, a IgG atua na neutralização de toxinas, imobilização de bactérias, sensibilização para as células natural killer (NK), ativação do complemento e opsonização (MOLINARO et al., 2009).

Em adição, um mecanismo efetivo inicial importante no controle da carga parasitária e nos fenômenos de auto cura é a inflamação da própria mucosa (WAKELIN, 1978). Células sentinelas, como mastócitos, macrófagos e células dendríticas, são ativadas quando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou alarminas se ligam a seus receptores, o que desencadeia o processo inflamatório (ANTHONY et al., 2007).

O sistema colinérgico está relacionado ao processo inflamatório, uma vez que é atribuído à acetilcolina (ACh) um papel fundamental na regulação da inflamação através da via colinérgica anti-inflamatória, a qual representa um mecanismo de resposta do sistema nervoso central à presença de estímulos inflamatórios (GALLOWITSCH-PUERTA; PAVLOV, 2007). A acetilcolinesterase (AChE) sanguínea e butirilcolinesterase (BuChE) sérica são capazes de interromper a via colinérgica anti-inflamatória por hidrólise da ACh, podendo ser utilizadas como marcadores inflamatórios. Assim, com os estudos dessa via, os efeitos da BuChE se mostram relevantes visto que essa colinesterase desempenha um papel mais importante no sangue que no encéfalo (POHANKA, 2014).

SCHWERTZ et al. (2016) investigaram a atividade da AChE (sangue total e pâncreas) e BuChE (soro e pâncreas) de bovinos naturalmente infectados por *Eurytrema coelomaticum*. Os resultados demonstraram elevação na atividade da AChE no pâncreas e de BuChE no soro dos animais infectados quando comparados aos animais controle. Adicionalmente, observou-se uma correlação positiva entre o número de parasitos e a atividade da AChE, visto que quanto maior a carga parasitária, maior a atividade da AChE. Essas alterações foram atribuídas ao provável processo inflamatório provocado por este parasito.

O controle de helmintoses pelo sistema imune do hospedeiro pode ser um desafio devido ao tamanho do parasito em relação às células do sistema imune (ANTHONY et al., 2007).

Neutrófilos e eosinófilos atuam como efetores e imunomoduladores em infecções por helmintos (CADMAN; LAWRENCE, 2010). Os mecanismos moleculares utilizados por essas células para combater as helmintoses incluem a mieloperoxidase (MPO) (CADMAN; LAWRENCE, 2010; BUYS et al., 1984).

A MPO é uma enzima que desempenha um papel central na inflamação, podendo, assim, ser utilizada como um marcador inflamatório. Essa enzima é encontrada em neutrófilos, monócitos e eosinófilos e sua síntese ocorre durante a diferenciação mieloide na medula óssea (ZUURBIER et al., 1992). Ela é liberada pelos neutrófilos ativados, contribuindo para a defesa do organismo, está geralmente associada ao combate de microrganismos e lesão oxidativa tecidual, e forma substâncias oxidantes ao reagir com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que podem provocar lesões oxidativas nos tecidos (NICHOLLS; HAZEN, 2005). Além disso, essa enzima pode se ligar a estruturas biológicas como fosfolipídios de membranas celulares, sendo capaz de promover lipoperoxidação (HEINECKE, 1999) e catalisar a oxidação de íons cloro ( $Cl^-$ ) formando ácido hipocloroso (HOCl) favorecendo, assim, a injúria celular (PODREZ et al., 2000). Apesar da produção de HOCl ser considerada uma das principais funções da MPO, essa enzima possui funções mais abrangentes, como atividade microbicida e imunomodulação, sendo necessária na resposta imune primária e secundária (ANDREWS; KRINSKY, 1986; ARNHOLD, 2004).

Em adição, neutrófilos e macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam danos a células e conseqüente morte do parasito (RINALDI et al., 2007). As ERO não tem ação específica contra patógenos e dependendo dos níveis de produção, podem gerar lesões em células adjacentes, como por exemplo, lesões na mucosa do abomaso de cordeiros infectados por *H. contortus* (MACHADO et al., 2014), e isso pode levar a redução da capacidade do hospedeiro em suportar a infecção (ROSENFELDT et al., 2013).

As espécies reativas (ER) são produzidas constantemente pelo organismo, tais como as ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre outras, as quais apresentam funções fisiológicas como fagocitose, sinalização celular, controle da pressão sanguínea, apoptose e envelhecimento (FERNANDEZ et al., 2007). O termo “espécies reativas” refere-se a radicais livres e outras moléculas que são igualmente reativas, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ozônio ( $O_3$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ) e nitratos ( $NO_3^-$ ), entre outros (BARREIROS et al., 2006). Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem número ímpar de elétrons em sua última camada, o que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Metais de transição, como ferro ou cobre, podem doar ou aceitar elétrons livres durante reações intracelulares, catalisando a formação de radicais livres

(FERNANDEZ et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007). Assim, as ER podem causar danos, como mutação ou inativação do DNA celular, danos às proteínas e iniciar a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL et al., 2000).

Para equilibrar a produção de espécies reativas, o organismo possui mecanismos antioxidantes que são classificados como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos são: a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a  $H_2O_2$  e oxigênio ( $O_2$ ); a catalase (CAT) que decompõe  $H_2O_2$  a  $O_2$  e água ( $H_2O$ ); e a glutathione peroxidase (GPx) que atua sobre peróxidos utilizando glutathione (GSH) como cofator. O sistema antioxidante não enzimático é formado por diversas substâncias, dentre elas: GSH; tióis totais (SH); tocoferóis; ascorbato; proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina e a apoferritina, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

Quando houver excesso de produção destas espécies reativas ou depleção do sistema antioxidante, ocorrerá o estresse oxidativo, o qual resultará em lesões celulares e conseqüentemente no surgimento de doenças crônicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FERNANDEZ et al., 2007). Esse é um fenômeno frequentemente desencadeado em infecções por *H. contortus* (MACHADO et al., 2014).

A peroxidação lipídica inicia quando as ERO agem sobre ligações duplas ou triplas de ácidos graxos poli-insaturados alterando sua conformação química inicial e, após estas reações iniciarem, elas se autopropagam. Como conseqüências, ocorrem alterações na coesão, na fluidez, na permeabilidade e nas funções metabólicas das células (CHIHUAILAF et al., 2002). Esse dano é avaliado por meio dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER, 1993). Essa técnica avalia indiretamente a produção de malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, que reage com o ácido tiobarbitúrico e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente (VASCONCELOS et al., 2007). Um aumento na peroxidação lipídica provoca dano tecidual e está envolvido em diversas condições patológicas (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). O perfil antioxidante do organismo pode ser analisado mensurando-se a atividade de enzimas antioxidantes e componentes não enzimáticos por espectrofotometria, como a SOD, CAT e GSH e PSH (ESMAEILNEJAD et al., 2014).

O estresse oxidativo causado pela infecção por *H. contortus* vem sendo estudado. Nicolodi e colaboradores (2010) evidenciaram que a infecção por *H. contortus* leva a um aumento da lipoperoxidação em cordeiros experimentalmente infectados. Outras pesquisas demonstraram aumento da peroxidação lipídica de cordeiros infectados pelo *H. contortus* em

comparação aos animais infectados e tratados com selênio (LEAL et al., 2010; LEAL et al., 2014), bem como detectaram aumento na atividade da GPx em animais infectados e tratados com selênio em comparação com os infectados e não tratados (LEAL et al., 2014). Assim, sabe-se que a hemoncose leva ao desenvolvimento de uma condição de estresse oxidativo, evidenciada pela alteração de marcadores como TBARS (LEAL et al., 2010; LEAL et al., 2014; NICOLODI et al., 2010), produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) e capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) (MACHADO et al., 2014), GPx e CAT (LEAL et al., 2014), estado de oxidação total (TOS) e capacidade antioxidante total (TAC) (PIVOTO et al., 2015).

A rede de fosfotransferência é fundamental para o sistema hepático, desenvolvendo um papel significativo na energética do fígado, fornecendo fosfatos de alta energia e transmitindo sinais de demanda de energia para vias geradoras de ATP. Este sistema catalisa a troca de nucleotídeos, facilitando a comunicação energética intracelular, a fim de manter o equilíbrio entre o consumo de ATP celular e produção (Dzeja e Terzic, 2003). A adenilato quinase (AK) catalisa a transferência reversível do grupo  $\gamma$ -fosfato de um doador de fosfato (normalmente ATP) para monofosfato de adenosina (AMP) e está envolvido na facilitação da comunicação energética intracelular no tecido hepático (Dzeja e Terzic, 2009). Além disso, a piruvato quinase (PK) catalisa a transfosforilação irreversível do fosfoenolpiruvato (PEP) ao difosfato de adenosina (ADP) para formar piruvato e ATP (Wang et al., 2002) desenvolvendo um papel fundamental na via glicolítica, a principal rota que fornece energia ao funcionamento adequado do tecido hepático. Recentemente, estudos demonstraram que a inibição de enzimas, como adenilato quinase (AK) e piruvato quinase (PK), da rede de fosfotransferência contribui diretamente para a patogênese e desenvolvimento de sinais clínicos de doenças infecciosas causadas por parasitas (Baldissera et al., 2015; Baldissera et al., 2018). Assim, é possível que estas enzimas estejam alteradas na hemoncose, podendo colaborar para a patogênese da doença.

O controle do *H. contortus* é comumente realizado com a utilização de quimioterápicos, os quais são utilizados em diferentes métodos, como o controle estratégico, o seletivo e o supressivo. No controle estratégico o tratamento é realizado conforme os fatores climáticos de cada região, com base no que se sabe sobre a dinâmica populacional da região que a propriedade está localizada. Uma das principais vantagens do controle estratégico é a redução da frequência de tratamento e o aumento do intervalo entre o mesmo, o que, conseqüentemente, retarda o surgimento da resistência parasitária. Já no controle seletivo se trata apenas alguns animais do rebanho. O tratamento supressivo consiste em tratar os animais a cada duas ou quatro semanas, sendo empregado em animais jovens e de grande valor genético ou econômico. Embora seja eficiente no controle do parasitismo, pode induzir desenvolvimento de resistência anti-

helmíntica (BENTOUNSI; MERADI; CABARET, 2012). Ainda, existem métodos alternativos de controle como o método FAMACHA©, idealizado para identificar, através da coloração da membrana conjuntiva, animais capazes de suportar uma infecção por *H. contortus*. Logo, torna-se possível tratar somente os animais que sofrem de parasitismo severo, deixando sem tratamento aqueles que não apresentam anemia clínica. Desta forma a pressão de seleção para a resistência aos anti-helmínticos será menos intensa (MOLENTO, 2011).

O closantel é um antiparasitário salicilanilida descoberto pela *Janssen Pharmaceutica* (GUERRERO, 1984), possui uma molécula de elevado peso molecular ligada a um ácido fraco e de propriedades extremamente lipofílicas, ele é ativo tanto por via oral como intramuscular (MICHIELS et al., 1987). Essa droga se liga fortemente as proteínas plasmáticas, sendo ingerido pelo parasito hematófago. A característica de ligação às proteínas plasmáticas também prolonga os níveis da droga na corrente sanguínea e evita reinfecções (HENNESSY, 1993).

A eficácia contra vários tipos de endo e ectoparasitos em ovinos fez com que o closantel se destacasse dentre os quimioterápicos (UPPAL et al., 1993), inclusive no controle de *H. contortus* em pequenos ruminantes (BARGER et al., 1991). Esse anti-helmíntico atua como desacoplador da fosforilação oxidativa da mitocôndria e exerce seu efeito sobre os parasitos pela interferência na síntese de ATP na mitocôndria dos mesmos (MICHIELS et al., 1987; HOLENWEGER; TAROCCO, 1982), induzindo uma paralisia flácida nos segmentos musculares do *H. contortus* (BACON et al., 1998).

O closantel também altera a ultraestrutura dos parasitos hematófagos, provocando edema e desprendimento do tegumento, dano mitocondrial e redução dos produtos de secreção das células tegumentares e gastrodermais. A sensibilidade desses hematófagos aos agentes desacopladores pode ser devida a atividade do ciclo de Krebs ser restrita a camada externa do parasito (SWAN, 1999).

A dose recomendada de closantel para tratamento de trematódeos e nematódeos em ovinos, caprinos e bovinos é de 10 mg/kg (closantel a 10%), com frequência de aplicação variável, dependendo do tipo de controle adotado em cada propriedade (estratégico, seletivo ou supressivo). Essa droga pode ser degradada pelo fígado em moniodoclosantel, porém mais de 90% é liberada pelo fluxo biliar sem metabolização. Assim, grande parte da mesma é excretada pela bile em cerca de oito semanas após a administração e no mínimo 0,5% pela urina, 1% no leite e 1-2% ao dia nas fezes (MICHIELS et al., 1987).

Furlan et al (2009) relataram que a intoxicação por closantel ocorre acidentalmente quando o produto é utilizado em sobredosagens e pode causar cegueira, apatia, incoordenação motora e em alguns casos, até mesmo a morte. Estudo realizado por Van Cauteren et al (1985)

relatando a intoxicação por closantel em ovinos constatou que a dose de 70 mg/kg levou a morte de dois animais e que a toxicidade e a margem de segurança do salicilanilida são dose dependentes, essa última pode ser alterada por mudanças na biodisponibilidade e ligação da droga às proteínas plasmáticas.

Apesar do closantel se destacar como anti-helmíntico, o *H. contortus* demonstra uma notável propensão para o desenvolvimento da resistência a todos os medicamentos utilizados em seu controle. Assim, foi descrita a resistência desse parasito ao closantel (MOLENTO, 2004). Devido a sua receptividade experimental, a investigação sobre este parasita tem contribuído mais do que qualquer outro para a compreensão da resistência aos anti-helmínticos (GILLEARD, 2013).

A resistência parasitária pode ser definida como um aumento da habilidade das cepas de parasitos em resistir ou sobreviver às doses de uma droga que eliminaria a maioria dos indivíduos da mesma espécie, sendo constatada quando o produto antiparasitário tem sua eficácia no combate ao parasito inferior a 90-95% (COLES et al., 2006). Os variados mecanismos para esse fenômeno incluem modificação do alvo de ação da molécula, incremento do número de receptores alvos, aumento da taxa de excreção da droga, elevação da eficácia de metabolização do princípio ativo ou simplesmente sequestro da droga (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008).

A pressão seletiva imposta por tratamentos anti-helmínticos tem efeitos semelhantes às ações imunológicas do hospedeiro resistente frente à população de parasitos. Após vários anos de uso generalizado de medicamentos para o controle de infecções parasitárias, o aumento da prevalência de nematódeos resistentes é crescente. Ainda, há de se considerar que o uso contínuo de drogas anti-helmínticas não elimina os parasitos, principalmente porque a maioria das populações de nematódeos estão em refúgios (por exemplo, ovos e larvas no pasto; infectando animais assintomáticos ou em outras espécies hospedeiras). Além disso, a associação genética presente nas populações desses refúgios fornece continuamente mutações que conferem resistência aos medicamentos (MOLENTO et al., 2011; NUNES et al., 2013).

No Brasil, a prevalência de resistência aos anti-helmínticos nos rebanhos ovinos representa um grave problema para o controle eficiente das helmintoses gastrintestinais. Essa situação não é diferente em outros países onde a resistência parasitária à maioria dos grupos químicos também é uma realidade (AMARILHO-SILVEIRA, 2015).

Neste contexto, estudos vem sendo realizados visando o desenvolvimento de alternativas para reduzir o uso de anti-helmínticos no controle da hemonose, como o emprego de minerais (GONÇALVES, 2004). Tem sido relatado também a utilização de microminerais

como o selênio, que apresentou ação na redução do estresse oxidativo causado por *H. contortus*, e o cobre (lactobionato, gluconato e octadecanoato de cobre), que aumentou o ganho de peso de animais infectados em relação aos não suplementados (LEAL et al., 2010; LEAL et al., 2014). Em adição, o cobre em associação ao zinco (edetato dissódico de cobre-zinco) demonstrou ter ação na resposta imune de cordeiros infectados por *H. contortus* (SCHAFER et al., 2014) e, ainda, cobre quando administrado por via oral tem ação direta no controle do *H. contortus* (GALINDO-BARBOZA et al., 2011; SOLI et al., 2010). O edetato de zinco reduziu o estresse oxidativo causado pelo *H. contortus* em cordeiros experimentalmente infectados, porém sem redução da carga parasitária (PIVOTO, 2015).

Os microminerais são elementos essenciais para o organismo animal e estão diretamente relacionados ao crescimento, as funções fisiológicas e a produtividade. A deficiência destes elementos pode causar desenvolvimento inadequado dos animais e ainda predispõe a enfermidades (HERDT; HOFF, 2011). O cobre é um microelemento ou elemento traço que é fundamental na regulação de muitos processos vitais, tais como crescimento, diferenciação e respiração celular, produção de colágeno, elastina e síntese de hemoglobina (SHARMA, 2005).

O cobre é proveniente dos alimentos e apresenta pequena disponibilidade, em torno de 4%, essa intimamente ligada à forma química a qual se encontra e sua solubilidade (ORTOLANI, 2002). O excesso de cobre em ovinos pode levar a toxicidade e desenvolvimento de sinais clínicos que incluem diarreia, anorexia, desidratação e crise hemolítica, com alterações em enzimas/metabólitos hepáticos e renais. Os baixos níveis de molibdênio e zinco na dieta podem aumentar a absorção ou retenção de cobre. Crises hemolíticas em animais cronicamente intoxicados podem ser desencadeadas por estresse, má nutrição e lactação (AIELLO, 1998). Por outro lado, quando se tem uma deficiência de cobre, os linfócitos T e B, neutrófilos e macrófagos reduzem a sua função, ocorrendo uma diminuição de anticorpos e, conseqüentemente, da resposta imunológica específica e inespecífica. Com isso, o animal passa a ter um sistema imunológico debilitado e susceptível ao ataque de microrganismos (BABIOR et al., 1973).

Em ruminantes, o cobre e outros minerais podem se combinar no rúmen para formar complexos triplos não absorvíveis denominados cupro-tiomolibdatos (Cu-TMs). Um efeito fisiológico importante dos Cu-TMs é a restrição da disponibilidade de Cu para a síntese de ceruloplasmina, que é responsável por carrear esse mineral para tecidos específicos do organismo fazendo com que se mantenha a homeostase (VÁSQUEZ, 2001). A ceruloplasmina é uma fração alfa-2 globulina do sangue, em que cerca de 95% do cobre sérico encontra-se ligado. Para se detectar estados carenciais, a determinação de ceruloplasmina plasmática ou da



enzima superóxido dismutase dos eritrócitos pode ser válida já que possuem uma alta correlação com os níveis sanguíneos de cobre (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

A cápsula com partículas de óxido de cobre (COWP) inicialmente foi desenvolvida para superar a deficiência de cobre nos ruminantes em pastagens. O óxido de cobre para obtenção da cápsula é extraído pela torrefação de metal de cobre em um forno oxidante ou por solubilização de metal de cobre com ácido e tratando-o com um cáustico para precipitar o óxido de cobre (PRÍNCIPE AGRI PRODUCTS, 2003).

A dose recomendada para cordeiros (20-40 kg) é de uma cápsula de 2g (Copasure®). As cápsulas depois de serem administradas via oral, vão para o rúmen e se aderem à mucosa do abomaso liberando partículas e elevando o cobre solúvel, onde é mantido por 32-59 dias através do movimento distal ruminal, sendo absorvida a partir do trato intestinal e armazenada no fígado (DEWEY, 1977; SUTTLE, 1981; CHARTIER et al., 2000). O uso de COWP não deve exceder 12 meses devido ao acúmulo de cobre no fígado (BURKE, 2004), uma vez que este órgão está dividido didaticamente em três compartimentos de armazenagem de cobre, o primeiro é o compartimento de estocagem temporária destinada a trocas com o sangue e excreção pela bile; o segundo compartimento representa a estocagem temporária para incorporação na ceruloplasmina e o terceiro compartimento representa o local de armazenagem por longo tempo (ORTOLANI, 2002).

Pesquisas vêm sendo realizadas para verificar o efeito do COWP na prevenção do estabelecimento de larvas infectantes de *H. contortus*, porém a eficácia dos tratamentos tem demonstrado resultados variados (KNOX, 2002; CHARTIER et al., 2000; BURKE, 2006). Baixas doses de COWP foram eficazes para o controle de nematódeos gastrointestinais após o desmame, porém em cordeiros de até doze meses o tratamento foi menos eficaz. Isto pode ser atribuído, em parte, a uma redução na proporção de *H. contortus* após a administração inicial de COWP (BURKE, 2006). O nível mais elevado desse suplemento (6 gramas) diminuiu a anemia causada por *H. contortus*, assim como a recuperação dos sinais clínicos da hemocose foi mais rápida (BURKE, 2004). Com relação a aspartato aminotransferase (AST), foi observado leve aumento da atividade enzimática nos ovinos infectados com *H. contortus* e tratados com cobre comparado aos grupos controles. No entanto, este aumento não causou efeitos colaterais como redução do peso ou danos ao fígado (GONÇALVEZ et al., 2004). A atividade da AST e as concentrações de cobre no fígado indicaram um risco mínimo de toxicidade do cobre em cordeiros infectados com *H. contortus* e tratados com cápsulas de óxido de cobre (BURKE, 2006), porém esse mesmo autor, em 2005, relatou elevada atividade da AST em cordeiros filhotes de ovelhas tratadas com 4 g de cobre, o que sugere que o cobre pode ter

migrado para os tecidos fetais. Ainda, sabe-se que o COWP tem o potencial de reduzir a fecundidade do *Haemonchus* spp., podendo reduzir a contaminação larval do pasto em especial onde a resistência ao anti-helmíntico é um problema emergente (KNOX, 2008).

Embora COWP esteja ganhando credibilidade como um anti-helmíntico de terapia, há uma série de questões que ainda devem ser elucidadas, como as diferenças no metabolismo em diferentes raças de ovinos e caprinos (RANKINS et al., 2002). Para os animais que não são deficientes de cobre, existe uma preocupação no uso dessa terapia devido à toxicidade que pode afetar a qualidade da carne (VATTA, 2009).

Devido à importância da hemoncose, como principal problema para os criadores de ovinos em todo o mundo, e o fato de que os nematódeos gastrointestinais estão se tornando resistentes às moléculas disponíveis no mercado, muitas vezes ocorrendo resistência a todos os princípios ativos deixando os produtores rurais sem opções de tratamento, pesquisadores vêm trabalhando para buscar tratamentos alternativos. Assim, uma dessas alternativas é minimizar os danos causados pelo parasito através de suplementos que modulem o sistema imune dos ovinos perante os nematódeos gastrointestinais.

Pesquisas vêm demonstrando que minerais reduzem os ovos por grama de fezes e contagem de parasitos adultos no abomaso, além de incrementar a resposta imune e ação antioxidante e contribuir para ganho de peso. Nesse contexto, esta pesquisa investigou se a cápsula de liberação lenta de óxido de cobre, em associação ou não ao closantel, é capaz de reduzir a infecção parasitária, incrementar a resposta imune e sua ação no processo inflamatório, metabolismo energético hepático e nos marcadores de estresse oxidativo em ovinos infectados experimentalmente com *H. contortus*.

**2 CAPÍTULO I – MANUSCRITO I – COPPER OXIDE AND CLOSANTEL PREVENT ALTERATIONS IN HEPATIC ENERGETIC METABOLISM AND REDUCES INFLAMMATION IN *Haemonchus contortus* INFECTION.**

Artigo submetido para: *Experimental Parasitology*

**Copper oxide and closantel prevent alterations in hepatic energetic metabolism and reduces inflammation in *Haemonchus contortus* infection.**

Andressa S. Schafer<sup>a\*</sup>, Matheus D. Baldissera<sup>c</sup>, Cássia Bagolin da Silva<sup>a</sup>, Juliana Sorrailla de Oliveira<sup>b</sup>, Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos<sup>c</sup>, Guilherme Lopes Dornelles<sup>a</sup>, Thirssa Helena Grando<sup>c</sup>, Lucas Trevisan Gressler<sup>c</sup>, Simone Stefanello<sup>d</sup>, Eduarda Santi<sup>c</sup>, Alessandro Pelegrine Minho<sup>e</sup>, Daniele Rodrigues<sup>a</sup>, Carine F. Souza<sup>f</sup>, Marta L.R. Leal<sup>d</sup>, Silvia G. Monteiro<sup>c</sup>, Sonia T. A. Lopes<sup>a</sup>, Cinthia M. Andrade<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº1000, Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Bioquímica e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº1000, Santa Maria, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Endocrinologia e Metabologia Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº1000, Santa Maria, Brazil

<sup>e</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul, Bagé, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima nº1000, Santa Maria, RS, Brazil.

\* Author for correspondence: Andressa S. Schafer- Address: Rua Doutor Bozano, 711 apto 401, Bonfim CEP: 97015-001, Santa Maria – RS, Brazil. Phone: +55 55 99994-9003. E-mail: [andressasalvadori@hotmail.com](mailto:andressasalvadori@hotmail.com) (A.S. Salvadori).

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate if the use of copper oxide wire particles, isolated or in association with closantel, in lambs infected with *Haemonchus contortus* enhance the anthelmintic efficacy of closantel, as well as evaluate the effects of treatment in hepatic energy metabolism, inflammatory markers and hematological and biochemical tests. The lambs were randomly divided into five groups (6 animals each), as follow: uninfected animals (Control); animals infected with *H. contortus* (HC); infected and treated with closantel (HC+CL); infected and treated with copper oxide (HC+Cu); and infected and treated with closantel plus copper oxide (HC+CL+Cu). The animals of infected groups were infected orally with *H. contortus* (5,000 larvae) and on day 14 post infection (p.i) the treatments were initiated. The egg per gram of feces (EPG), butyrylcholinesterase (BuChE), myeloperoxidase (MPO), adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) activities and hematological and biochemical tests were evaluated. Treatments with closantel (isolated and associated) and copper oxide were able to reduce the EPG count on days 28 to 49 p.i when compared to HC group. Moreover, treatment with closantel (isolated or associated) was able to prevent the inhibition of hepatic AK and PK activities elicited by *H. contortus* infection, which may contribute to efficient intracellular energetic communication in order to maintain the balance between cellular ATP consumption and production. BuChE and MPO activities were higher in infected animals compared to uninfected, while treated groups showed lower enzymatic activity compared to the group HC. The use of all therapeutic protocols was able to reduce the EPG count. Based on these evidences, the use of copper oxide plus closantel may be considered an alternative to treat lambs infected by *H. contortus*.

**Keywords:** Adenylate kinase; Pyruvate kinase; ATP; COWP; Butyrylcholinesterase; Myeloperoxidase.

## 1. INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes are one of the principal diseases that economically restrict sheep production worldwide (Bhat et al., 2011; Muchiut et al., 2018), such as the *Haemonchus contortus* (*H. contortus*). Hematological and biochemical alterations may be observed in animals with haemoncosis. However, after the parasite attaches to the abomasal mucosa, an effective initial mechanism to control parasitic load and to self-healing phenomena is the inflammation of the mucosa (Wakelin, 1978). This inflammatory process may be detected by measuring butyrylcholinesterase (BuChE) and myeloperoxidase (MPO) activities (Das, 2007; Anatoliotakis et al., 2013).

The prevalence of helminths presenting multi-drug resistance has increased the need to therapeutic alternatives in replacement of drugs commonly used. Closantel (C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>I<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is an important anthelmintic drug used to treat *H. contortus* infection, however this parasite can develop resistance to closantel in experimental conditions (Almeida et al., 2010; Lloyd et al., 2010). According to Almeida et al. (2010), closantel was unable to reduce the fecal egg count and the number of worms found at necropsy of infected sheep.

An interesting alternative to conventional treatment is the use of microminerals such as copper, since the treatment with copper oxide (2 and 1 g) was able to reduce the fecal egg count during haemoncosis, demonstrating that this mineral will be useful to producers to address anthelmintic resistance by choosing alternative therapies in parasite control (Schweizer et al., 2016). Also, problems associated with chemical residues and toxicity reinforce the need to found new therapeutic protocol to treat haemoncosis (Muchiut et al., 2018). In this sense, the use of copper oxide wire particles (COWP) has been described as a supplement that may be able to minimize the damage caused by haemoncosis (Bang et al., 1990; Knox, 2002; Burke and Miler, 2006; Soli et al., 2010; Schweizer et al., 2016).

The capsule with copper oxide wire particles (COWP) was initially developed for supplementation of cattle with deficiency of this mineral. After being administered orally the capsules pass through the rumen and adhere to the mucosa of the abomasum releasing the particles gradually and raising the soluble copper (Chartier et al., 2000). For animals that are not copper-deficient, there is the concern about the use of this supplement due to toxicity (Vatta, 2009). Although COWP have been studied as a possible anthelmintic, there are a number of issues that still need to be elucidated.

Phosphotransfer network is fundamental to hepatic system, developing a significant role in liver energetics by delivering high-energy phosphoryls and conveying energy demand signal to ATP-generating pathways. This system catalyzes nucleotide exchange facilitating the intracellular energetic communication in order to maintain the balance between cellular ATP consumption and production (Dzeja and Terzic, 2003). The adenylate kinase (AK) catalyzes the reversible transfer of  $\gamma$ -phosphate group from a phosphate donor (normally ATP) to adenosine monophosphate (AMP), and is involved in the facilitation of intracellular energetic communication on liver tissue (Dzeja and Terzic, 2009). Moreover, pyruvate kinase (PK) catalyzes the irreversible transphosphorylation of phosphoenolpyruvate (PEP) to adenosine diphosphate (ADP) to form pyruvate and ATP (Wang et al., 2002) developing a fundamental role on the glycolytic pathway, the main route that provides energy to suitable liver tissue functioning. Recently, studies have demonstrated that inhibition on enzymes of phosphotransfer network contributes directly to disease pathogenesis and appearance of clinical signals of infectious diseases caused by parasites, as observed in experimental infections with *Trypanosoma evansi* and *Ichthyophthirius multifiliis* (Baldissera et al., 2015; Baldissera et al., 2018).

In this context, the aim of this study was to evaluate if the use of copper oxide wire particles, isolated or in association with closantel, in lambs infected with *Haemonchus*

*contortus* enhance the anthelmintic efficacy of closantel, as well as evaluate the effects of treatment in inflammatory markers (butyrylcholinesterase and myeloperoxidase) and hematological and biochemical tests. Moreover, evaluate if the impairment on enzymes belonging to phosphoryl transfer network contributes to disease pathophysiology of liver tissue of lambs experimentally infected with *H. contortus*.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Animals and experimental procedures*

Thirty male lambs (Corriedale breed; eight-month age; 30 kg) were used as experimental model to evaluate the efficacy and effect of treatment on hepatic metabolism. All animals were subjected to 30 days of environmental adaptation in the ruminant clinic of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and were treated with 2ml of monepantel, 2ml of albendazole and 4ml of fortgal (sulfadoxine, trimethoprim and piroxicam) in order to eliminate all possible nematode infection and inflammation until the initiation of experiment.

The animals were randomly divided into five groups with six animals each, as follow: 1) uninfected animals (Control); 2) animals infected with *H. contortus* and non-treated (HC); 3) infected and treated with closantel (HC+CL); 4) infected and treated with copper oxide particles (HC+Cu); 5) infected and treated with closantel plus copper oxide particles (HC+CL+Cu). The groups were maintained in separate bays. The control group was isolated from the other groups and all procedures in this group were performed with separate equipment. The bays were cleaned daily to prevent reinfection of lambs.

Prior to the experimental infection, EPG was performed and the animals were attested as free from gastrointestinal nematodes. On day 0 of experiment, the animals of infected groups received orally a single dose of *H. contortus* (5,000 larvae). The larvae of *H. contortus* were obtained by coproculture, using the method described by O'Sullivan and Roberts (1950). The

material was collected from ovine donors infected with *H. contortus* allocated in “Embrapa Pecuária, Bagé / RS”. Fecal samples were collected directly from rectal ampulla on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 p.i. in order to evaluate the infection.

The treatments were initiated after confirmation of infection by the increase of the parasitic load in the EPG count, on day 14 post-infection (p.i). Copper oxide wire particles (COWP - 2 g single dose; Copasure®) was administered orally to groups HC+Cu and HC+CL+Cu; and closantel (1 ml/10 kg, single dose; Diantel®) was also administered orally to groups HC+CL and HC+CL+Cu.

The diet of the lambs was prepared for the experiment, consisting of (per day): 1,800 kg of ryegrass hay, 250 g of Puro Trato® brand ration with 14% crude protein, 240 g of soybean meal and 12 g of calcitic limestone. The diet was divided and offered twice a day, at 07:30 and 18:00.

All procedures developed in this study were approved by Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) under number 3748011116.

## 2.2. *Sample collection and tissue preparation*

Blood samples were collected by venipuncture of jugular vein, using a *vacutainer* system, on days 0, 21, 35 and 49 p.i and stored in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 10%) and tubes without anticoagulants. Samples were collected on previously established days considering the cycle of the parasite, the possible changes in the variables evaluated. It is believed that at shorter intervals of collections there would be no significant changes in the variables evaluated and could induce more stress to the animals.

The blood sample with EDTA was used for red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT). After, all blood samples were centrifugated (3200 rpm for 4 min) to obtain serum and plasma; and stored at -18°C until biochemical analysis. Samples were used



to perform myeloperoxidase (plasma) and butyrylcholinesterase (serum) activities and serum biochemical tests. On day 50 p.i., the animals were euthanized in a slaughterhouse with municipal inspection and the liver tissue was collected in order to evaluate the effects of treatment on liver energy metabolism.

### 2.3. EPG

Eggs per gram of feces was evaluated according the method preconized by Gordon and Whitlock (1939), on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 p.i.. Results were expressed as eggs per gram of feces.

### 2.4. Hepatic ATP metabolism

Hepatic AK activity was measured with a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) according to Dzeja et al. (1999). The reaction mixture contained 100 mM of KCl, 20 mM of HEPES, 20 mM of glucose, 4 mM of MgCl<sub>2</sub>, 2 mM of NADP<sup>+</sup>, 1 mM of EDTA, 4.5 U/mL of HK, 2 U/mL of G6PD and 20 µL of hepatic homogenate. The reaction was initiated by the addition of 2 mM of ADP and the reduction of NADP<sup>+</sup> was followed at 340 nm for 3 min in a spectrophotometer. The results were expressed as µmol ATP formed/min/mg of protein.

Hepatic PK activity was assayed according the protocol established by Leong et al. (1981). The incubation medium consisted of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM of NADH, 75 mM of KCl, 5.0 mM of ADP, 7 U of lactate dehydrogenase, 0.1 % of Triton X-100, and 10 µL of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 500 µL. After 10 min of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 1 mM of PEP. The results were expressed as µmol pyruvate formed/min/mg of protein.

### *2.5. BuChE and MPO activities*

The BuChE enzymatic assay was determined in serum of sheep by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961). The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25 °C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM butyrylthiocholine iodide (BSCh). Enzyme activity was expressed in  $\mu\text{mol BuSCh}/\text{min}/\text{mg}$  of protein.

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured in blood plasma of sheep. The MPO activity was analyzed spectrophotometrically by a modified peroxidase-coupled assay system involving phenol, 4-aminoantipyrine (AAP) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Metcalf et al., 1986). Briefly, 390  $\mu\text{L}$  of 2.5 mM AAP and 20 mM phenol were placed in each tube, followed by 450  $\mu\text{L}$  of 1.7 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  as oxidizing agent, MPO catalyzed the oxidative coupling of phenol and AAP yielding a colored product, quinoneimine. The millimolar absorbance coefficient for the quinoneimine was determined. Results were expressed in micromolar of quinoneimine produced at 30 min.

### *2.6. Hematological and Biochemical analysis*

RBC and hemoglobin were evaluated in an automated cell counter (Vet Auto Hematology, Mindray BC 2800). The hematocrit was obtained by centrifugation in a microcentrifuge (Quimis) at 14,000 rpm for 7 min.

Serum albumin (ALB), total protein (TP), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) were measured according to manufacturer instruction using commercial kits (Laborlab®) in an automatic device (Mindray BS 120).

### 2.7. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples followed by the Tukey *post hoc* analysis. Significance was set at  $p < 0.05$ , and the results were expressed as a mean  $\pm$  standard error of mean.

## 3. RESULTS

### 3.1. EPG count

All treatment reduced EPG count on days 28, 35, 42 and 49 p.i compared to HC group (Figure 1).

### 3.2. BuChE and MPO activities

A significant increase on BuChE activity was observed on infected animals compared to uninfected animals on days 21, 35 and 49 of experiment. On day 21 p.i, all treatments were able to prevent the increase of BuChE activity when compared to infected animals, as well as observed on days 35 and 49 p.i for HC+Cu and HC+CL+Cu groups (Figure 2A).

A significant increase on MPO activity was observed on infected animals compared to uninfected animals on days 21, 35 and 49 p.i. MPO activity of all treated groups were lower compared to infected animals on days 21, 35 and 49 p.i (Figure 2B).

### 3.3. Hematological and Biochemical analysis

The animals did not presented anemia (data not showed). Serum albumin levels (Figure 3A) were lower in HC+CL group compared to uninfected animals on day 21 p.i., the association with copper (HC+CL+Cu) or copper isolated (HC+Cu) prevents this alteration on serum albumin levels. On day 49 p.i, albumin levels were lower in the HC+CL+Cu when compared to control group and HC+Cu group. Total proteins levels (Figure 3B) were lower in HC+CL

group when compared to control group on day 21 p.i. On day 49 p.i., HC+CL+Cu group showed lower levels of serum protein compared to control group, HC+Cu and HC+CL groups. No significant difference was observed between groups regarding AST and ALP levels (Figure 4A/B).

### 3.4. Hepatic ATP metabolism

A significantly reduction on hepatic PK and AK activities were observed on infected animals (HC) when compared to control group. Moreover, treatment with closantel and closantel plus copper was able to prevent the inhibition on hepatic PK and AK activities compared to HC group (Table 1).

## 4. DISCUSSION

In the present study, we observed that animals infected with *H. contortus* developed an inflammatory condition, demonstrated by the increase in BuChE and MPO activities, that was prevented by the treatments used. The animals of groups HC, HC+CL, HC+Cu and HC+CL+Cu showed differences in serum biochemistry. All therapeutic protocols used in this study reduced EPG count after 28 days of infection. In addition, it is emphasized that for the first time a study evaluated the hepatic energetic metabolism during haemoncosis and the treatments with closantel and closantel plus copper oxide were able to prevent the impairment on hepatic bioenergetics elicited by *H. contortus* infection.

Regarding EPG count, all treatments were able to reduce the EPG count after 28 days of infection, which demonstrate the potential use of closantel and COWP in the control of *H. contortus*. The anthelmintic effects of COWP have been described for abomasal nematodes, such as *H. contortus* and *Ostertagia circumcincta*, and others parasites (Bang et al., 1990; Knox, 2002; Burke and Miller, 2006; Soli et al., 2010; Schweizer et al., 2016). These effects may due

to the potential of COWP to reduce establishment and parasite fecundity of *H. contortus* (Knox, 2002). On day 49 p.i. the EPG count remained low in treated groups, showing that all treatments were effective for an extended period. However, it is highlighted the effect of COWP in control of *H. contortus* infection due to the fact that the use of this supplement may reduce the egg laying by parasite and consequently the contamination of pasture by larvae of *H. contortus* in areas where anthelmintic resistance occurs.

Although evidences have demonstrated the anthelmintic resistance of closantel (Almeida et al., 2010; Lloyd et al., 2010), we observed that closantel was able to reduce the EPG count, in agreement to observed by Westers et al. (2016) which described 99 and 100 % of efficacy in recently lambed ewes and in grazing lambs, respectively. However, it is important to emphasize that several factors can affect the efficacy of anthelmintic drugs, as different therapeutic protocols, route of administration, treatment timing, pastures status and animal health (Luoga et al., 2015). These factors may be involved in the divergent results presented in scientific literature about closantel efficacy. In summary, the use of copper oxide (isolated or associated) and closantel may be considered an interesting approach to treat animals infected by *H. contortus*.

The establishment of *H. contortus* infection occurs after the sheep ingest stage three larvae in the pasture. The parasite attaches to the abomasal mucosa and induces lesion and hyperplasia of the mucosa and infiltration of inflammatory cells (Fox, 1997). In response, the host synthesizes and secretes molecules such as pro-inflammatory cytokines (Schafer et al., 2014) and the molecular mechanisms used by neutrophils and eosinophils to eliminate helminths include increased release of MPO (Cadman, Lawrence, 2010). Also, an increase in BuChE activity is correlated with different anti-inflammatory molecules, such as fibrinogen, albumin, interleukin-6 and others. In plasma, BuChE is the primary enzyme that hydrolyzes acetylcholine (Ofek et al., 2007; Lampón et al., 2012). Increased BuChE and MPO activity in

infected animals when compared to control group, on days 21, 35 and 49 p.i., indicate an inflammatory process and a response against *H. contortus* infection, once these enzymes are considered inflammatory markers (Das, 2007; Anatoliotakis et al., 2013).

During all moments of study, the treatments were able to prevent the increase in BuChE and MPO activities indicating anti-inflammatory properties. SCHWERTZ et al. (2016) observed an increase in AChE and BuChE activities in cattle naturally infected with *Eurytrema coelomaticum* when compared to uninfected animals and, also, a positive correlation between the number of parasites and the AChE activity, in which high parasite load increased AChE activity. Interestingly, the groups treated with COWP (isolated or associated with closantel) presented lower activities of BuChE and MPO in relation to HC group, demonstrating that oxide copper exerts anti-inflammatory effects. This anti-inflammatory effect occurs via modulation of prostaglandin synthesis and physiological effects of histamine, as well as via decrease in permeability of synovial lysosomes (Jackson et al., 2000).

*H. contortus* is a hematophagous parasite, thus blood loss due to infection leads to a reduction in iron and erythropoiesis, protein loss characterized by hypoproteinemia with hypoalbuminemia (Adams, 1993; Fernandez et al., 2006; Bastos et al., 2016). Total protein and albumin levels presented similar behavior in the present study in all experimental periods, it was observed a decrease in the levels of these variables in the infected group treated only with closantel when compared to the uninfected group on day 21 p.i and in the group infected and treated with closantel plus copper on day 49 p.i.

Albumin is a negative acute-phase protein and a reduction in the synthesis of this protein may occur as a result of inflammation (Sanadi et al., 2017). Considering that the activities of MPO in all experimental periods and BuChE on day 49 p.i. were higher in the group treated only with closantel when compared with the groups with copper supplementation and haemoncosis causes inflammation and hyperplasia in the mucosa and abomasal glands (Fox,

1997), it is possible that the lambs not supplemented with copper have developed a more intense inflammatory response, since copper oxide may have anti-inflammatory properties. In addition, this may occur because copper (Cu) is an essential element for the maintenance of energy and protein metabolism (Sobrinho et al., 1996). Regarding AST and ALP no changes were observed, ruling out possible toxic effects of COWP supplementation.

The liver develops a role in the physiological regulation of whole-body bioenergetics homeostasis, and the phosphotransfer network are considered an important pathway involved in the regulation of liver bioenergetics (Wang et al., 2002; Dzeja, Terzic, 2003). Adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) are important enzymes involved in ATP production and the inhibition of these enzymes may impact ATP levels. In the present study, it was observed a reduction in AK and PK activities in HC group when compared with control group. The inhibition of AK and PK activities in *H. contortus* infection may culminate in decreased availability of ATP and impairment of communication between sites of ATP synthesis and ATP consumption, in accordance to observed in liver of experimentally infected rats with the parasite *T. evansi* (Baldissera et al., 2015a) and *Fasciola hepatica* (Baldissera et al., 2015b). In addition, oxidative stress, described in haemonchosis (Leal et al., 2010; Leal et al., 2014; Grosskopf et al., 2017), may cause inhibition of PK (Figueiredo et al., 2009; Tonin et al., 2009) and a significantly increase in MPO activity, an enzyme that forms oxidizing substances by reacting with hydrogen peroxide (Nicholls; Hazen, 2005) and promotes lipoperoxidation (Heinecke, 1999), was observed in HC group in relation to control group.

Is important highlight the existence of a reciprocal compensatory relationship between AK and PK enzymes, that contributes to an efficient intracellular energetic communication to maintain the balance between cellular ATP consumption and production in attempt to preserve the energetic homeostasis (Janssen et al., 2000). However, this compensatory mechanism between AK and PK activities was not observed in hepatic tissue of experimentally infected

lambs, that directly contribute to impairment on hepatic homeostasis. An important finding of this study is that treatment with closantel plus copper or closantel were able to prevent the inhibition on AK and PK activities. The prevention of enzyme inhibition may contribute to efficient intracellular energetic communication in order to maintain the balance between cellular ATP consumption and production.

The action mechanism that the treatments prevent the inhibition of AK and PK activities remains unknown, however may be directly associated with reduction on EPG, although the use of copper oxide isolated was unable to prevent these alterations. In addition, Kane et al. (1980) demonstrated that anthelmintic action mechanism of closantel is acting as an uncoupler of oxidative phosphorylation by increasing mitochondrial permeability, and consequently interfering in the synthesis of ATP, which demonstrates the effect of closantel on ATP metabolism.

Based on these evidences, all therapeutic protocols were able to reduce the EPG count and may be considered alternatives to treat lambs infected by *H. contortus*. The use of COWP demonstrate an anti-inflammatory potential and prevents albumin and total protein concentrations decrease. Also, is important to highlight that the use of closantel plus copper and closantel was able to prevent the inhibition on AK and PK activities during haemoncosis, which may contribute to efficient intracellular energetic communication in order to maintain the balance between cellular ATP consumption and production.

## **FUNDING SOURCES**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.



## REFERENCES

- Adams, D.B., 1993. Systemic responses to challenges infection with *Haemonchus contortus* in immune merino sheep. *Veterinary Research Communications*, v.17, p.23 -35.
- Almeida, F.A., Garcia, K.C.O.D., Torgerson, P.R., Amarante A.F.T. 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitology International* 59, 622-625.
- Anatoliotakis, N., Spyridon, D, Bouras, G., Giannopoulos, G., Tsounis, D., Angelidis, C., Kaoukis, A. Stefanadis, C. 2013. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr.Top. Med. Chem.* 13, 115-138.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Baldisserotto B. 2018. *Ichthyophthirius multifiliis* impairs splenic enzymes of the phosphoryl transfer network in naturally infected *Rhamdia quelen*: effects on energetic homeostasis. *Parasitology Research* 117, 413-418.
- Baldissera, M.D., Rech, V.C., Grings, M., Kolling, J., Da Silva, A.S., Gressler, L.T., Souza, C.F., Vaucher, R.A., Schwertz, C.I., Mendes, R.E., Leipnitz, G., Wyse, A.T.S., Stefani, L.M., Monteiro, S.G. 2015a. Relationship between pathological findings and enzymes of the energy metabolism in liver of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Parasitology International* 64, 547-552.
- Baldissera, M.D., Bottari, N.B, Mendes, R.E., Schwertz, C.I., Lucca, N.J., Dalenogare, D., Bochi, G.V., Moresco, R.N., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Rech, V.C., Jaques, J.A., Da Silva, A.S. 2015B. Activity of cholinesterases, pyruvate kinase and adenosine deaminase in rats experimentally infected by *Fasciola hepatica*: Influences of these enzymes on inflammatory response and pathological findings. *Pathology – Research and Practice* 211, 871–876.

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.

Bastos, G.A., Soares, A.C.M., Vieira, T.M., Candido, R.C.D.S., Costa, F.M., Vasconcelos, V.D.O., Oliveira, N.J.F., Duarte, E.R., 2016. Blood parameters of sheep with high infection of *Haemonchus contortus* and treated with “mushroom of the sun” (*Agaricus blazei*). *Semina: Ciências Agrárias* 37, 807-818.

Bhat, S., Mir, S., Allaie, H., Khan, I., Husain and Ali, A., 2011. Comparative Resistance of Sheep Breeds to *Haemonchus contortus* in Pasture Infection in Jammu and Kashmir. *Global Veterinary*, 8: 222–228.

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. *Veterinary Parasitology*. 139, 145-149.

Cadman, E.T., Lawrence R.A., 2010. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunol.* 32:1–19.

Chartier, C., Etter, E., Hoste, H., Pors., C., Koch, C. Dellac, B., 2000. Efficacy of Copper Oxide Needles for the Control of Nematode Parasites in Dairy Goats. *Veterinary Research Communications*, v. 24, p. 389-399.

Das, U. N. 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 13, RA214–RA221.

Dzeja, P., Terzic, A., 2009. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 1729-1772.

Dzeja, P.P., Terzic, A., 2003. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J. Exp. Biol.* 206, 2039-2047.

Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C., Terzic, A., 1999. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ. Res.* 84, 1137–1143.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95.

Figueiredo, V.C., Feksa, L.R., Wannmacher, C.M. 2009. Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cystine in rat brain cortex. *Metab. Brain Dis.* 24, 373–381.

Fox, M.T. 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology.* 72, 285-294.

Gordon, H.M.C., Whitlock, H. V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research.* Melbourne, v. 12, p. 50-62.

Grosskopf, HM et al., 2017. Supplementation with copper edetate in control of *Haemonchus contortus* of sheep, and its effect on cholinesterase's and superoxide dismutase activities. *Experimental Parasitology* 173, 34-41.

Heinecke, J. W. 1999. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. *The FASEB Journal.*

Jackson, G.E., Mkhonta-Gama, L., Voyé, A., Kelly, M. 2000. Design of copper-based anti-inflammatory drugs. *J. of Inorganic Biochemistry* 79, 147-152.

Janssen, E., Dzeja, P.P., Oerlemans, F., Simonetti, A.W., Heerschap, A., de Haan, A., Rush, P.S., Terjung, R.R., Wieringa, B., & Terzic, A. 2000. Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *Embo Journal* 19, 6371-6381.

Kane, H.J, Behm, C.A, Bryant, C. 1980. Metabolic studies on the new fasciolicidal drug, closantel. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1, 347-355.

Knox, M.R. 2002. Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Aust Vet J* Vol 80.

Lampón, N., Hermida-Cadahia, E.F., Riveiro, A., Tutor, J.C. 2012. Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Annals of hepatology* 11 (3), 356-363.

Leal, M.L.R. et al., 2014. Copper and Selenium: auxiliary measure to control infection by *Haemonchus contortus* in lambs. *Experimental Parasitology*, 144, 39-43.

Leal, M.L.R. et al., 2010. Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research Communication*, Amsterdam, 34, 549-555.

Leong, S.F., Lai, J.K.F., Lim, L., Clark, J.B., 1981. Energy-metabolism in brain regions of adult and aging rats. *J. Neurochem.* 37, 1548–1556.

Lloyd, J.B, Fitzgibbon, C.C, Barchia, I. 2000. Evaluation of a laboratory test to detect resistance to closantel in *Haemonchus contortus*. *Aust. Vet. J.* 78, 710-714.

Luoga, W., Mansur, F., Lowe, A., Duce, I.R, Buttle, D.J, Behnke, J.M. 2015. Factors affecting the anthelmintic efficacy of papaya latex in vivo: host sex and intensity of infection. *Parasitol Res.* 114, 2535-2541.

Metcalf, J., Gallin, W.N, Nauseef, R. 1986. *Root, laboratory manual of neutrophil function.* Raven Press, New York.

Muchiut, S.M, Fernández, A.S, Steffan, P.E., Riva, E., Fiel, C.A. 2018. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Veterinary Parasitology* 254, 43-48.

Nicholls, S.; Hazen, S. L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. 2005. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (6), 1102-1111.

Ofek, K., Krabbe, K.S. Evron, T., Debbeco, M., Nielsen, A.R., Brunnsaad, H., et al. 2007. Cholinergic status modulations in human volunteers under acute inflammation. *J Mol Med* 85, 1239-51.

Sanadi, R., Chelani, L., Pillai, M., Anjankar, J. 2017. Acute phase reactants- Diagnostic VS prognostic significance: An overview. *International Journal of Applied Research*, 3(2): 94-97.

Schafer, A.S., Leal, M.L.R., Molento, M.B., Aires, A.R., Duarte, M.M.M.F., Carvalho F.B., Tonin A.A., Schmidt L., Flores E.M.M., França, R.T., Grando, T.H., Minho, A.P., Krause, A., Antoniazzi, A.Q., Lopes, S.T.A. 2014. Immune response of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and parenterally treated with a combination of zinc and copper. *Small Ruminant Research*.

Schweizer, N.M., Foster, D.M., Knox, W.B., Sylvester, H.J, Anderson, K.L. 2016. Single vs. double dose of copper oxide wire particles (COWP) for treatment of anthelmintic resistance *Haemonchus contortus* in weanling lambs. *Veterinary Parasitology* 229, 68-72.

Schwartz, C.I., Carmo, G.M.D., Bottari, N.B., Silva, E.S.D., Gabriel, M.E., Lucca, N.J., Guarda, N.D.S., Moresco, R.N., Machado, G., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C.S., Stefani, L.M., Mendes, R.E. 2016. Relationship Between Pathological Findings and Cholinesterase Activity and Nitric Oxide Levels in Cattle Infected Naturally by *Eurytrema coelomaticum*. *J Comp Pathol*.

Sobrinho, A.G.C. 1996. *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: FUNEP, p. 258.

Soli, F., Terrill, T.H., Shaik, S.A., Getz, W.R., Miller, J.E., Vanguru, M. 2010. Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. *Veterinary parasitology*. 168(1), 93-96.

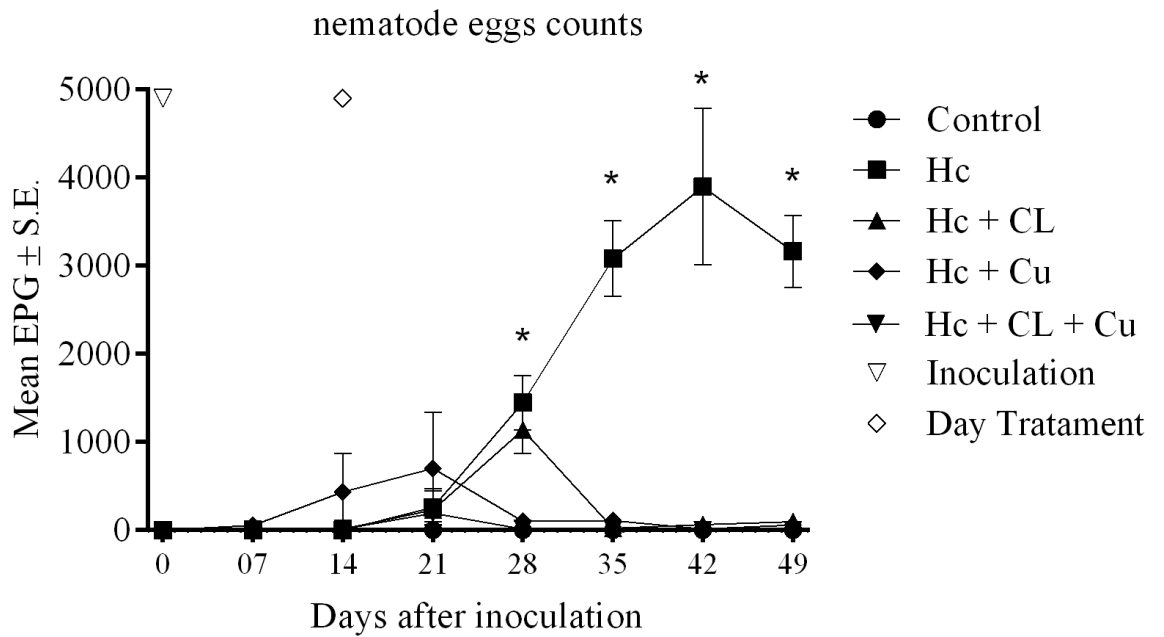
Tonin, A.M., Ferreira, G.C., Schuck, P.F., Viegas, C.M., Zanatta, A., Leipnitz, G., Seminotti, B., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M. 2009. Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex. *Metab. Brain Dis.* 24, 349–360.

Vatta, A.F., Waller, P.J., Githiori, J.B. Medley, G.F. 2009. The potential to control *Haemonchus contortus* in indigenous South African goats with copper oxide wire particles. *Veterinary Parasitology*, v. 162, p. 306-313.

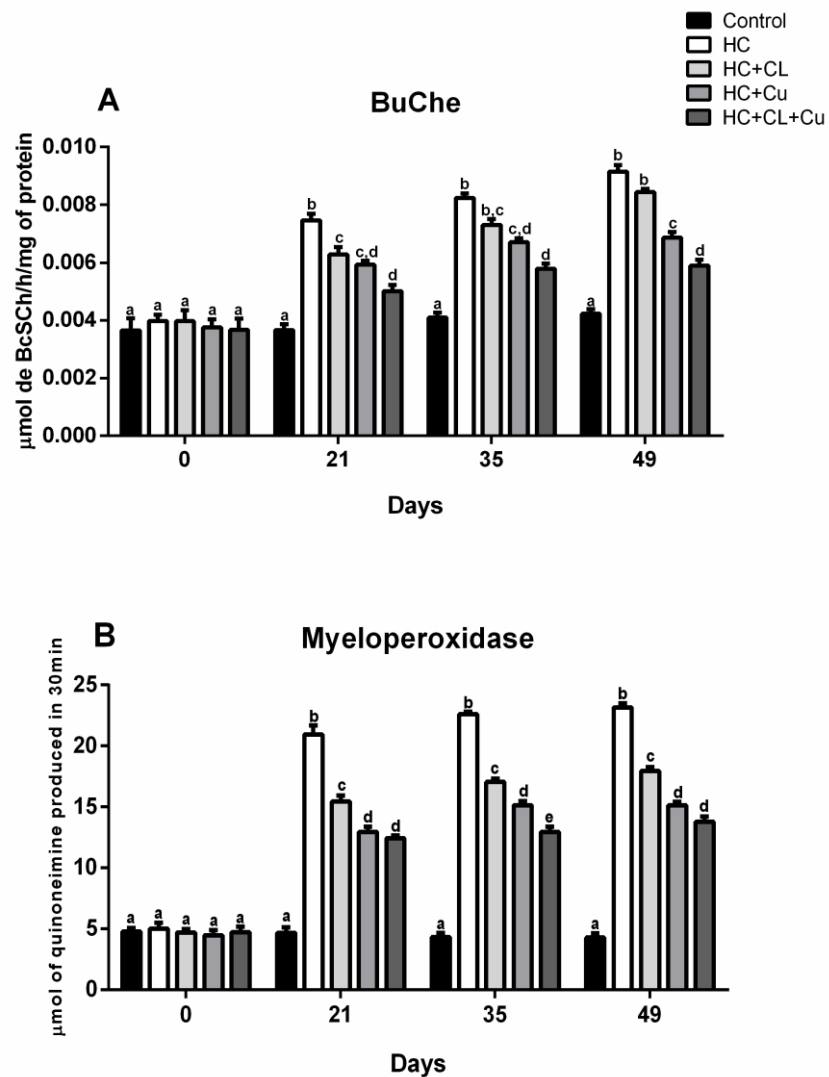
Wang, H., Chu, W., Das, S.K., Ren, Q., Hasstedt, S.J., Elbein, S.C., 2002. Liver pyruvate kinase polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Northern European Caucasians. *Diabetes* 51, 2861-2865.

Wakelin, D. 1978. Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection. *Advances in Parasitology*, Londres, v. 16, p. 219-308.

Westers, T., Jones-Bitton, A., Menzies, P., Van Leeuwen, J., Poljak, Z., Peregrine, A.S. 2016. Efficacy of closantel against ivermectin- and fenbendazole-resistant *Haemonchus* sp. in sheep in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.* 228, 30-41.

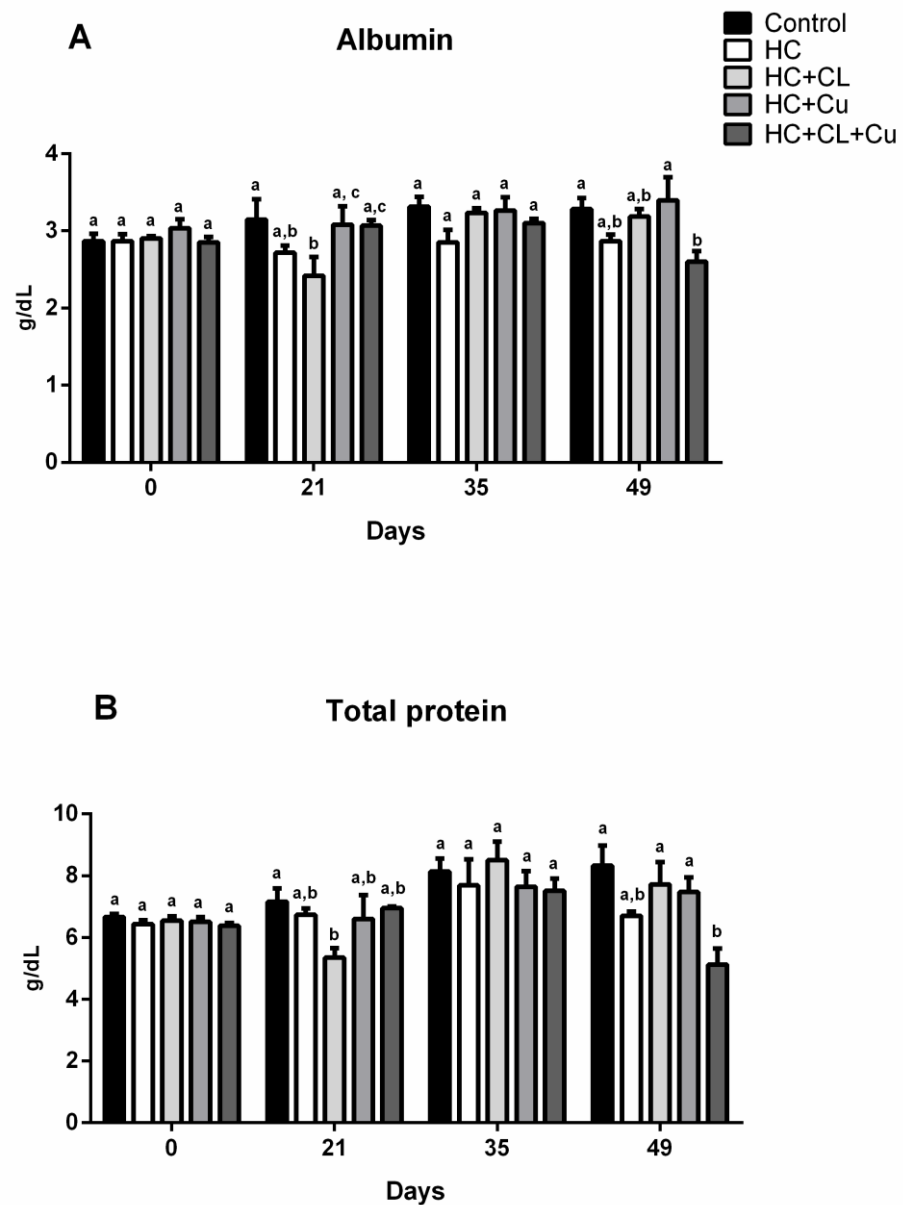


**Figure 1** – Nematode eggs count (EPG) of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. \* $p < 0.05$  (n = 06 per group).

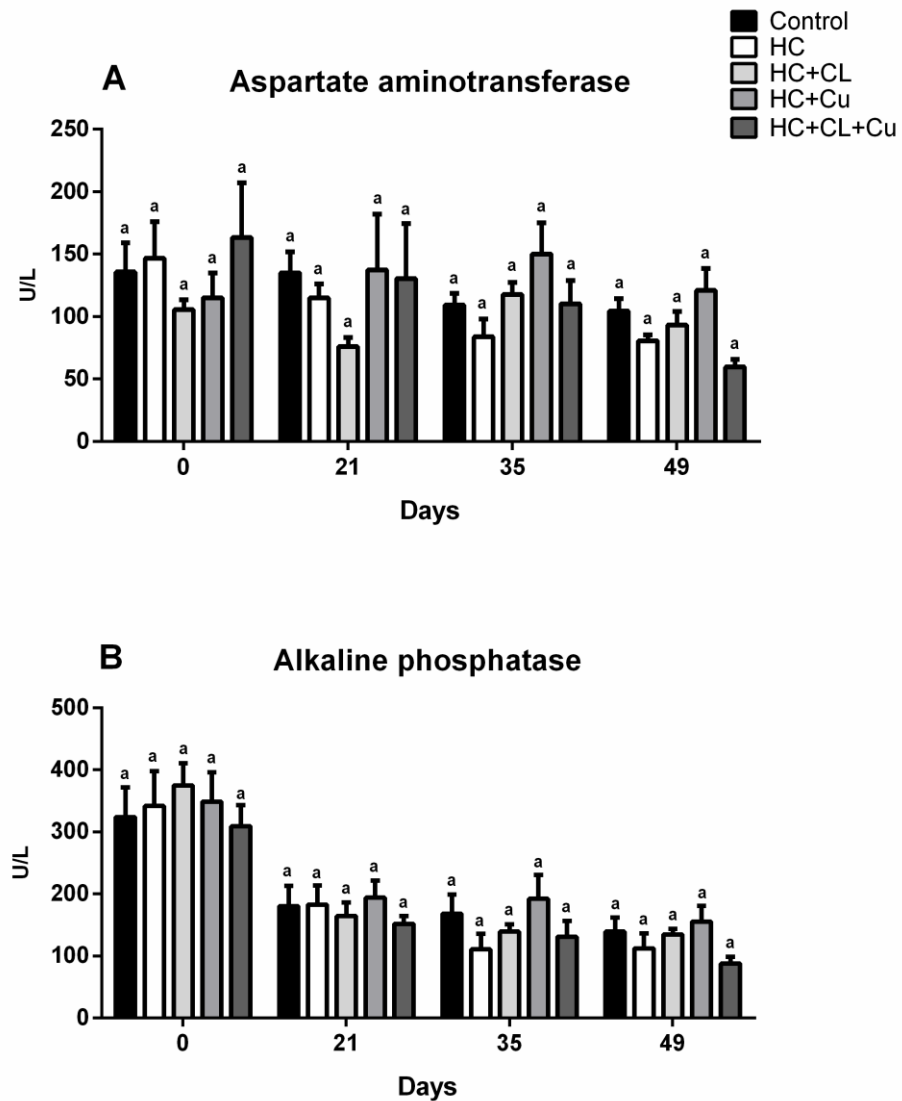


**Figure 2** – Serum butyrylcholinesterase and plasma myeloperoxidase activities of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 21, 35, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. (A) Butyrylcholinesterase - BuChE; (B) Myeloperoxidase - MPO. Different letters in the same day indicate significant difference between groups at  $p < 0.05$  ( $n = 06$  per group).





**Figure 3** – Serum albumin and total protein of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 21, 35, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. (A) Albumin; (B) Total protein. Different letters in the same day indicate significant difference between groups at  $p < 0.05$  ( $n = 06$  per group).



**Figure 4** – Serum biochemical analysis of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* at days 0, 21, 35, 49 post-infection (p.i.). Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. (A) Aspartate aminotransferase - AST; (B) Alkaline phosphatase - ALP. Different letters in the same day indicate significant difference between groups at  $p < 0.05$  ( $n = 06$  per group).

**Table 1** - Hepatic adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) activities of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*.

<b>Groups</b>	<b>AK</b>	<b>PK</b>
Control	6.16 ± 0.83 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.13 <sup>a</sup>
HC	2.93 ± 0.45 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.15 <sup>b</sup>
HC+CL	4.88 ± 0.65 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.19 <sup>a</sup>
HC+CL+Cu	5.99 ± 0.68 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.16 <sup>a</sup>
HC+Cu	2.67 ± 0.40 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.13 <sup>b</sup>

Note: PK (μmol pyruvate formed/min/mg of protein); AK (μmol ATP formed/min/mg of protein).

Control: uninfected; HC: infected with *H. contortus*; HC+CL: infected with *H. contortus* and treated with 1 ml/10 kg single dose of closantel; HC+Cu: infected with *H. contortus* and treated 2 g single dose of copper oxide wire particles; HC+CL+Cu: infected with *H. contortus* and treated and 1 ml/10 kg single dose of closantel plus 2 g single dose of copper oxide. Different letters in the same column indicate significant difference between groups at  $p < 0.05$  (n = 06 per group).

**3 CAPÍTULO II – MANUSCRITO II – CÁPSULA DE ÓXIDO DE COBRE ASSOCIADA OU NÃO AO CLOSANTEL: INCREMENTO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E ANTIOXIDANTE EM CORDEIROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Haemonchus contortus***

Artigo submetido para: *International Journal for Parasitology*

**Cápsula de óxido de cobre associada ou não ao closantel: incremento na resposta imunológica e antioxidante em cordeiros experimentalmente infectados por *Haemonchus contortus***

Andressa Salvadori Schafer<sup>a,b\*</sup>, Cassia Bagolin da Silva<sup>a,b</sup>, Juliana Sorraia de Oliveira<sup>b</sup>, Guilherme Lopes Dornelles<sup>a,b</sup>, Camila Emanuelli Benaduce<sup>a</sup>, Luana Pereira Magni<sup>b</sup>, Rafael Francisco dos Santos<sup>c</sup>, Erico Marlon de Moraes Flores<sup>c</sup>, Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos<sup>d</sup>, Rafael Costa Ebling<sup>e</sup>, Pamela Daniele Avrella<sup>d</sup>, Camila Azzolin<sup>h</sup>, Thiago Duarte<sup>f</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>f,g</sup>, Matheus D. Baldissera<sup>d</sup>, Marta Lizandra do Rego Leal<sup>h</sup>, Silvia G. Monteiro<sup>d</sup>, Cinthia M. Andrade<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Bioquímica e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Química Industrial e Alimentar, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>g</sup> Centro de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, Brazil

<sup>h</sup> Laboratório de Endocrinologia e Metabologia Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

## 28 RESUMO

29 O objetivo do presente estudo foi avaliar o estresse oxidativo, a resposta imunológica, a  
30 contagem parasitária e cobre hepático e plasmático, em ovinos experimentalmente infectados  
31 com *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) tratados com cápsulas de óxido de cobre (COWP)  
32 associados ou não ao anti-helmíntico closantel. Para isso, foram utilizados 30 ovinos da raça  
33 Corriedale divididos aleatoriamente em cinco grupos (6 animais cada), sendo: animais não  
34 infectados (Controle); animais infectados com *H. contortus* (HC); infectados e tratados com  
35 closantel (HC + CL); infectados e tratados com óxido de cobre (HC + Cu); e infectados e  
36 tratados com closantel associado ao óxido de cobre (HC + CL + Cu). Os animais dos grupos  
37 HC, HC+CL, HC+Cu e HC+Cu+CL foram infectados por via oral com *H. contortus* (5.000  
38 larvas L3) e no dia 14 pós-infecção (p.i) os tratamentos foram iniciados. Os animais infectados  
39 com *H. contortus* tiveram redução nos níveis de GSH, PSH e nas atividades da CAT e da SOD  
40 em soro e tecidos quando comparados aos animais do grupo controle. O tratamento com COWP  
41 foi capaz de reverter essa alteração e elevar significativamente os parâmetros antioxidantes. Os  
42 tratamentos foram capazes de reduzir os níveis de TBARS tanto no soro quanto em tecidos. Os  
43 ovinos suplementados com cobre apresentaram maiores níveis de IgG e IgE em comparação  
44 aos demais grupos, o que representa um incremento na resposta imune para combater a  
45 infecção. Os níveis plasmáticos de cobre encontravam-se dentro dos valores fisiológicos e os  
46 animais não apresentaram nenhuma alteração laboratorial relacionada à intoxicação por cobre.  
47 Salienta-se que todos os tratamentos demonstraram efeito anti-helmíntico reduzindo a  
48 contagem parasitária nos animais infectados e tratados. Assim, a suplementação com COWP  
49 proporcionou uma ação antioxidante e incremento da resposta imune nos cordeiros com  
50 hemoncose, e associadas ao anti-helmíntico closantel são uma alternativa para ovinos  
51 infectados com *H. contortus* tendo em vista que ocorreu um excelente sinergismo do produto  
52 comercial ao mineral acarretando redução de 100% na contagem parasitária dos ovinos

53 **Palavras-chave:** Ovinos, COWP, estresse oxidativo, imunoglobulinas, cobre hepático

## 54 1. INTRODUÇÃO

55 *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) representa o principal nematódeo gastrointestinal  
56 que acomete rebanhos ovinos em todo o mundo, especialmente em regiões quentes e úmidas  
57 (CRAIG, 2009). Este parasito do abomaso é essencialmente hematófago, ou seja, durante a sua  
58 vida parasitária, alimenta-se de sangue do hospedeiro e, como consequência, os animais  
59 portadores de carga parasitária elevada podem apresentar anemia e hipoproteïnemia acentuada  
60 além de elevada taxa de mortalidade (Amarante, 2001).

61 Após o parasito se alojar na mucosa do hospedeiro, é desencadeado um processo  
62 inflamatório local, o qual desempenha um importante papel no mecanismo efetivo inicial no  
63 controle da carga parasitária e nos fenômenos de auto cura (Wakelin, 1978). O processo  
64 inflamatório mobiliza macrófagos e neutrófilos (Anthony et al., 2007), o qual produz espécies  
65 reativas de oxigênio (ERO) que causam danos a células e consequente morte do parasito  
66 (Rinaldi et al., 2007). As ERO não tem ação específica contra patógenos e dependendo dos  
67 níveis de produção, podem gerar lesões em células adjacentes àquela infectada, como por  
68 exemplo, lesões na mucosa do abomaso de cordeiros infectados por *H. contortus* (Machado et  
69 al., 2014), que pode levar a redução da capacidade do hospedeiro em suportar a infecção  
70 (Rosenfeldt et al., 2013). Para combater ou minimizar a ação das ERO existe o sistema  
71 antioxidante enzimático e não enzimático, composto principalmente pela superóxido dismutase,  
72 catalase, tióis não-proteicos e glutatona (Rosenfeldt et al., 2013).

73 Além disso, como parte do processo inflamatório, ocorre a produção de  
74 imunoglobulinas, que é essencial no controle da carga parasitária. Isso é relatado na reação de  
75 auto cura em ovinos infectados com nematódeos gastrointestinais, particularmente o *H.*  
76 *contortus*. Enquanto embebidos na mucosa intestinal e abomasal, esses parasitos secretam  
77 antígenos e a combinação desses antígenos com as imunoglobulinas ligadas a mastócitos,  
78 desencadeiam degranulação e liberação de moléculas vasoativas e proteases. Essas moléculas

79 estimulam a contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular fazendo com  
80 que o parasito se desprenda da mucosa (Tizard, 2013).

81 A resistência parasitária constitui o principal problema sanitário que desafia a indústria  
82 ovinícola, sendo empecilho ao controle eficiente das helmintoses gastrintestinais (Amarilho-  
83 Silveira, 2015). O *H. contortus* demonstra uma notável propensão para o desenvolvimento da  
84 resistência a todos os medicamentos utilizados em seu controle (Gilleard, 2013). Assim, estudos  
85 vêm sendo realizados visando o desenvolvimento de alternativas para reduzir o uso de anti-  
86 helmínticos no controle da gastroenterite parasitária, como o emprego de minerais (Gonçalves,  
87 2004; Leal et al., 2010; Leal et al., 2014; Pivoto et al., 2015; Grosskopf et al., 2017). Tem sido  
88 relatada também a utilização de microminerais como o selênio que apresenta ação na redução  
89 do estresse oxidativo causado por *H. contortus*. Além disso, o cobre administrado por via  
90 subcutânea (3,5 mg/kg peso vivo) aumenta o ganho de peso de animais infectados em relação  
91 aos não suplementados (Leal et al., 2010; Leal et al., 2014). Adicionalmente, este mineral tem  
92 ação na resposta imune de cordeiros infectados por *H. contortus*, quando utilizado em  
93 associação ao zinco (Schafer et al., 2014), e ainda, quando administrado por via oral tem ação  
94 direta no controle do *H. contortus* (Galindo-Barboza et al., 2011; Soli et al., 2010).

95 A cápsula com partículas de óxido de cobre (COWP) inicialmente foi desenvolvida para  
96 superar a deficiência de cobre em ruminantes em pastagens. Essas cápsulas, após serem  
97 administradas por via oral, passam pelo rúmen e se aderem à mucosa do abomaso liberando  
98 partículas e elevando o cobre solúvel. A COWP é mantida por, no mínimo, 32 dias no abomaso,  
99 as partículas de cobre liberadas são absorvidas a partir do trato intestinal e armazenadas no  
100 fígado (Chartier et al., 2000). Pesquisas vêm sendo realizadas para verificar o efeito profilático  
101 do COWP na prevenção do estabelecimento de larvas infectantes de *H. contortus*, porém, a  
102 eficácia dos tratamentos tem demonstrado resultados variados (Knox, 2002; Chartier et al.,  
103 2000; Burke, 2004).

104           Nesse contexto, este estudo busca investigar se a cápsula de liberação lenta de óxido de  
105 cobre *per se* é capaz de reduzir a infecção parasitária e, ainda, se agindo sinergicamente é capaz  
106 de melhorar a atividade antiparasitária do closantel, visto que pesquisas vêm demonstrando que  
107 minerais reduzem os ovos por grama de fezes e contagem de parasitos adultos no abomaso,  
108 porém, não obtendo sucesso total. Em adição, busca-se verificar se o tratamento interfere com  
109 a modulação da resposta imune e inflamatória, e dos marcadores de estresse oxidativo em  
110 ovinos infectados experimentalmente com *H. contortus*.

111

## 112 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### 113 *2.1. Desenho experimental*

114           Trinta cordeiros machos da raça *Corriedale*, com aproximadamente oito meses de idade  
115 e com peso médio de 30 kg foram alocados em baias coletivas. Os animais foram submetidos a  
116 um período de adaptação ambiental e alimentar de trinta dias, no qual receberam anti-helmíntico  
117 (2ml de monepantel, 2ml de albendazol e 4ml de fortgal - sulfadoxina, trimetoprim e piroxicam)  
118 para que fosse zerada a carga parasitária antes do início do experimento. Após, os animais foram  
119 distribuídos em cinco grupos com seis animais cada, utilizando-se como critério a média de  
120 peso. Os grupos foram separados em: Controle – cordeiros não infectados; HC – cordeiros  
121 infectados com *H. contortus*; HC+CL – infectados com *H. contortus* e tratados com anti-  
122 helmíntico closantel; HC+Cu – infectados com *H. contortus* e tratados com partículas de óxido  
123 de cobre; e HC+CL+Cu – infectados com *H. contortus* e tratados com closantel e partículas de  
124 óxido de cobre. Cada grupo foi mantido em uma baia, sendo o grupo Controle mantido isolado  
125 dos demais grupos. Todos os cordeiros foram certificados como negativos para parasitas através  
126 do exame parasitológico de fezes (OPG) antes da realização da infecção experimental.

127           O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais  
128 (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria, número de registro 3748011116.



129

130 *2.2. Infecção experimental*

131 A infecção foi realizada com suspensão salina contendo 5.000 larvas infectantes (L3)  
132 de *H. contortus* administradas por via oral. As larvas de *H. contortus* foram obtidas por  
133 coprocultura, através do método descrito por O'Sullivan e Roberts (1950), de fezes coletadas  
134 de ovinos doadores infectados com *H. contortus* alocados na Embrapa pecuária em Bagé/ RS.  
135 O dia da infecção experimental foi considerado como dia 0 (D0).

136

137 *2.3. Dieta*

138 Cada animal recebeu por dia 1.800kg de feno de azevém, 250g de ração da marca Puro  
139 Trato® com 14% de proteína bruta, 240g de farelo de soja e 12g de calcário calcítico. A dieta  
140 foi dividida e ofertada duas vezes ao dia, as 07h30min e 18h00min.

141

142 *2.4. Tratamentos*

143 Aos 14 dias pós-infecção (p.i), foi fornecido aos cordeiros os tratamentos de acordo com  
144 cada grupo experimental, em uma única dose. As cápsulas de óxido de cobre 2g (Copasure®)  
145 foram administradas aos grupos HC+Cu e HC+CL+Cu e 1mL/Kg do anti-helmíntico closantel  
146 (Diantel®) foi administrado aos grupos HC+CL e HC+CL+Cu.

147

148 *2.5. Coleta de amostras*

149 Nos dias 0, 21, 35 e 49 p.i, amostras de sangue foram coletadas da veia jugular dos  
150 ovinos através do sistema *vacutainer* e armazenadas em tubos com anticoagulante (EDTA) e  
151 sem anticoagulante. Para obtenção de soro, o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 15 rpm,  
152 após, o soro foi dividido em três tubos de propileno e armazenados à -80°C, para posterior  
153 análises. Nos mesmos períodos experimentais, foram coletadas amostras fecais (diretamente da

154 ampola retal) para realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), pelo método de  
155 McMaster (Coles et al., 2006). Após a última coleta e de acordo com as normas de  
156 experimentação animal (CFMV, 2012), os animais foram encaminhados ao frigorífico para  
157 abate e coleta do abomaso, fígado e rins. Fragmentos desses órgãos foram utilizados para  
158 realização de diferentes análises, assim os procedimentos amostrais utilizados estão descritos  
159 em cada item a seguir. Ainda, para monitorar quantitativamente a carga parasitária, o conteúdo  
160 abomasal foi transferido para recipientes graduados, 10% do conteúdo foi preservado em  
161 solução de Railliet-Henry para contagem de nematoides (Ueno e Gonçalves, 1998).

162

## 163 2.6. Parâmetros avaliados

### 164 2.6.1. Determinação de cobre no fígado

165 As amostras de fígado foram pesadas individualmente e transferidas para tubos de vidro  
166 contendo 6ml de uma mistura de água régia invertida para a digestão do tecido (3:1 HNO<sub>3</sub>:HCl),  
167 estes foram cobertos com tampas plásticas para reduzir a evaporação da mistura ácida durante  
168 a etapa de aquecimento. Os frascos foram aquecidos durante 1h a 120°C para que a mistura  
169 ácida oxidasse a parte orgânica das amostras e os analitos fossem solubilizados. Os digeridos  
170 foram diluídos a 25ml e armazenados em frascos de polipropileno até a determinação de cobre  
171 (Cu) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS -*Flame Atomic Absorption*  
172 *Spectrometry*).

173 Para a determinação das amostras pela técnica de FAAS, foi preparada uma curva de  
174 calibração em meio ácido. Assim, para cada frasco de polipropileno foi preparado 6ml de água  
175 régia invertida e diluído a 25ml, de forma a simular a mesma condição da amostra. Padrões de  
176 concentração de 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,5mg/L foram preparados para a calibração do  
177 espectrômetro. As determinações foram feitas utilizando-se o comprimento de onda 324,7nm.  
178 Devida a alta concentração de Cu nas amostras, estas foram diluídas pelo menos 2 vezes antes

179 da determinação. Este fator de diluição foi levado em consideração para os cálculos de  
180 concentração. Para obtenção dos limites de detecção foram feitas determinações de 17 brancos  
181 (solução ácida submetida às mesmas etapas as quais as amostras passaram) sendo considerado  
182 a concentração média determinada (mg/g) e o desvio padrão ( $LOD = 3*SD + \text{valor de branco}$ ).  
183 Todas as amostras de fígado puderam ser quantificadas pela técnica de FAAS e foram  
184 analisadas em duplicata.

185

### 186 2.6.2. Determinação de cobre no plasma

187 As amostras foram pipetadas (200µl) individualmente e transferidas para tubos de vidro  
188 contendo 6ml de uma mistura de ácido nítrico destilado para a digestão (14,4mol/L). Os frascos  
189 foram cobertos com tampas plásticas para reduzir a evaporação da mistura ácida durante a etapa  
190 de aquecimento (1h a 120°C). Os digeridos foram diluídos a 25ml e armazenados em frascos  
191 de polipropileno até a determinação de Cu por espectrometria de emissão óptica com plasma  
192 indutivamente acoplado (ICP-OES-*Inductively Coupled Plasma Optical Emission*).

193 Para a determinação das amostras pela técnica de ICP-OES, foi preparada uma curva de  
194 calibração em meio de ácido nítrico 5%. Padrões de concentração de 1; 2,5; 5; 10; 20; 40; 60;  
195 80 e 100µg/L foram preparados para a calibração do espectrômetro. As determinações foram  
196 feitas utilizando-se o comprimento de onda 324,7nm. Apesar da baixa concentração de Cu nas  
197 amostras (na ordem de µg/g) de plasma sanguíneo, estas foram diluídas pelo menos 4 vezes  
198 antes da determinação, para evitar interferência de matriz por ICP-OES. Este fator de diluição  
199 foi levado em consideração para os cálculos de concentração. Todas as amostras foram  
200 analisadas em duplicata.

201

### 202 2.6.3. Catalase em fígado, rins e abomaso

203 Para o ensaio da atividade da catalase (CAT), frações de fígado, rins e abomaso foram  
204 homogeneizados, separadamente, em tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,5. O  
205 homogenato foi centrifugado a 2000g durante 10min para se obter um sobrenadante, o qual foi  
206 utilizado para o ensaio de enzima. A atividade de CAT foi mensurada utilizando-se o método  
207 de Nelson e Kiesow (1972). A mistura de reação conteve tampão de 50mM de fosfato de  
208 potássio (pH 7,4), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10mM e 20μl de amostra de sobrenadante do homogeneizado. A taxa  
209 de reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorada a 240nm durante 2min à temperatura ambiente. A atividade  
210 enzimática foi expressa em pmol/mg proteína/minuto.

211

#### 212 2.6.4. *Tióis totais e Glutathiona em soro, fígado, rins e abomaso*

213 O total de grupos tíois (PSH) foi analisado espectrofotometricamente através do método  
214 de Ellman e Boyne (1972), com algumas modificações. Utilizou-se uma alíquota de 200μl de  
215 soro ou de 100μl de homogenato (S1) das estruturas de fígado, rins ou abomaso em um volume  
216 final de 900μl de solução. A reação foi mensurada a 412nm após a adição de 10mM de DTNB  
217 (0,05ml). Uma curva padrão usando cisteína foi adicionada para calcular o teor de grupos tíois  
218 em amostras e os valores foram expressos como μmol SH/ml de proteína.

219 Para a determinação de tíois não-proteicos (glutathiona - GSH) foi realizada uma  
220 avaliação em espectro utilizando o método de Ellman (1959). As amostras de soro, ou de S1  
221 das estruturas de fígado, rins ou abomaso foram misturadas (1:1) com 10% de ácido  
222 tricloroacético (TCA) e centrifugadas a 4000g durante 10 min. Após a centrifugação, o  
223 sedimento de proteína foi descartado e os grupos NPSH livres foram determinados no  
224 sobrenadante. As amostras foram adicionadas em um sistema contendo tampão de fosfato de  
225 potássio 1M, pH 7,4, e 5,5mM-10 ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). O produto da  
226 reação foi mensurado a 412nm. Uma curva padrão utilizando GSH foi adicionada para calcular

227 o teor de grupos tióis não-proteicos em amostras e os valores foram expressos como nmol de  
228 GSH/ml.

229

#### 230 2.6.5. *Superóxido dismutase em fígado, rins e abomaso*

231 A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com McCord e  
232 Fridovich (1969), com modificações. O ensaio foi realizado em um volume total de 1ml  
233 contendo 50mmol de tampão de glicina (pH 10), 60mmol de epinefrina e amostras de  
234 sobrenadante das estruturas de fígado, rins ou abomaso previamente homogeneizadas em  
235 tampão fosfato e centrifugadas. A epinefrina foi adicionada e a formação de adrenocromo  
236 registada a 480nm com um espectrofotômetro de ultravioleta-visível (UV-VIS), durante 4 min.  
237 Uma unidade de atividade de SOD foi equivalente à quantidade de enzima requerida para inibir  
238 a oxidação em 50% de epinefrina sob as condições experimentais. Os resultados foram  
239 apresentados em SOD IU/mg de proteína.

240

#### 241 2.6.6. *TBARS em soro, fígado, rins e abomaso*

242 Os níveis de TBARS em soro foram determinados de acordo com Jentzsch et al. (1996)  
243 através da medição da concentração de malondialdeído (MDA) como um produto da  
244 peroxidação lipídica pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, a mistura  
245 de reação, contendo 200µl de soro ou de padrão (0,03mM MDA), 1ml de ácido ortofosfórico  
246 0,2M e 250µl ácido tiobarbitúrico (0,1M) foi aquecida a 95°C durante 45 min. A absorvância  
247 foi medida a 532nm. Os níveis séricos de TBARS foram expressos em nmoles de MDA/mg de  
248 proteína. Para a avaliação dos níveis de TBARS em amostras de homogenatos de fígado, rins e  
249 abomaso utilizou-se o método de Ohkawa et al. (1979) com modificações. Resumidamente, a  
250 mistura reacional, contendo 200µl de sobrenadantes das estruturas ou padrão (0,03 mMMDA),  
251 200µl de 8,1% de sódio dodecil sulfato (SDS), 500µl de 0,8% TBA e 500µl de solução de ácido

252 acético (2,5M HCl, pH 3,4), foi aquecida a 95°C durante 120min. A absorbância foi medida a  
253 532nm. Os níveis de TBARS nos tecidos foram expressos em nmol MDA/mg de proteína.

254

#### 255 2.6.7. *Imunoglobulinas (IgE e IgG)*

256 As concentrações de IgG e IGE nas amostras de soro foram determinadas com o método  
257 ELISA usando os kits de Bethyl Laboratories.

258

#### 259 2.7. *Análise estatística*

260 A análise estatística foi realizada utilizando uma análise de variância de duas vias  
261 (ANOVA) para amostras independentes, seguido por análise *post hoc* de Tukey. A significância  
262 foi estabelecida em  $p < 0,05$  e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

263

### 264 3. RESULTADOS

#### 265 3.1 *Infecção experimental e OPG*

266 A utilização de 5.000 larvas de *H. contortus* foi capaz de estabelecer uma infecção  
267 branda nos animais, mimetizando uma infecção natural adquirida em uma pastagem com baixa  
268 infestação parasitária. A infecção deste estudo pode ser confirmada através da contagem de  
269 ovos por gramas de fezes (OPG), conforme Tabela 1.

270 Observa-se que o grupo controle manteve-se livre de infecção durante todo o período  
271 experimental, já todos os animais do grupo HC eliminaram ovos do parasita nas fezes sendo  
272 que no dia 21 p.i. obteve-se uma média de 1.445,8 OPG ( $\pm 745,2$ ), no dia 35 p.i. a média foi de  
273 3.400 OPG ( $\pm 1.075,1$ ) e no dia 49 p.i. a média foi 3.162,5 OPG ( $\pm 995,5$ ), Tabela 1.

274 Com relação aos grupos tratados observa-se que no grupo HC+CL ocorreu uma redução  
275 na média do OPG de 21% quando comparado ao grupo HC no dia 21 p.i., de 98% aos 35 p.i.  
276 e de 97% no dia 49 p.i. O grupo HC+Cu aos 21 dias apresentou redução de 93% na OPG

277 comparado ao grupo HC, sendo que um animal já apresentava OPG negativo, aos 35 dias  
278 ocorreu redução de 100% do OPG e quatro animais apresentaram-se negativos, já no dia 49  
279 ocorreu redução de 98% do OPG e três animais negativos. Quando foi utilizado o anti-  
280 helmíntico em associação ao cobre (HC+CL+Cu) observou-se que aos 21 dias apenas dois  
281 animais apresentaram ovos do parasita nas fezes, com de 99% na OPG comparado ao grupo  
282 HC, nos dias 35 e 49 todos os animais do grupo apresentaram OPG negativo, Tabela 1.

283 Ao final do experimento foi realizado o abate dos cordeiros e coletado o abomaso para  
284 realização da contagem parasitária de *H. contortus* adultos (Tabela 2), para confirmar o sucesso  
285 da infecção e o OPG. Observou-se que os animais do grupo controle não apresentaram o  
286 parasita no abomaso, já os animais infectados e não tratados (HC) apresentaram a maior carga  
287 parasitária abomasal ( $154,20 \pm 41,29$ ). O tratamento com closantel associado ao cobre  
288 (HC+CL+Cu) foi capaz de zerar a carga parasitária dos cordeiros. Comparando-se o tratamento  
289 somente com closantel ( $3,40 \pm 3,21$ ) e o tratamento somente com cobre ( $11,2 \pm 11,25$ ), observou-  
290 se que o closantel foi mais eficaz em reduzir a contagem parasitária no abomaso dos cordeiros,  
291 conforme Tabela 2.

292

### 293 3.2 Determinação de cobre no plasma e fígado

294 Os valores obtidos para o cobre plasmático (Tabela 3) foram em média de 0,74 a 1,41  
295  $\mu\text{g/g}$ , não houve diferença significativa entre os tratamentos. Com relação a concentração de  
296 cobre no fígado (Figura 1), os animais que receberam cobre (HC+Cu e HC+CL+Cu)  
297 apresentaram maiores níveis de cobre no fígado em relação aos demais grupos.

298

### 299 3.3 Antioxidantes em fígado, rins e abomaso

#### 300 3.3.1 Abomaso

301 Observou-se uma diminuição na atividade da CAT e SOD e dos níveis de GSH e PSH  
302 no grupo HC em relação ao controle. Comparando-se o grupo HC com os grupos que receberam  
303 tratamento observa-se um aumento na atividade enzimática e nos níveis de antioxidantes.  
304 Salienta-se que os animais que receberam cobre (HC+Cu e HC+CL+Cu) apresentaram um  
305 aumento na atividade da CAT e nos níveis de GSH em relação aos tratados apenas com closantel  
306 (HC+CL). Para a atividade da SOD e os níveis de PSH, observa-se que o tratamento com cobre  
307 (HC+Cu) incrementou esses antioxidantes em comparação ao grupo HC+CL, porém não houve  
308 diferença significativa. Ainda, os níveis de PSH foram maiores no grupo HC+CL+Cu  
309 comparado ao grupo HC+Cu. Conforme Figura 2.

310

### 311 3.3.2 Fígado

312 A infecção por *H. contortus* (grupo HC) levou a diminuição na atividade da CAT e da  
313 SOD e nos níveis de GSH e PSH. No grupo HC+CL não houve diferença significativa na  
314 atividade da CAT e nos níveis de GSH em relação ao HC, porém observou-se aumento nos  
315 níveis de PSH e na atividade da SOD. Já nos grupos que receberam partículas de óxido de cobre  
316 (HC+Cu e HC+CL+Cu) ocorreu um aumento na atividade enzimática e dos níveis dos  
317 antioxidantes avaliados em relação ao grupo HC. Comparando-se os diferentes tratamentos  
318 observa-se que os animais que receberam cobre (HC+Cu e HC+CL+Cu) apresentaram  
319 incremento de CAT e GSH em relação aos tratados somente com closantel (HC+CL) conforme  
320 Figura 3.

321

### 322 3.3.3 Rins

323 O grupo HC apresentou uma redução na atividade da CAT e da SOD, bem como nos  
324 nos níveis de GSH e de PSH quando comparado ao controle. O tratamento com closantel  
325 (HC+CL) foi capaz de aumentar a atividade de SOD e os níveis de PSH quando comparado ao



326 grupo HC, no entanto para a atividade da CAT e níveis de GSH não foram observadas  
327 diferenças significativas. O tratamento com cobre (HC+Cu) e o tratamento com closantel  
328 associado ao cobre (HC+CL+Cu) aumentou a atividade enzimática e os níveis de todos os  
329 antioxidantes avaliados em comparação ao grupo HC, conforme Figura 4.

330

### 331 *3.4 TBARS em fígado, rins e abomaso*

332 Nos órgãos avaliados neste estudo, os níveis das substâncias reativas ao ácido  
333 tiobarbitúrico (TBARS), um marcador da peroxidação lipídica se comportaram de maneira  
334 similar, sendo maiores para o grupo HC em relação ao controle. Tanto o tratamento com  
335 closantel (HC+CL), quanto tratamento com cobre (HC+Cu) e a associação dos dois compostos  
336 (HC+CL+Cu) foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica comparada aos animais não  
337 tratados (HC). No abomaso e rins, observou-se que o uso do cobre (HC+Cu e HC+CL+Cu)  
338 reduziu os níveis de TBARS quando comparado ao grupo que recebeu somente closantel  
339 (HC+CL). Não houve diferença entre os tratamentos para os níveis de TBARS no fígado,  
340 conforme Figura 5.

341

### 342 *3.5 TBARS, PSH e GSH em soro*

343 Nos dias 21, 35 e 49 p.i. ocorreu aumento nos níveis de TBARS no grupo HC comparado  
344 ao controle e os tratamentos (HC+CL; HC+Cu; HC+CL+Cu) foram capazes de reduzir a  
345 peroxidação lipídica em relação ao HC, com exceção do grupo HC+CL aos 21 e 35 dias p.i.  
346 (Figura 6).

347 No dia 21, 35 e 49 p.i. os animais do grupo HC apresentaram menores níveis de GSH e  
348 PSH em relação ao controle. O tratamento com closantel não foi capaz de reverter essa  
349 diminuição, com exceção do dia 35 em que os níveis de GSH foram maiores no grupo HC+CL  
350 comparado ao HC. Já, os animais que receberam cobre (HC+Cu e HC+CL+Cu) apresentaram

351 aumento nos níveis desses antioxidantes comparados ao grupo infectado (HC), porém o  
352 tratamento somente com cobre (HC+Cu) não diferiu do grupo HC para os níveis de PSH aos  
353 21 dias p.i. Comparando-se os tratamentos, observa-se que o uso do cobre (HC+Cu e  
354 HC+CL+Cu) incrementou os níveis de GSH e de PSH em relação ao grupo tratado somente  
355 com closantel (HC+CL), com exceção dos níveis de PSH no grupo HC+Cu aos 21 dias p.i.  
356 conforme Figura 6.

357

### 358 3.6 IgG e IgE

359 No dia 21, 35 e 49 p.i. observou-se um aumento nos níveis de IgG e IgE em todos os  
360 grupos infectados (HC; HC+CL; HC+Cu e HC+CL+Cu) quando comparados ao grupo  
361 controle. Foi observado que nos animais que receberam a associação dos tratamentos  
362 (HC+CL+Cu) os níveis de IgG e IgE estavam aumentados quando comparado os grupos HC,  
363 HC+CL e HC+Cu, com exceção dos níveis de IgG aos 21 dias p.i. no grupo HC+Cu em que  
364 não se observou diferença significativa (Figura 7).

365 Os níveis de IgG, aos 35 e 49 dias p.i., foram maiores no grupo HC+Cu em relação aos  
366 grupos HC e HC+CL. Já os níveis de IgE foram maiores no grupo HC+Cu aos 21, 35 e 49 dias  
367 p.i. quando comparado ao grupo HC e aos 49 dias p.i. quando comparado ao HC+CL.

368 Os animais tratados somente com closantel (HC+CL) apresentaram maiores níveis de  
369 IgG, se comparados ao grupo HC, somente aos 49 dias p.i. Não foi observada diferença entre  
370 os grupos HC+CL e HC para IgE (Figura 7).

371

## 372 4. DISCUSSÃO

373 Esse trabalho demonstra, pela primeira vez, o incremento na resposta imunológica e  
374 antioxidante de cordeiros infectados com *H. contortus* e tratados com COWP em associação ao  
375 closantel. Os resultados do presente estudo demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo

376 durante a infecção por *H. contortus*, uma vez que todos os animais experimentalmente  
377 infectados apresentaram um aumento nos níveis de TBARS, um marcador de peroxidação  
378 lipídica, em relação aos animais não infectados. Esta alteração foi observada tanto em nível  
379 sistêmico (soro) quanto nos órgãos analisados. Em adição, a infecção por *H. contortus* diminuiu  
380 os níveis de GSH e PSH séricas e nos órgãos avaliados, bem como a atividade da SOD e da  
381 CAT em fígado, rins e abomaso quando comparado aos animais não infectados. Ainda, salienta-  
382 se que todos tratamentos foram capazes de reduzir os níveis de TBARS e incrementar a  
383 capacidade antioxidante dos animais quando comparado ao grupo infectado e não tratado,  
384 obtendo-se melhores resultados para aqueles suplementados com cobre (HC+Cu e  
385 HC+CL+Cu).

386       Maiores valores de OPG nos dias 21, 35 e 49 p.i. em comparação com o dia 0, no grupo  
387 HC, indicam a eficácia da infecção experimental. Com relação aos diferentes tratamentos,  
388 observou-se que os grupos tratados com cobre e com closantel associado ao cobre apresentaram  
389 uma maior porcentagem de redução do OPG nos dias avaliados se comparados aos animais  
390 tratados somente com closantel. Assim, além dos efeitos benéficos do uso de cobre sobre o  
391 estresse oxidativo, a suplementação mineral ajuda a reduzir OPG, como já relatado por outros  
392 pesquisadores (Fausto, 2014; Leal et al., 2014; Makey, 2018). Com relação a contagem de *H.*  
393 *contortus*, no abomaso observou-se que o tratamento com closantel associado ao cobre foi capaz  
394 de eliminar os parasitos do abomaso, já o tratamento somente com cobre apresentou média de  
395 parasitos ( $11,2 \pm 11,25$ ) superior ao tratamento somente com closantel ( $3,4 \pm 3,21$ ), porém todos  
396 os tratamentos foram eficazes quando comparados aos animais não tratados ( $154,2 \pm 41,29$ ).  
397 Esses resultados também demonstraram a efetividade do uso das cápsulas de cobre, uma vez que  
398 outros estudos utilizando diferentes formas de aplicação do cobre e suplementação com  
399 diferentes minerais não obtiveram redução da carga parasitária (Nicolodi et al., 2010; Leal et  
400 al., 2010; Rocha et al., 2012; Schafer et al., 2014; Pivoto et al., 2015; Grosskopf et al., 2017).

401 A ocorrência de estresse oxidativo em cordeiros com hemoncose já foi relatada,  
402 podendo levar ao aumento dos níveis de TBARS (Leal et al., 2010; Nicolodi et al., 2010; Rocha  
403 et al., 2012; Leal et al., 2014; Grosskopf et al., 2017), espécies reativas de oxigênio (ERO)  
404 (LEAL et al., 2010), produtos da oxidação avançada de proteínas (AOPP) e atividade  
405 antioxidante total do plasma (FRAP) (Machado et al., 2014). Em adição, outros estudos também  
406 observaram um aumento no índice de estresse oxidativo (OSI) (Pivoto et al., 2015), uma  
407 diminuição nitrito/ nitrato (NOx) (Machado et al., 2014), bem como da glutathiona peroxidase  
408 (GPx) (Leal et al., 2010; Nicolodi et al., 2010).

409 No presente estudo, observou-se aumento da peroxidação lipídica nos ovinos infectados,  
410 essa alteração tem sido comumente relatada associada à hemoncose (Leal et al., 2010; Nicolodi  
411 et al., 2010; Rocha et al., 2012; Leal et al., 2014; Grosskopf et al., 2017). Além dos danos  
412 causados diretamente pela doença parasitária, o organismo desenvolve um mecanismo de  
413 defesa em que ocorre influxo local de eosinófilos, monócitos, macrófagos e neutrófilos  
414 (Corrigan e Kay, 1992; Behnke et al., 2003; Kemp et al., 2009). As células fagocíticas são o  
415 principal mecanismo de defesa do organismo contra infecção por *H. contortus* (Colasanti, et  
416 al., 2000; Djordjevic, 2004). Quando ativadas essas células produzem ERO que causam danos  
417 a membrana lipídica, proteínas e ácidos nucleicos do parasito (Kotze, 2003). No entanto, apesar  
418 de desestabilizar e causar morte do parasito, o excesso de espécies reativas pode causar danos  
419 teciduais e gerar estresse oxidativo. O dano causado pelas ERO as membranas celulares  
420 caracterizam o processo de peroxidação lipídica, podendo ocorrer morte celular (Bagnal e  
421 Kotze, 2004; Menzies et al., 2010).

422 Os diferentes tratamentos avaliados foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica  
423 quando comparado ao grupo infectado e não tratado. Em adição, salienta-se que os ovinos que  
424 receberam suplementação com cobre, tanto utilizado isoladamente quanto associação com  
425 closantel, apresentaram menores níveis de TBARS a nível sistêmico e no abomaso e rins

426 quando comparados ao tratamento convencional somente com closantel. Esse fato pode ocorrer  
427 devido ao cobre atuar como adjuvante incrementando a resposta imune e como co-fator para  
428 diversos componentes/enzimas no organismo, por exemplo ceruloplasmina e a enzima  
429 antioxidante Cu, Zn-SOD (Sukalski et al., 1997; Pan e Loo, 2000; Whittaker, 2010). Esses  
430 resultados são similares aos observados por Leal et al. (2014), em que o tratamento com cobre  
431 e selênio foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica nos animais com hemoncose.

432 Tanto a produção de ERO quanto de antioxidantes é importante para a resistência dos  
433 hospedeiros a infecções parasitárias (Ben-Smith et al., 2002.; Dzik, 2006; Kotze, 2003). Além  
434 disso, sabe-se que em ovelhas resistentes, diferentemente de animais susceptíveis, na infecção  
435 por *H. contortus* ocorre uma resposta inflamatória específica com aumento da produção de  
436 oxidantes e antioxidantes (Lees et al., 2011). Assim, os animais infectados por esse parasito e  
437 não tratados apresentam baixos níveis/atividade de antioxidantes se comparados à animais  
438 sadios. No entanto, utilizando-se tratamento com closantel, cobre ou associação dos mesmos  
439 pode-se observar incremento da resposta antioxidante, sendo necessário para o  
440 desenvolvimento de uma resposta imune adequada contra a infecção (Au Yeung et al., 2005;  
441 Rao et al., 2001; Smith et al., 2005).

442 O incremento nas defesas antioxidantes, observado nos cordeiros tratados se  
443 comparados aos infectados e não tratados, pode ocorrer devido à redução na carga parasitária,  
444 mas também se sugere que as alterações observadas nos antioxidantes sejam decorrentes de  
445 uma resposta ao aumento do estresse oxidativo provocado pela infecção (Celi et al., 2010). No  
446 entanto, no caso dos animais que receberam cápsulas de cobre, a suplementação parece  
447 potencializar as defesas antioxidantes durante a infecção por *H. contortus*, pois comparando-se  
448 os diferentes tratamentos observa-se que o uso do cobre (isoladamente ou associação) teve ação  
449 benéfica na atividade da CAT e da SOD, bem como os níveis de GSH e de PSH quando  
450 comparado ao uso somente de closantel. Essa diferença pode ocorrer devido ao fato de o cobre

451 ser essencial para defesa antioxidante, em que a deficiência desse mineral foi relacionada com  
452 diminuição do potencial do organismo em responder ao estresse oxidativo (Gaetke e Chow,  
453 2003) e com alterações na transcrição de genes relacionados a enzimas antioxidantes (Lai et al.,  
454 1996). Assim, o uso de partículas de óxido de cobre apresenta vantagens quando comparado ao  
455 tratamento convencional, uma vez que o cobre é necessário para a função catalítica da enzima  
456 Cu, Zn-SOD (Whittaker, 2010), sendo esta a primeira linha de defesa para o organismo quando  
457 células fagocíticas ativadas produzem radical superóxido em resposta a infecção pelo *H.*  
458 *contortus* (Kotze, 2003; Colasanti, et al., 2000; Djordjevic, 2004). Ainda, baixos níveis desse  
459 mineral podem prejudicar a função dessa enzima (Harris, 1992; Muller et al., 2006; Huang et  
460 al., 2012), além de diminuir as taxas de transcrição da catalase (Lai et al., 1996).

461 Durante as infecções parasitárias, pode ocorrer imunossupressão devido a diferentes  
462 alterações patológicas (DIMIRI et al, 2010). Na infecção por *H. contortus* os níveis de IgG e  
463 IgE são superiores nos animais infectados em relação aos animais sadios, sendo que para o  
464 controle de helmintos ocorre elevação nos níveis de citocinas, de eosinófilos, de mastócitos, de  
465 basófilos, hiperplasia das células globulares e produção de imunoglobulinas (Anthony et al.,  
466 2007; Tizard, 2013).

467 A suplementação com minerais pode melhorar a resposta imune do hospedeiro para  
468 combater infecções (Soli et al., 2010). Sabe-se que o cobre é um elemento importante para  
469 imunidade e produção em ruminantes, a deficiência desse mineral causa diminuição na  
470 produção, perda de peso e aumenta a incidência de doenças no rebanho (Herdt e Hoff, 2011).  
471 De fato, os ovinos suplementados com cobre apresentaram níveis maiores de IgE e IgG quando  
472 comparados aos tratados com closantel. Ainda, o tratamento somente com closantel não diferiu  
473 significativamente ou apresentou pouca diferença quanto aos níveis de imunoglobulinas se  
474 comparados aos animais infectados e não tratados, demonstrando o potencial das partículas de  
475 óxido de cobre em incrementar a resposta imune. Esse incremento torna-se importante uma vez

476 que a produção de IgE é essencial no controle da carga de helmintos, sendo evidenciado na  
477 reação de autocura em ovinos infectados com *H. contortus*, pois a combinação de antígenos  
478 desse parasito com as IgE ligadas a mastócitos desencadeia degranulação e liberação de  
479 moléculas vasoativas e proteases. Essas moléculas estimulam a contração da musculatura lisa  
480 e aumento da permeabilidade vascular fazendo com que o parasito se desprenda da mucosa  
481 abomasal (Tizard, 2013). Já a IgG apresenta ação em diferentes infecções parasitárias induzindo  
482 a produção de anticorpos, no abomaso e intestino, que agem contra alguns carboidratos  
483 presentes na superfície do parasito (Bungiro et al., 2008).

484 Quando ocorre a infecção parasitária por helmintos e a mobilização da resposta imune  
485 Th2, gera-se um processo inflamatório pela ação de macrófagos e neutrófilos (Anthony et al.,  
486 2007). As células fagocíticas, para eliminar o parasito, produzem espécies reativas de oxigênio  
487 (ERO) que causam danos ao parasito (Rinaldi et al., 2007). As ERO não têm ação específica  
488 contra patógenos e dependendo dos níveis de produção, podem gerar lesões em células  
489 adjacentes, como por exemplo, lesões na mucosa do abomaso de cordeiros infectados por *H.*  
490 *contortus* (Machado et al., 2014). Em adição, o aumento da peroxidação lipídica nos animais  
491 infectados, como observado pelo aumento do TBARS no presente estudo pode contribuir para  
492 patogênese dessa doença, a semelhança do que ocorre em outras infecções parasitárias (Saleh,  
493 2009; Wolkmer et al., 2009). Assim, as ERO podem levar a redução da capacidade do  
494 hospedeiro em suportar a infecção (Rosenfeldt et al., 2013) e estar relacionadas a uma disfunção  
495 da resposta imune (Dimiri et al, 2010), como a diminuição dos níveis de IgE e IgG nos ovinos  
496 com hemocose e não tratados. No entanto, observa-se que pela ação dos antioxidantes, com  
497 aumento na atividade da SOD, da CAT e dos níveis de GSH e de PSH, devido aos tratamentos  
498 utilizados neste estudo, os níveis de TBARS apresentaram redução significativa, além de  
499 incremento nos níveis de IgE e IgG, com intuito de proteção celular e combater a infecção.

500 Salienta-se que o uso de partículas de óxido de cobre apresentou melhores resultados em relação  
501 as variáveis analisadas quando comparados aos animais tratados somente com closantel.

502 A quimioprofilaxia é o método convencional de tratamento para nematódeos  
503 gastrointestinais. Porém, devido à ampla resistência dos parasitos aos anti-helmínticos  
504 comumente utilizados (Molento et al., 2009), estudos com métodos alternativos de tratamento  
505 vem sendo desenvolvidos. Dentre esses, destaca-se o uso de partículas de óxido de cobre que  
506 demonstrou importante ação anti-helmíntica nos animais infectados com *H. contortus*,  
507 apresentado taxa de redução de OPG de 93% já aos 21 dias p.i., sendo superior ao uso somente  
508 de closantel. Já a associação dos dois tratamentos foi capaz de zerar a OPG dos animais  
509 infectados. Essa ação anti-helmíntica pode ter relação com a composição e forma de aplicação  
510 do cobre, uma vez que em um estudo comparando a utilização de partículas de óxido de cobre  
511 e de sulfato de cobre observou-se que o óxido de cobre foi capaz de reduzir o grau FAMACHA  
512 e OPG dos animais com hemocose (Makey, 2018). Além disso, Leal et al. (2014) relataram  
513 diminuição do OPG nos animais infectados e tratados somente com cobre (lactobionato de  
514 Cu+gluconato de Cu+octadecanoato de Cu), enquanto o uso somente de selênio ou associação  
515 desse com cobre não demonstrou efeito na infecção. Compostos como selênio e vitamina E  
516 (Nicolodi et al., 2010; Leal et al., 2010), sulfato ferroso e férrico (Rocha et al., 2012), edetato  
517 de zinco (Pivoto et al., 2015), edetato de cobre (Grosskopf et al., 2017) e edetato de zinco  
518 associado ao edetato de cobre (Schafer et al., 2014) não apresentaram efeito anti-helmíntico.

519 Com relação ao estresse oxidativo e incremento da resposta imune do hospedeiro, o uso  
520 de partículas de óxido de cobre parece ter ação superior aos demais compostos relatados na  
521 literatura. Esse composto foi capaz de reduzir os níveis de TBARS, aumentar atividade  
522 antioxidante e incrementar a imunidade dos animais tratados já aos 21 dias p.i. e utilizando-se  
523 dose única do composto, enquanto o uso de selênio e cobre, em duas aplicações, reduziu os  
524 níveis de TBARS aos 40 e 80 dias p.i. e aumentou a atividade da glutationala peroxidase somente



525 aos 80 dias p.i. (Leal et al., 2014). De maneira semelhante o uso de edetato de zinco em duas  
526 doses diminuiu o índice de estresse oxidativo somente aos 31 dias p.i. (Pivoto et al., 2015). Já  
527 o uso de edetato de cobre aumentou níveis de ERO e a atividade da SOD (Grosskopf et al.,  
528 2017) e a associação de edetato de zinco e cobre, em uma primeira dose, aumentou os níveis de  
529 imunoglobulinas, porém em uma segunda aplicação causou diminuição dessas (Schafer et al.,  
530 2014).

531 É importante salientar que o uso excessivo de minerais pode levar a toxicidade. A  
532 suplementação com cobre pode ser problemática se mal administrada, especialmente em ovinos  
533 que são susceptíveis a intoxicação por esse mineral, com sinais clínicos que incluem diarreia,  
534 anorexia, desidratação e crise hemolítica (Aiello, 1998). No entanto, no presente estudo os  
535 animais tratados não demonstraram nenhum sinal de intoxicação e as concentrações de cobre  
536 plasmáticas e hepáticas (aproximadamente 200mg/g) dos ovinos que foram tratados com esse  
537 mineral estavam dentro dos valores de normalidade para a espécie (Silva, 2018; Suttle, 2010).  
538 Este fato demonstra que a dose utilizada foi adequada como já esperado, pois em estudos  
539 prévios que utilizaram doses maiores de partículas de cobre também não foram observadas  
540 intoxicações (Langlands et al., 1986; Knox, 2002; Burke et al., 2004; Martínez-Ortiz-De-  
541 Montellano et al., 2007; Vatta et al., 2009). Em adição, animais com sobrecarga de cobre  
542 apresentam elevada peroxidação lipídica no fígado e soro, níveis diminuídos de GSH hepática  
543 e baixa atividade da SOD (Sokol et al., 1990; Ohhira et al., 1995; Sansinanea et al., 1998; Zhang  
544 et al., 2000), o que não foi observado neste estudo.

545 No presente estudo, quando comparados os resultados de concentração de cobre  
546 hepático nos diferentes grupos, observa-se aumento na concentração de cobre hepático nos  
547 grupos que receberam partículas de óxido de cobre. Galindo-Barboza et al. (2011) observaram  
548 uma relação negativa entre a quantidade de cobre hepática de animais tratados com cápsulas de  
549 partículas de óxido de cobre e o número de parasitas no conteúdo abomasal desses animais,

550 sugerindo que quando as cápsulas liberam mais cobre, menos parasitas sobrevivem no abomaso  
551 e mais cobre se acumula no fígado. Outros estudos também associaram maiores níveis de cobre  
552 com aumento da depuração de parasitas (Bremner, 1961; Bang et al., 1990). Assim, os maiores  
553 níveis de cobre hepático observado nos animais suplementados com esse mineral podem estar  
554 relacionados à uma maior percentagem de redução da OPG e ao número de parasitos no  
555 abomaso nesses animais se comparados aos animais não tratados ou tratados somente com  
556 closantel. Ainda, sabe-se que o COWP tem o potencial de reduzir a fecundidade do  
557 *Haemonchus* spp. quando ofertado por longo período, podendo reduzir a contaminação larval  
558 do pasto em especial onde a resistência ao anti-helmíntico é um problema emergente (Knox,  
559 2008).

560

## 561 **5 CONCLUSÃO**

562 A cápsula de partículas de óxido de cobre (COWP) associadas ao anti-helmíntico closantel  
563 é uma alternativa para ovinos infectados com *Haemonchus contortus* tendo em vista que  
564 ocorreu um excelente sinergismo do produto comercial ao mineral acarretando redução de  
565 100% na contagem parasitária dos ovinos. Ainda, a COWP incrementou a ação antioxidante e  
566 resposta imunológica ao parasito sem apresentar sinais de intoxicação, sendo uma alternativa  
567 para ovinocultores que sofrem com a resistência a múltiplos princípios ativos na criação de  
568 ovinos. Estudos futuros devem ser realizados testando a associação da COWP com outros  
569 princípios ativos que evidenciam resistência ao *Haemonchus contortus*.

570

## 571 **REFERÊNCIAS**

572 Aiello, SE (Ed.). 1998. Merck Veterinary Manual (eighth ed.), Merck & Co., Whitehouse  
573 Station, NJ, pp. 2032-2033.

- 574 Amarante, AFT, 2001. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: Mattos, W.R.S. (Ed.). A  
575 produção animal na visão dos brasileiros. Piracicaba: Fealq/SBZ, pp. 461-473.
- 576 Amarilho-Silveira. 2015. Resistência ovina frente a nematoides gastrintestinais. Arch. Zootec.,  
577 64, 1-12.
- 578 Anthony, RM et al., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. Nature Review  
579 Immunology, Londres, 7, 975-987.
- 580 Au Yeung, KJ, Smith, A., Zhao, A., Madden, KB, Elfrey, J., Sullivan, C., Shea-Donohue, T.  
581 2005. Impact of vitamin E or selenium deficiency on nematode-induced alterations in murine  
582 intestinal function. Experimental Parasitology, 09(4), 201-208.
- 583 Bagnall, NH, Kotze, AC 2004. CDNA cloning and expression patterns of aperoxiredoxin, a  
584 catalase and a glutathione peroxidase from *Haemonchus contortus*. Parasitol. Res. 94, 283-  
585 289.
- 586 Bang, KS, Familton, AS, Sykes, AR, 1990. Effect of copper oxide wire particle treatment on  
587 establishment of major gastrointestinal nematodes in lambs. Res. Vet. Sci. 49, 132-137.
- 588 Bentounsi, B., Meradi, S., Cabaret, J. 2012. Towards finding effective indicators (diarrhoea and  
589 anaemia scores and weight gains) for the implementation of targeted selective treatment  
590 against the gastro-intestinal nematodes in lambs in a steppic environment. Veterinary  
591 Parasitology, 187(1), 275-279,
- 592 Ben-Smith, A., Lammas, DA, Behnke, JM, 2002. Effect of oxygen radicals and differential  
593 expression of catalase and superoxide dismutase in adult *Heligmosomoides polygyrus*  
594 during primary infections in mice with differing response phenotypes. Parasite Immunology,  
595 24(3), 19-129.
- 596 Behnke, JM, Iraqi, F., Menge, D., Baker, RL, Gibson, J.; Wakelin, D., 2003. Chasing the genes  
597 that control resistance to gastrointestinal nematodes. Journal of Helminthology, 77(2), 99-  
598 110.

- 599 Boyne, AF, Ellman, GL, 1972. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components.  
600 *Anal Biochem.*, 46, 639-53.
- 601 Bremner, KC, 1961. The copper status of some helminth parasites, with particular reference to  
602 host-helminth relationships in the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. Vet. J.*, 12, 1188-1199.
- 603 Bungiro Jr, RD, Sun, T., Harrison, LM, Shoemaker, CB, Cappello, M., 2008. Mucosal antibody  
604 responses in experimental hookworm infection. *Parasite Immunol.*, 30, 293-303.
- 605 Burk. JM, 2006. Evaluation of multiple low doses of copper oxide wire particles compared with  
606 levamisole for control of *Haemonchus contortus* in lambs. *Veterinary Parasitology.*, 139(1-  
607 3), 145-149.
- 608 Burke, JM, 2004. Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on  
609 *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Veterinary Parasitology*, 123, 235-243.
- 610 Celi, P. 2010. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *Revista*  
611 *Brasileira de Zootecnia*, 39, 348-363.
- 612 Chartier. C. 2000. Efficacy of Copper Oxide Needles for the Control of Nematode Parasites in  
613 Dairy Goats. *Veterinary Research Communications*, 24, 389-399.
- 614 CFMV. 2012. Manual de Legislação do Sistema. CFMV/CRMVs.
- 615 Coles, GC et al., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary  
616 importance. *Veterinary parasitology*, 136(3), 167-185.
- 617 Colasanti, M., Suzuki, H. 2000. The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological*  
618 *Sciences*, 21(7), 249-252.
- 619 Corrigan, CJ, Kay, AB, 1992. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma.  
620 *Immunology Today*, 13(12), 501-507.
- 621 Craig, TM, 2009. 'Helminth parasites of the ruminant gastrointestinal tract', In: Anderson, DE,  
622 Rings, DM (Ed.). *Current veterinary therapy: Food Animal practice*, Saunders Elsevier,  
623 Missouri, vol. 5, p. 84.

- 624 Dewey, DW, 1977. An effective method for the administration of trace amounts of copper to  
625 ruminants. v. 8, pp. 326-327
- 626 Djordjević, VB, 2004. Free radicals in cell biology. *International Review Of Cytology*, 237,  
627 57-89.
- 628 Dimiri, U., Sharma, MC, Yamdagni, A., Ranjan, R., Zama, MMS, 2010. Psoroptic mange  
629 infestation increases oxidative stress and decreases antioxidant status in sheep. *Veterinary*  
630 *Parasitology*, 168(3), 318-322.
- 631 Dzik, JM, 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta*  
632 *Biochimica Polonica*, 53(1), 33-64.
- 633 Ellman GL, 1959. Tissue Sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82, 70-72.
- 634 Ellman, GL et al., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase  
635 activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- 636 Fausto, G., 2014. Protein profile of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*  
637 and supplemented with selenium and copper. *Parasites & Vectors*, 7(1), 355-341.
- 638 Gaetke, LM, Chow CK, 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients.  
639 *Toxicology*, 189, 147-163.
- 640 Galindo-Barboza, AJ, Torres-Acosta, JFJ, Cámara-Sarmiento, R., Sandoval-Castro, CA,  
641 Aguilar-Caballero AJ, 2011. Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles  
642 against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 176, 201-207.
- 643 Gilleard, JS, 2013. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug  
644 resistance. *Parasitology*, 140(12), 1506-1522.
- 645 Gonçalves. IG, Echevarria, FAM, 2004. Cobre no controle da verminose gastrointestinal em  
646 ovinos. *Ciência Rural*, 34(1), 183-188.

- 647 Grosskopf, HM et al., 2017. Supplementation with copper edetate in control of *Haemonchus*  
648 *contortus* of sheep, and its effect on cholinesterase's and superoxide dismutase activities.  
649 *Experimental Parasitology* 173, 34-41.
- 650 Harris, ED, 1992. Copper as a cofactor and regulator of Cu, zinc superoxide dismutase. *J. Nutr.*,  
651 122, 636-640.
- 652 Herdt, TH, Hoff, B., 2011. The use of blood analysis to evaluate trace mineral status in ruminant  
653 livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice.*, 27, 255-283.
- 654 Huang, TT, Zou, Y., Corniola, R., 2012. Oxidative stress and adult neurogenesis effects of  
655 radiation and superoxide dismutase deficiency. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 23, 738-744.
- 656 Jentzsch, AM, Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, HK, 1996. Improved analysis of  
657 malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*, 20, 251-256.
- 658 Kemp, JM, Robinson, NA, Meeusen, EN, Piedrafita, DM, 2009. The relationship between the  
659 rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues  
660 in immune sheep. *International Journal for Parasitology*, 39(14), 1589-1594.
- 661 Knox, MR, 2002. Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus*  
662 control in sheep. *Australian veterinary journal*, 80, 224-222.
- 663 Kotze, AC, 2003. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide  
664 in vitro. *International Journal for Parasitology*, 33(4), 393-400.
- 665 Lai, CC, Hsuinghuang, W., 1996. Antioxidant enzyme gene transcription in copper-deficient  
666 rat liver. *Free. Radical Biology and Medicine*, 21, 233-240.
- 667 Langlands, JP, Bowles, JE, Donald, GE et al., 1981. Copper status of sheep grazing pastures  
668 fertilized with sulfur and molybdenum. *Australian Journal Agriculture Research*, 32, 479-  
669 486.
- 670 Leal, MLR et al., 2014. Copper and Selenium: auxiliary measure to control infection by  
671 *Haemonchus contortus* in lambs. *Experimental Parasitology*, 144, 39-43.

- 672 Leal, MLR et al., 2010. Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs  
673 experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Veterinary Research Communication,  
674 Amsterdam, 34, 549-555.
- 675 Lees, MS, Robinson, NA, Ingham, AB, Kotze, AC, Piedrafita, DM, 2011. Dual oxidase 2 and  
676 glutathione peroxidase gene expression are elevated in hyperimmunised sheep challenged  
677 with *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology, 179(1), 113-122.
- 678 Machado, V. et al. 2014. Relationship between oxidative stress and pathological findings in  
679 abomasum of infected lambs by *Haemonchus contortus*. Pathology - Research and Practice,  
680 In press.
- 681 Mackey, J., 2018. "Comparing the efficacy of copper oxide wire particles and copper sulfate  
682 on *Haemonchus contortus* in goats" Honors College Theses. 24.  
683 <http://digitalcommons.murraystate.edu/honorsthesis/24>.
- 684 Martínez Ortizde Montellano, C, Vargas-Magaña, JJ, Aguilar-Caballero, AJ, Sandoval-Castro,  
685 CA, Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Torres-Acosta, JFJ, 2007. Combining the effects of  
686 supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal  
687 nematodes in browsing goats. Veterinary Parasitology, 146(1–2), 66-76.
- 688 Martínez-Valladares, M., Vara-Del Río, MP, Cruz-Rojo, MA, Rojo-Vázquez, FA, 2005.  
689 Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra  
690 sheep. Parasit. Immunol. 27, 213-218.
- 691 McCord, JM, Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for  
692 erythrocyte superoxide dismutase (hemocuprein). J Biol Chem, 244, 6049-6055.
- 693 Menzies, M., Reverter, A., Andronicos, N., Hunt, P., Windon, R., Ingham, A., 2010. Nematode  
694 challenge induces differential expression of oxidant, antioxidant and mucous genes down  
695 the longitudinal axis of the sheep gut. Parasite Immunol., 32, 36-46.

- 696 Molinaro, EM, Caputo, LFG, Amendoeira, MRR, 2009. Conceitos e métodos para formação de  
697 profissionais em laboratórios e saúde. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 290 pp.
- 698 Muller, T., Muller, W., Feichtinger, H., 1998. Idiopathic copper toxicosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 67,  
699 1082-1086.
- 700 Nelson, DL, Kiesow, LA, 1972. Entalpy of the composition of hydrogen peroxide by catalase  
701 at 25°C. *Analytical Biochemistry*, 49, 474-479.
- 702 Nicolodi, PRSJ et al., 2010. Perfil proteico e metabolismo oxidativo de cordeiros  
703 experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e  
704 vitamina E. *Ciência Rural*, 40, 561-567.
- 705 Ohkawa, H., Ohishi, N., YAGI, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by  
706 thiobarbituric acid reaction; *Analytical biochemistry*, 95, 351-358.
- 707 Ohhira, M., Ono, M., Sekiya, C., 1995. Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid  
708 peroxides in the liver of Long-Evans with Cinnamon-like coat rats. *J. Gastroenterol.*, 30,  
709 619-623.
- 710 Pan, Y., Loo, G., 2000. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-  
711 lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 824-830.
- 712 Pivoto, FL et al. 2015. Oxidative stress by *Haemonchus contortus* in lambs: Influence of  
713 treatment with zinc edetate. *Research in veterinary science*, 102, 22-24.
- 714 Rao, AV, Balachandran, B., 2002. Role of oxidative stress and antioxidants in  
715 neurodegenerative diseases. *Nutritional Neuroscience*, 5(5), 291-309.
- 716 Rinaldi, M. et al. 2007. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive  
717 oxygen species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115(1-2), 107-125.
- 718 Roberts, FHS, O'Sullivan, JP, 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles  
719 infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agri. Res.*, 1, 99-102.



- 720 Rocha, R. et al. 2012. Eritrograma, estresse oxidativo e interação mineral em cordeiros  
721 naturalmente infectados por parasitas gastrintestinais suplementados com diferentes formas  
722 de ferro oral. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(2), 723-730.
- 723 Rosenfeldt, F. et al., 2013. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology  
724 and therapy. *Experimental gerontology*, 48(1), 45-54.
- 725 Saleh, MA, 2009. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with  
726 *Babesia bigemina*, *Res. Vet. Sci.*, 86, 43-48.
- 727 Sansinanea, AS, Cerone, SI, Streitenberger, SA, Garcia, C., Auza, N. 1998. Oxidative effect of  
728 hepatic copper overload. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 48, 25-31.
- 729 Schafer, AS, et al. 2014. Immune response of lambs experimentally infected with *Haemonchus*  
730 *contortus* and parenterally treated with a combination of zinc and copper. *Small Ruminant*  
731 *Research*, In press, doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.10.016.
- 732 Smith, A., Madden, KB, Au Yeung, KJ, Zhao, A., Elfrey, J., Finkelman, F., Levander, O., Shea-  
733 Donohue, T., Urban Junior, JF, 2005. Deficiencies in selenium and/or vitamin E lower the  
734 resistance of mice to *Heligmosomoides polygyrus* infections. *The Journal of Nutrition*,  
735 135(4), 830-836.
- 736 Silva, RT, Soares, CP, Dantas, MF, Marques, VS, 2018. Serum and liver copper, iron,  
737 molybdenum and zinc concentration in goats and sheep in the state of Paraíba, Brazil. *Pesq.*  
738 *Vet. Bras.*, 38(7), 1313-1316.
- 739 Sokol, RJ, Devereaux, M., Mierau, G., Hambidge, KM, Shikes, H., 1990. Oxidant injury to  
740 hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. *Gastroenterology*, 90,  
741 1061-1071.
- 742 Soli, F., Terrill, TH, Shaik, SA, Getz, WR, Miller, JE, Vanguru, M. 2010. Efficacy of copper  
743 oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. *Veterinary*  
744 *parasitology*, 168(1), 93-96.

- 745 Sukalski, KA, Laberge, TP, Johnson, WT, 1997. In vivo oxidative modification of erythrocyte  
746 membrane proteins in copper deficiency. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 835-842.
- 747 Suttle, N. *Mineral Nutrition of Livestock*. CABI Head Office 4th Edition, 2010. pp. 255-304.
- 748 Tizard, IR., 2013. *Veterinary Immunology*. Elsevier Saunders, 9. ed. p. 533.
- 749 Ueno, H., Gonçalves, PC, 1998. *Manual for diagnosis of helminthiasis in ruminants*. Press  
750 Color, Salvador, p. 143.
- 751 Vatta, AF. 2009. The potential to control *Haemonchus contortus* in indigenous South African  
752 goats with copper oxide wire particles. *Veterinary Parasitology*, 162, 306-313.
- 753 Wakelin, D., 1978. Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection.  
754 *Advances in Parasitology*, Londres, 16, 219-308.
- 755 Whittaker, JW, 2010. Metal uptake by manganese superoxide dismutase. *Biochim. Biophys.*  
756 *Acta* 1804, 298-307.
- 757 Wolkmer, P., da Silva, AS, Traesel, CK, et al., 2009. Lipid peroxidation associated with anemia  
758 in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*, *Vet. Parasitol.*, 165, 41-46.
- 759 Zhang, SSZ, Noordin, MM, Rahman, SOA, Haron, MJ, 2000. Effects of copper overload on  
760 hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, 42, 261-264.

761

## 762 **LEGENDAS DE FIGURAS**

763 **Figura 1** – Concentração de cobre no fígado de cordeiros (n=06) não infectados  
764 (Control); experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H.*  
765 *contortus* e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com óxido  
766 de cobre (HC+Cu); e infectados com *H. contortus* e tratados com closantel associado ao óxido  
767 de cobre (HC+CL+Cu) no dia 49 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de  
768 partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença  
769 estatística (p<0.05).

770 **Figura 2** – Perfil antioxidante no abomaso de cordeiros (n=06) não infectados (Control);  
771 infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com  
772 closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre  
773 (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mas cápsula de óxido de cobre  
774 (HC+CL+Cu), no dia 50 p.i. (A) Catalase (CAT); (B) Glutationa (GSH); (C) Superóxido  
775 Dismutase (SOD); (D) Tiois Totais (PSH). Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula  
776 de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença  
777 estatística ( $p<0.05$ ).

778 **Figura 3** – Perfil antioxidante no fígado de cordeiros (n=06) não infectados (Control);  
779 infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com  
780 closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre  
781 (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais capsula de óxido de cobre  
782 (HC+CL+Cu), no dia 50 p.i. (A) Catalase (CAT); (B) Glutationa (GSH); (C) Superóxido  
783 Dismutase (SOD); (D) Tiois Totais (PSH). Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula  
784 de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença  
785 estatística ( $p<0.05$ ).

786 **Figura 4** – Perfil antioxidante nos rins de cordeiros (n=06) não infectados (Control);  
787 infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com  
788 closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre  
789 (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais capsula de óxido de cobre  
790 (HC+CL+Cu), no dia 50 p.i. (A) Catalase (CAT); (B) Glutationa (GSH); (C) superóxido  
791 Dismutase (SOD); (D) Tiois Totais (PSH). Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula  
792 de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença  
793 estatística ( $p<0.05$ ).

794 **Figura 5** –Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no abomaso  
795 (A), fígado (B) e rins (C) de cordeiros (n=06) não infectados (Control); infectados com  
796 *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel (HC+CL);  
797 infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre (HC+Cu); infectados  
798 com *H. contortus* e tratados com closantel mais capsula de óxido de cobre (HC+CL+Cu), no  
799 dia 50 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de óxido de cobre  
800 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p<0.05$ ).

801 **Figura 6** – Níveis séricos de (A) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS;  
802 (B) Glutationa - GSH e (C) Tiois Totais – PSH, em cordeiros (n=06) não infectados (Control);  
803 infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus* e tratados com  
804 closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de óxido de cobre  
805 (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais capsula de óxido de cobre  
806 (HC+CL+Cu), nos dias 0, 21, 35 e 49 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula  
807 de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes significam diferença  
808 estatística ( $p<0.05$ ).

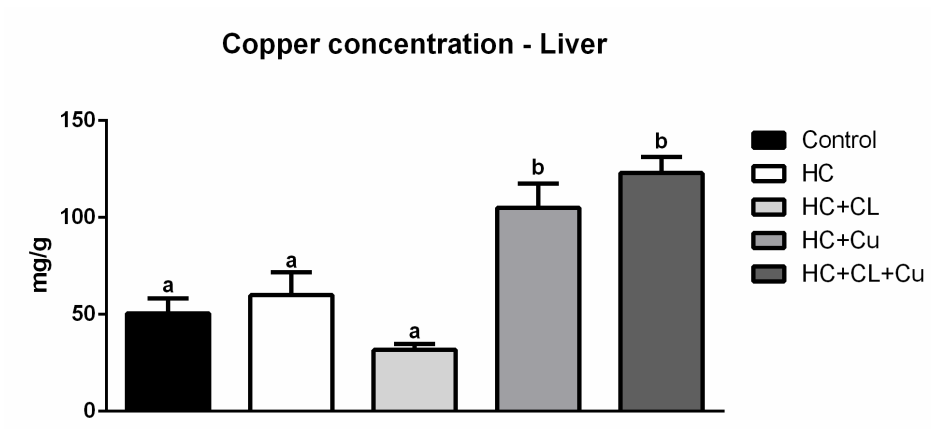
809 **Figura 7** – Imunoglobulinas (A) IgG e (B) IgE no soro de cordeiros (n=06) não  
810 infectados (Control); infectados com *Haemonchus contortus* (HC); infectados com *H. contortus*  
811 e tratados com closantel (HC+CL); infectados com *H. contortus* e tratados com cápsula de  
812 óxido de cobre (HC+Cu); infectados com *H. contortus* e tratados com closantel mais capsula  
813 de óxido de cobre (HC+CL+Cu), nos dias 0, 21, 35 e 49 p.i. Closantel - 1 ml/10 kg dose única  
814 via oral; Cápsula de partículas de óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes  
815 significam diferença estatística ( $p<0.05$ ).

816

817

818

819 **Figura 1**



820

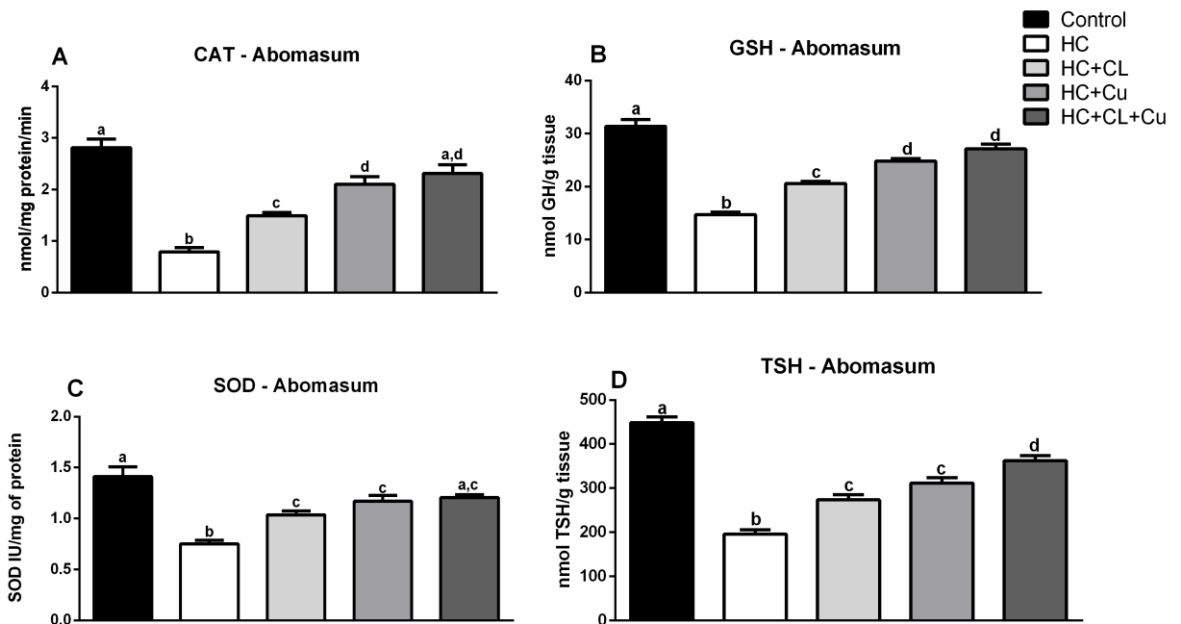
821

822

823

824

825 **Figura 2**



826

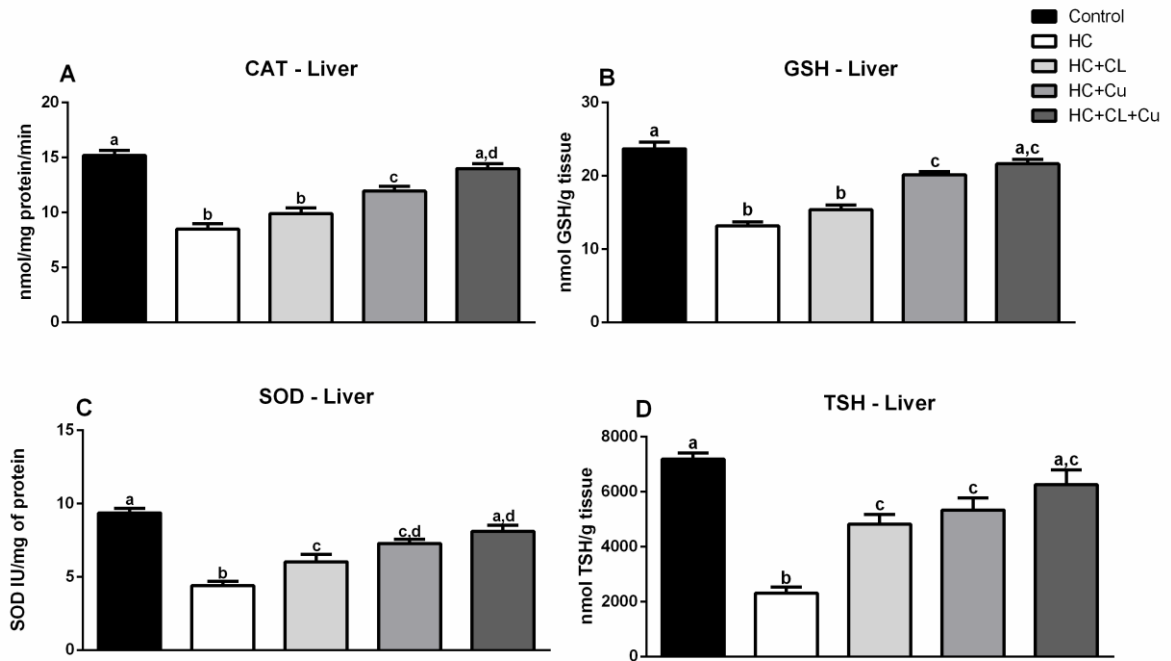
827

828

829

830

831 **Figura 3**

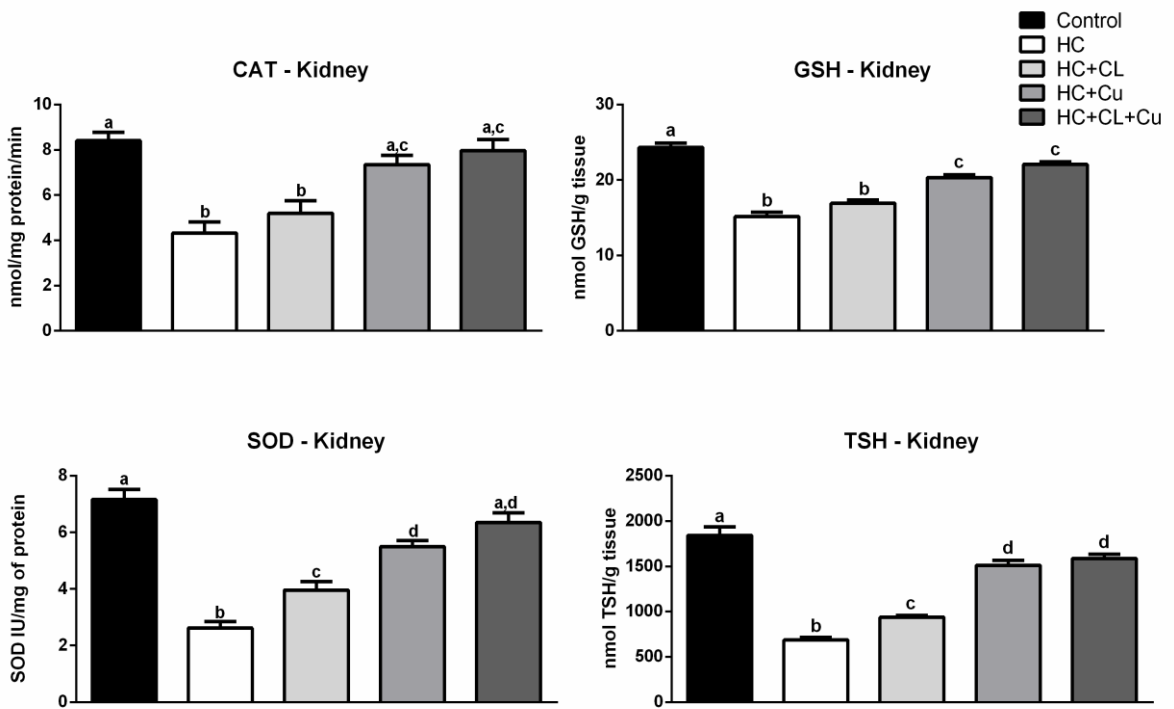


832

833

834

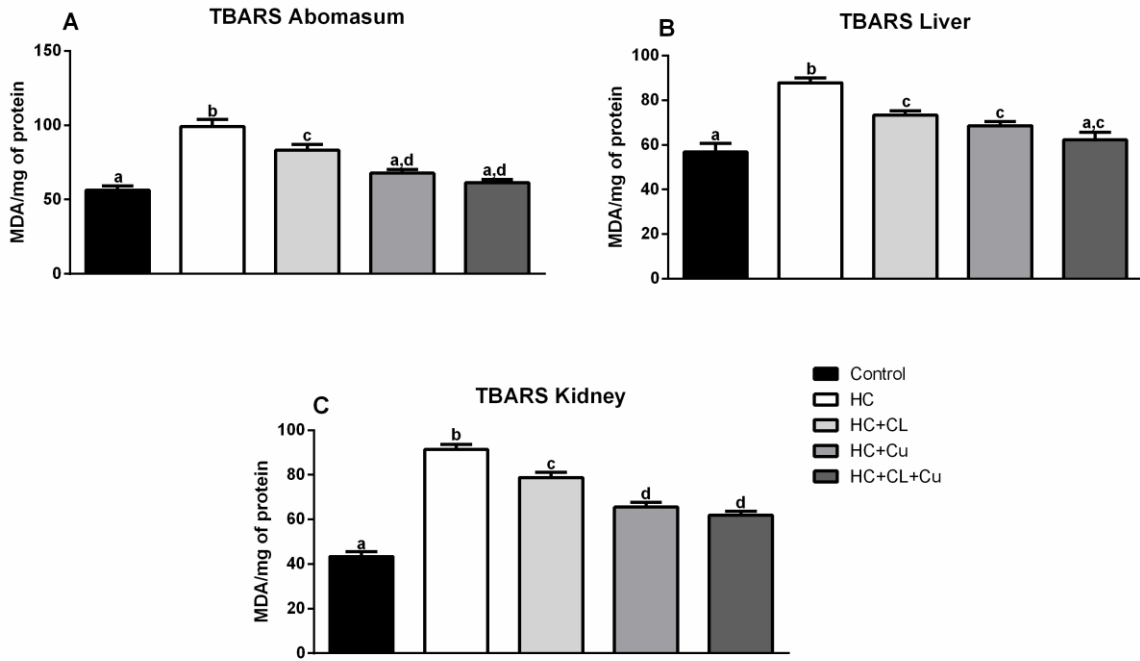
835 **Figura 4**



836

837

838 **Figura 5**



839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

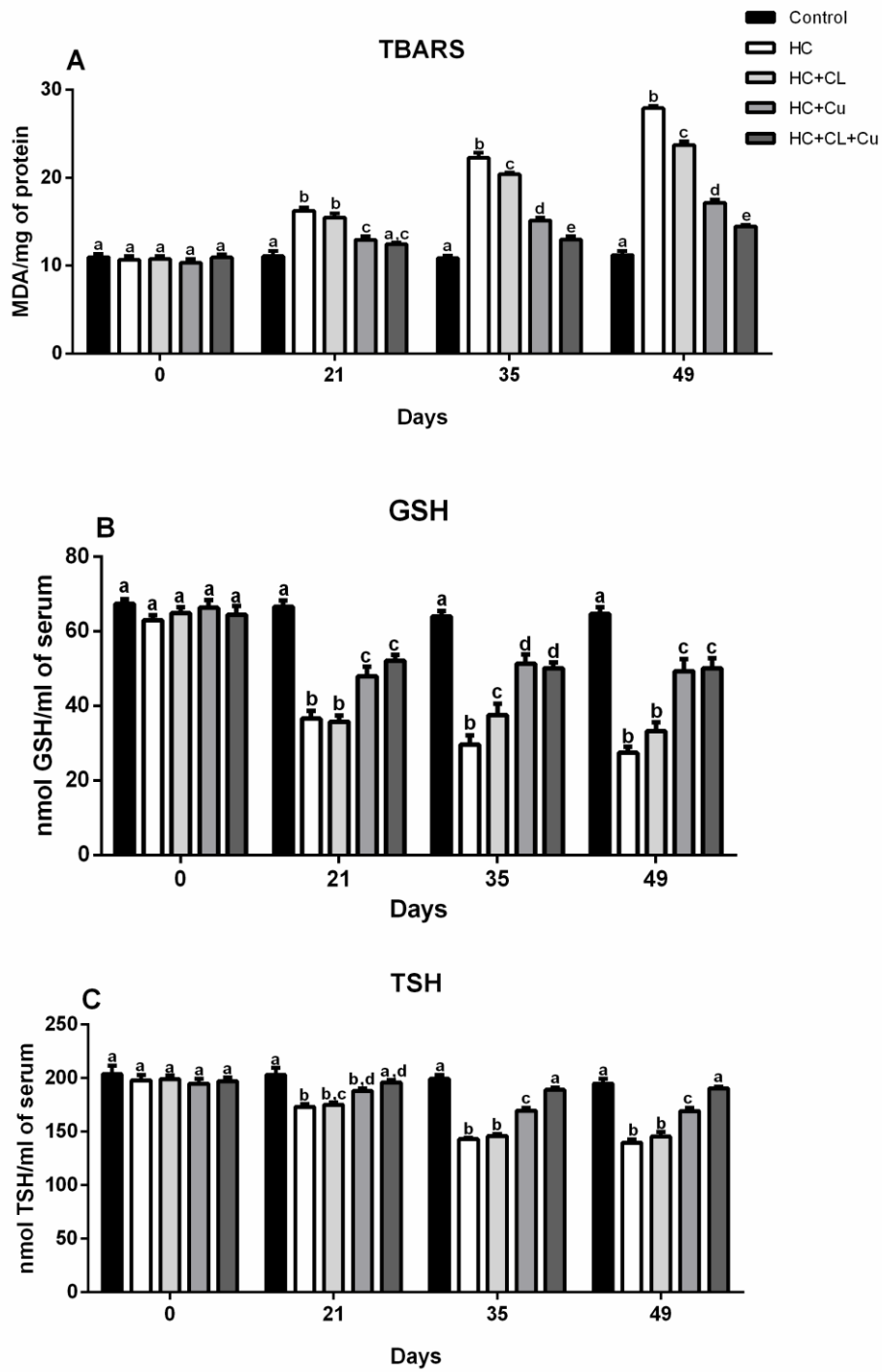
850

851

852

853

854 **Figura 6**



855

856

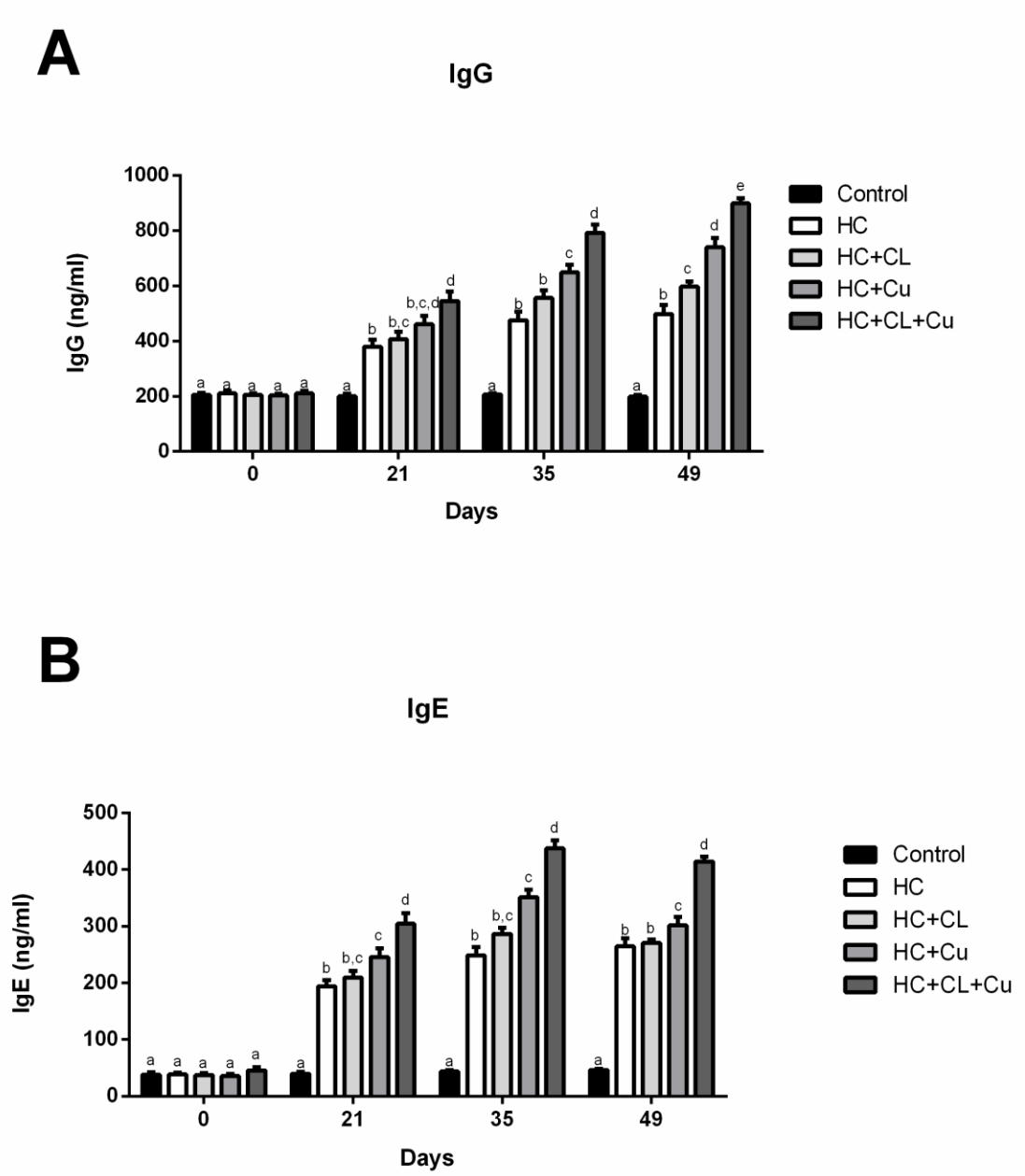
857

858

859



860 **Figura 7**



861

862

863 **Tabela 1** – Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de cordeiros experimentalmente  
 864 infectados com *Haemonchus contortus*, tratados ou não com closantel, cobre ou closantel  
 865 associado ao cobre.

		OPG				
Dias		Controle	HC	HC+CL	HC+Cu	HC+CL+Cu
0	Média	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	D.P	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
14	Média	0.0 <sup>a</sup>	262.5 <sup>a</sup>	233.3 <sup>a</sup>	65.0 <sup>a</sup>	191.7 <sup>a</sup>
	D.P	0.0	505.2	522.7	80.2	237.0
	Redução*	0.0	-	<b>11%</b>	<b>75%</b>	<b>27%</b>
21	Média	0.0 <sup>a</sup>	1,445.8 <sup>b</sup>	1,137.5 <sup>b</sup>	104.2 <sup>c</sup>	12.5 <sup>c</sup>
	D.P	0.0	745.2	656.8	135.5	20.9
	Redução*	0.0	-	<b>21%</b>	<b>93%</b>	<b>99%</b>
35	Média	0.0 <sup>a</sup>	3,900.0 <sup>b</sup>	66.7 <sup>a,c</sup>	12.5 <sup>a,c</sup>	0.0 <sup>a,c</sup>
	D.P	0.0	2,167.0	80.1	20.9	0.0
	Redução*	0.0	-	<b>98%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
49	Média	0.0 <sup>a</sup>	3,162.5 <sup>b</sup>	95.8 <sup>a,c</sup>	62.5 <sup>a,c</sup>	0.0 <sup>a,c</sup>
	D.P	0.0	995.5	64.1	108.1	0.0
	Redução *	0.0	-	<b>97%</b>	<b>98%</b>	<b>100%</b>

866 Controle – não infectados; HC – infectados; HC+CL – infectados e tratados com closantel; HC+Cu – infectados e  
 867 tratados com cápsula de partículas de óxido de cobre; HC+CL+Cu – infectados e tratados com closantel associado  
 868 à cápsula de partículas de óxido de cobre. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de  
 869 óxido de cobre 2 g dose única via oral. \*Percentual de redução da OPG comparado ao grupo HC do respectivo dia.  
 870 Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística (P <0,05; n=6).  
 871

872

873

874

875

876

877 **Tabela 2** – Contagem parasitaria do abomaso de cordeiros experimentalmente infectados com  
 878 *Haemonchus contortus*, tratados ou não com closantel, cobre ou closantel associado ao cobre,  
 879 no dia 50 p.i.

Número de <i>H. contortus</i> no abomaso					
	Controle	HC	HC+CL	HC+Cu	HC+CL+Cu
<b>Média</b>	0.00 <sup>a</sup>	154.20 <sup>b</sup>	3.40 <sup>a,c</sup>	11.2 <sup>a,c</sup>	0.00 <sup>a,c</sup>
<b>D.P</b>	0.00	41.29	3.21	11.25	0.00

880 Controle – não infectados; HC – infectados; HC+CL – infectados e tratados com closantel; HC+Cu – infectados e  
 881 tratados com cápsula de partículas de óxido de cobre; HC+CL+Cu – infectados e tratados com closantel associado  
 882 à cápsula de partículas de óxido de cobre. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de  
 883 óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística (P <0,05;  
 884 n=6).  
 885  
 886  
 887  
 888

889 **Tabela 3** – Concentração plasmática de cobre em cordeiros experimentalmente infectados  
 890 com *Haemonchus contortus*, tratados ou não com closantel, cobre ou closantel associado ao  
 891 cobre.

CONCENTRAÇÃO DE COBRE – PLASMA						
Grupos	Dias	Controle	HC	HC+CL	HC+Cu	HC+CL+Cu
0	Média	1,41 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>	1,33 <sup>a</sup>
	D.P	0,36	0,14	0,15	0,17	0,25
21	Média	1,00 <sup>a</sup>	1,22 <sup>a,b</sup>	0,79 <sup>b</sup>	1,18 <sup>a,b</sup>	0,98 <sup>a,b</sup>
	D.P	0,23	0,12	0,17	0,20	0,27
35	Média	0,90 <sup>a</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>
	D.P	0,14	0,09	0,08	0,11	0,17
49	Média	1,19 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>
	D.P	0,27	0,15	0,10	0,26	0,11

892 Controle – não infectados; HC – infectados; HC+CL – infectados e tratados com closantel; HC+Cu – infectados e  
 893 tratados com cápsula de partículas de óxido de cobre; HC+CL+Cu – infectados e tratados com closantel associado  
 894 à cápsula de partículas de óxido de cobre. Closantel - 1 ml/10 kg dose única via oral; Cápsula de partículas de  
 895 óxido de cobre 2 g dose única via oral. Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística (P <0,05;  
 896 n=6).  
 897

## 4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos muitos trabalhos vêm sendo realizados acerca do controle da infecção por *Haemonchus contortus*, essa enfermidade é um dos principais desafios na criação de ovinos. No Brasil e também em muitos países de primeiro mundo a doença é responsável por significativas perdas econômicas e mortalidade de animais. Entre os principais obstáculos para o controle da infecção podemos destacar a alta capacidade de fecundidade das fêmeas de *H. contortus*, gerando elevada taxa de contaminação ambiental e com isso, um grande desafio parasitário. Outro grande obstáculo que está atrelado é a resistência que esse parasito tem a diversos princípios ativos que leva os produtores rurais a desistir da criação de ovinos devido à falta de alternativas para o controle.

Moléculas antiparasitárias novas levam muitos anos para serem lançadas no mercado devido ao alto custo. Embora novos princípios ativos, como monepantel e mais recentemente derquantel, tenham surgido na última década, os mesmos já possuem relatos de resistência devido à maneira errônea com que são aplicados nos animais. Estudos com métodos alternativos de tratamento estão em desenvolvimento, dentre esses, destaca-se o uso de minerais como as partículas de óxido de cobre que vem demonstrando importante ação anti-helmíntica em animais infectados com *H. contortus*, apresentando taxa de redução de ovos por gramas de fezes (OPG) de até 93%.

Diante desta situação, este estudo associou uma molécula antiparasitária que possui relatos de resistência ao óxido de cobre (COWP) para tratamento de ovinos infectados com *Haemonchus contortus* com o objetivo de alcançar uma eficácia de 100%.

No MANUSCRITO I constatamos que todos os tratamentos foram capazes de reduzir a contagem de OPG após 28 dias de infecção, permanecendo baixa no dia 49 p.i. o que demonstra o potencial uso de closantel e COWP no controle de *H. contortus*, em que todos os tratamentos foram eficazes por um período prolongado podendo assim reduzir a contaminação do pasto. Observamos também menores atividades de BuChE e MPO, demonstrando que o óxido de cobre exerce efeitos antiinflamatórios. Ainda, com relação ao metabolismo energético hepático durante a haemoncose, os tratamentos com Closantel e Closantel associado ao COWP foram capazes de prevenir o comprometimento da bioenergética hepática induzida pela infecção por *H. contortus*.

No MANUSCRITO II observou-se que o tratamento com closantel associado ao COWP foi capaz de eliminar os parasitos do abomaso, já o tratamento somente com COWP apresentou

média de parasitos superior ao tratamento somente com closantel. No entanto, todos os tratamentos foram eficazes quando comparados aos animais não tratados.

A suplementação com as cápsulas de óxido de cobre demonstrou potencializar as defesas antioxidantes, pois comparando-se aos diferentes tratamentos observou-se que o uso do cobre (isoladamente ou associação) aumentou a atividade das enzimas CAT e da SOD, bem como os níveis de GSH e de PSH quando comparado ao uso somente de closantel. Além disso, houve redução da peroxidação lipídica (TBARS) tanto no soro quanto nos tecidos dos animais submetidos ao tratamento com o uso do cobre (isolado ou associado). O aumento da concentração de IgE e IgG nos animais tratados com cobre mostrou incrementar a resposta imune dos animais infectados.

Salienta-se que o uso excessivo de minerais pode levar a toxicidade. No entanto, no presente estudo, os animais tratados não demonstraram nenhum sinal de intoxicação e a concentração de cobre plasmática e hepática dos ovinos que foram tratados com esse mineral estava dentro dos valores de normalidade para a espécie.

Em resumo, o uso de cápsulas de óxido de cobre (isolado ou associado) pode ser considerado uma abordagem interessante para o tratamento de animais infectados por *H. contortus*, pois demonstrou reduzir totalmente a carga parasitária dos animais infectados bem como melhorou as defesas antioxidantes e incrementou a resposta imune dos animais deste estudo.

As perspectivas futuras para esse estudo são testar outros antiparasitários resistentes associados ao óxido de cobre, na tentativa de avaliar se este mineral melhora a eficácia dos compostos que apresentam resistência. Espera-se, assim, ter mais alternativas eficazes no controle do parasito *H. contortus* que acarreta prejuízos econômicos aos produtores de ovinos.

## 5 CONCLUSÕES

Baseados nos dados do Manuscrito I e II conclui-se que as partículas de óxido de cobre (COWP) associadas ao anti-helmíntico closantel são uma alternativa para ovinos infectados com *Haemonchus contortus* tendo em vista que ocorreu um excelente sinergismo do produto comercial ao mineral acarretando redução de 100% na contagem parasitária dos ovinos.

## REFERÊNCIAS

- AMARANTE, A. F. T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: Mattos, W. R. S. (Ed.): **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: Fealq/SBZ, p. 461-473, 2001.
- AMARANTE, A. F. T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**, v. 118, n. 1-3, p. 56-62, 2014.
- ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, Jr., J. F.; STADECKER, M. J. and GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat. Rev. Immunol**, v. 7, p. 975-987. 2007.
- ANDREWS, P. C.; KRINSKY, N. I. Human myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, v. 12, p. 369-378, 1986.
- ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.
- BACON, J. A. et al. Comparative *in vitro* effects of closantel and selected B – ketoamide anthelmintics on a gastrointestinal nematode and vertebrate liver cells. **Journal Veterinary Pharmacology Therapie**, v. 21, p. 190-198, 1998.
- BARGER, I. A.; HALL, E.; DASH, K. M.; Local eradication of *Haemonchus contortus* using closantel. *Australian Veterinary Journal*, n. 68, p. 347-348, 1991.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BENTOUNSI, B.; MERADI, S.; CABARET, J. Towards finding effective indicators (diarrhoea and anaemia scores and weight gains) for the implementation of targeted selective treatment against the gastro-intestinal nematodes in lambs in a steppic environment. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1, p. 275-279, 2012.
- BUYS, J.; WEVER, R. and RUITENBERG, E. J. Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the *in vitro* killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. **Immunology**, v. 51, p. 601-607, 1984.
- BURKE, J. M. Evaluation of multiple low doses of copper oxide wire particles compared with levamisole for control of *Haemonchus contortus* in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 145-149, 2006.
- BURKE, J. M. Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* infection in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 235-243, 2004.
- CADMAN, E. T.; LAWRENCE, R. A. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? **Parasite Immunol**. v. 32, p. 1-19, 2010.

- CHIHUAILAF, R. H.; CONTRERAS, P.; WITTEWER, F. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. **Veterinaria México**, v. 33, n. 3, p. 265-283, 2002.
- CRAIG, TM 2009, Helminth parasites of the ruminant gastrointestinal tract. In: ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M. (Ed.), **Current veterinary therapy: Food Animal practice**, Saunders Elsevier, Missouri: v. 5, p. 84, 2009.
- DA SILVA, A. S. et al. E-ADA activity in erythrocytes of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and its possible functional correlations with anemia. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 3, p. 1026-1030, 2013.
- DOMKE, A. M. et al. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 185-193, 2012.
- ESMAEILNEJAD, B. et al. Evaluation of antioxidant status, oxidative stress and serum trace mineral levels associated with *Babesia ovis* parasitemia in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 38-45 2014.
- ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 779S-785S, 1993.
- FERNANDEZ, L. L. et al. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 218-224, 2007.
- 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.
- FURLAN, F. H.; LUCIOLI, J.; BORELLI, V.; FONTEQUE, J. H.; STOLF, L.; TRAVERSO, S. D.; GAVA, A. Intoxicação por closantel em ovinos e caprinos no Estado de Santa Catarina **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, n. 1, p. 89-93, jan. 2009.
- GALLOWITSCH-PUERTA, M.; PAVLOV, V. A. Neuro immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Life Sci**, v. 80, n. n. 24-25, p. 2325-2329. 2007.
- GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology**, v. 140, n. 12, p. 1506-1522, 2013.
- GONÇALVES, I. G.; ECHEVARRIA, F. A. M. Cobre no controle da verminose gastrointestinal em ovinos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 183-188, jan./fev. 2004.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed., Porto Alegre: UFRGS, 2006.
- GUERRERO, J. Closantel: a Review of its Antiparasitic Activity. **Preventive Veterinary Medical**, v. 2, p. 317-327, 1984.
- HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, p. 10-13, 2000.



- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 715S-724S, 1993.
- HEINECKE, J. W. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. **The FASEB Journal**, 1999.
- JAMBRE, L. F. Pre-mating barriers in hybrid *Haemonchus*. International. **Journal of Parasitology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 371-375, 1983.
- JANEWAY, C. A. Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect**, v. 3, p. 1167-1171, 2001.
- JASMER, D. P.; LAHMERS, K. K.; BROWN, W. C. *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. **Parasite immunology**, v. 29, n. 3, p. 139-151, 2007.
- LEAL, M. L. R. et al. Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, v. 34, p. 549-555, 2010.
- LEAL, M. L. R. et al. Copper and Selenium: auxiliary measure to control infection by *Haemonchus contortus* in lambs. **Experimental Parasitology**, v. 144, p. 39-43, 2014.
- MACHADO, V. et al. Relationship between oxidative stress and pathological findings in abomasum of infected lambs by *Haemonchus contortus*. **Pathology - Research and Practice**, In press, 2014.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios e saúde**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2009.
- MOLENTO, M. B. et al. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 126-132, 2011.
- MICHIELS, M.; MEULDERMANS, W.; HEYKANT, S. The metabolism and fate of closantel (Flukiver) in sheep and cattle. **Drug Metabolism Reviews**, v. 18, p. 235-251, 1987.
- NICHOLLS, S.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 6, p. 1102-1111, 2005.
- NICOLODI, P. R. S. J. et al. Perfil proteico e metabolismo oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. **Ciência Rural**. v. 40, n. 3, p. 561-567, 2010.
- O'CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KAHN, L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 1-15, 2006.
- PIVOTO, F. L. et al. Oxidative stress by *Haemonchus contortus* in lambs: Influence of treatment with zinc edetate. **Research in veterinary science**, v. 102, p. 22-24, 2015.

- PODREZ, E. A.; ABU-SOU, H. M.; HAZEM, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1717-1725, 2000.
- ROSENFELDT, F. et al. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology and therapy. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 1, p. 45-54, 2013.
- RINALDI, M. et al. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 107-125, 2007.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Aust. J. Agri. Res.**, v. 1, p. 99-102, 1950.
- ROCHA, R. A. et al. Sheep and cattle alternately: Nematode parasitism and pasture descontamination. **Small Ruminant Research**, Amsterdam. v. 75, p. 135-143, 2008.
- SCHAFER, A. S. et al. Immune response of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and parenterally treated with a combination of zinc and copper. **Small Ruminant Research**, In press, 2014. doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.10.016.
- SILVA, B. F. et al. Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* grass. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. v. 158, p. 85-92, 2008.
- SWAN, G. E. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 70, n. 2, p. 61-70, 1999.
- TIZARD, I. R. Veterinary Immunology. **Elsevier Saunders**, 9. ed. p. 533, 2013.
- UPPAL, R. P.; YADAV, C. L.; BHUSHAN, C. Efficacy of closantel against fenbendazole and levamisole resistant *Haemonchus contortus* in small ruminants. **Tropical Animal Health and Production**, v. 25, p. 30- 32, 1993.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.
- WAKELIN, D. Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection. **Advances in Parasitology**, Londres, v. 16, p. 219-308, 1978.
- VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. J. F. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste**. Sobral EMBRAPA- CNPC, p. 50, 2002.
- ZUURBIER, K. W; VAN DEN BERG, J. D.; VAN GELDER, B. F.; MUIJSERS, A. O. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, p. 737-742, 1992.

ZAJAC, A. M. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 529-541, 2006.

ZHONG, R. Z. et al. Effects of supplementation with dietary green tea polyphenols on parasite resistance and acute phase protein response to *Haemonchus contortus* infection in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 199-207, 2014.