

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

**ATIVIDADE DE NEUTROFILOS E ESTRESSE  
OXIDATIVO EM CORDEIROS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM *Haemonchus contortus*  
E SUPLEMENTADOS COM SELÊNIO E VITAMINA E**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Emmanuel Veiga de Camargo**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

**ATIVIDADE DE NEUTROFILOS E ESTRESSE OXIDATIVO  
EM CORDEIROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE  
COM *Haemonchus contortus* E SUPLEMENTADOS COM  
SELÊNIO E VITAMINA E**

**por**

**Emmanuel Veiga de Camargo**

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

**Orientadora: Marta Lizandra do Rêgo Leal**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária**

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

**ATIVIDADE DE NEUTROFILOS E ESTRESSE OXIDATIVO EM  
CORDEIROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM  
*Haemonchus contortus* E SUPLEMENTADOS COM SELÊNIO E  
VITAMINA E**

elaborado por  
**Emmanuel Veiga de Camargo**

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

**Comissão examinadora**

**Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dr<sup>a</sup>., UFSM**  
(Presidente/orientadora)

**Sônia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr<sup>a</sup>., UFSM**

**Marcelo Soares, Dr., UFSM**

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2010.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a minha esposa, Jerusa, o grande amor da minha vida, pelo apoio incondicional, pelas palavras sábias e toda a sua confiança na certeza do nosso sucesso.

A minha família, aos meus pais e irmãos, minha gratidão pelo esforço em prol dos meus sonhos.

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

Aos meus amigos e colegas, especialmente ao Diego e ao Jerônimo. Meu muito obrigado.

A todos estagiários da Clínica de Ruminante, que sempre me ajudaram sem medir esforços. Em especial ao Francisco, sentimos saudades de você.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinária, em especial a Professora Sônia, Márcio e Francine que colaboraram na realização das análises.

Ao Laboratório de Bioquímica Toxicológica, em especial ao Prof. João e ao Daniel.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, pela alegre convivência nesses anos.

Ao Professor Marcelo, muito obrigado pelos ensinamentos, sua confiança e amizade.

A CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa.

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

A Deus por me acompanhar nessa etapa da vida.

## RESUMO

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

### ATIVIDADE DE NEUTROFILOS E ESTRESSE OXIDATIVO EM CORDEIROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Haemonchus contortus* E SUPLEMENTADOS COM SELÊNIO E VITAMINA E

AUTOR: EMMANUEL VEIGA DE CAMARGO  
ORIENTADORA: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL  
Santa Maria, 22 de fevereiro de 2010

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, o hemograma e o perfil oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. Foram utilizados 20 cordeiros machos, da raça Corriedale, distribuídos em quatro grupos experimentais com 5 animais: G1- animais infectados com larvas e suplementados com 0,2mg/kg de peso vivo (PV) de selenito de sódio por via intramuscular (IM); G2- animais infectados com larvas e suplementados com 0,2mg/kg PV de selenito de sódio IM e 2000 UI por animal de Vitamina E IM; G3- animais infectados com larvas e suplementados com 2000 UI por animal de Vitamina E IM; G4-animais infectados com larvas. Todos os grupos foram infectados, pela via oral, com 500 larvas L3 de *Haemonchus contortus* por animal a cada dois dias, pelo período de vinte dias a partir do dia zero. Para o hemograma e as análises bioquímicas foram realizadas coletas de sangue nos dias zero (T0), 20 (T1), 40 (T2) e 60 (T3) por venopunção da jugular utilizando-se tubos vacutainer®. As pesagens e a determinação dos ovos por grama de fezes dos animais ocorreram nesses mesmos tempos experimentais. Para as provas de NBT foram coletadas amostras de sangue heparinizadas nos dias zero, 30 e 60. Menores valores de leucócitos totais foram detectados no grupo suplementado exclusivamente com selênio (G1) em relação ao grupo controle (G4) no tempo 4. Em relação aos linfócitos observou-se diminuição no G1 em relação ao suplementado somente com vitamina E (G3) e G4 no tempo 3 (T3). Para ambos os testes, NBT-NE e NBT-E houve uma diminuição da capacidade de redução do corante aos 60 dias em relação aos demais tempos nos grupos tratados com selênio (G1 e G2). Os resultados do perfil oxidativo demonstraram significativa elevação da atividade da enzima GSH-Px nos grupos suplementados com selênio. Ainda, a correlação de Pearson revelou a existência de correlação negativa entre as concentrações de GSH-Px e TBARS e entre esta enzima e os valores de OPG. Incrementos também foram observados para a enzima catalase nos animais que receberam suplementação com selênio ou quando este elemento foi associado a vitamina E. Menores valores de lipoperoxidação lipídica (TBARS) foram detectados nos animais suplementados quando estes foram comparados ao grupo controle. Esses resultados sugerem que as reservas diminutas deste antioxidante podem exacerbar a geração de radicais livres com um aumento da peroxidação lipídica e o aumento da contaminação ambiental pelos ovos de *Haemonchus contortus*. Diante dos resultados é possível concluir que a suplementação com selênio proporciona uma maior proteção antioxidante celular e ao organismo como um todo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus*.

**Palavras chave:** cordeiros, função neutrofilica; hemograma; GSH-Px; TBARS; suplementação

## **ABSTRACT**

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

### **NEUTROPHILS ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS OF EXPERIMENTALLY INFECTED LAMBS BY *Haemonchus contortus* AND SUPPLEMENTED WITH SELENIUM AND VITAMIN E**

AUTHOR: EMMANUEL VEIGA DE CAMARGO  
ADVISOR: MARTA LIAZANDRA DO RÊGO LEAL  
Santa Maria, Fevereiro 22, 2010.

The present work had as its objective to assess the oxidizing metabolism of neutrophils, the complete blood count (CBC) and the oxidizing profile of experimentally infected lambs with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. 20 male lambs were used, of the Corriedale breed, distributed in four experimental groups with 5 animals: G1 – larvae infected animals and supplemented with 0.2mg/kg living weight (PV) of selenite via intramuscular (IM); G2 – larvae infected animals and supplemented with 0.2mg/kg PV of selenite IM and 2000 UI per animal of vitamin E IM; G3 – larvae infected animals and supplemented with 2000 UI per animal of E IM; G4 – larvae infected animals. For the CBC and the biochemical analysis blood collection on the day zero (T0) were carried out, 20 (T1), 40 (T2) and 60 (T3) through jugular venipuncture using vacutainer® tubes. The weighing and the egg determination by gram of animal feces occurred in the same experimental times. For the NBT tests heparinized blood samples were collected in the days zero, 30, 60. Smaller leukocyte values were detected in the supplemented group exclusively with selenium (G1) in relation to the control group (G4) in time 4. Concerning the lymphocytes it was observed a decrease in the G1 in relation to the supplemented only with vitamin E (G3) and G4 in time 3 (T3). For both the tests, NBT-NE and NBT-E there was a decrease in the dye reduction capacity at 60 days in relation to the other times in the groups treated with selenium (G1 and G2). The result of the oxidizing profile showed a significant elevation in the GSH-Px enzyme in the supplemented groups with selenium. Still, the correlation of Pearson revealed the existence of a negative correlation between the concentrations of GSH-Px and TBARS and between this enzyme and the OPG values. Increments were also observed for the catalase enzyme in animal which received the selenium supplementation or when this element was associated to the vitamin E. Smaller values of lipid peroxidation (TBARS) were detected in supplemented animals when these were compared to the control group. These results suggest that the reduced reserves of this antioxidant may exacerbate the generation of free radicals with an increase of the lipid peroxidation and the increase of the environment contamination by the eggs of *Haemonchus contortus*. Facing these results it is possible to conclude that the selenium supplementation provides a larger protection to the cell antioxidant and to the organism as a whole in lambs experimentally infected by *Haemonchus contortus*.

**Key Word:** Lambs, neutrophil function, complete blood count, GSH-Px, TBARS, supplementation.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**TABELA 1 (Table 1)** - Means and standard deviation of hemogram components em EPG counts of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. G1- group infected and supplemented with selenium; G2- group infected and supplemented with selenium and vitamin E; G3- group infected and supplemented with vitamin E; G4- control group infected.....26

**TABELA 2 (Table 2)** - Means and standard deviations of the non-stimulated (NBT-NS) and stimulated (NBT-S) NBT values of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* in the 4 infected groups. G1- supplemented with selenium; G2- supplemented with selenium and vitamin E; G3- supplemented with vitamin E; G4- control, not supplemented.....27

### CAPÍTULO 2

**TABEL 1 (Table 1)** - Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima glutationala peroxidase (GSH-Px) e catalase, espécies reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS), peso e contagens de ovos por grama de fezes (OPG) dos grupos experimentais. G1- grupo infectado e suplementado com selênio; G2- grupo infectado e suplementado com selênio e vitamina E; G3- grupo infectado e suplementado com vitamina E; G4- grupo controle infectado.....41

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>2. CAPÍTULO 1. Neutrophil oxidative metabolism and hemogram of sheep experimentally infected with <i>Haemonchus contortus</i> and supplemented with selenium and vitamin E or association.....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>Material and methods.....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>Results and discussion.....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>Committee of ethics and biosafety.....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>References.....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>3. CAPÍTULO 2. Perfil oxidativo de cordeiros infectados experimentalmente com <i>Haemonchus contortus</i> e suplementados com selênio e vitamina E.....</b>	<b>- 28 -</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>Material e método.....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>- 33 -</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>Comite de ética e biossegurança.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>Referências.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>- 44 -</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os ovinos foram uma das primeiras espécies a serem domesticadas pelo homem. Eles são altamente eficientes, com excelente conversão alimentar, alta produtividade, ciclo reduzido de produção. Por essas características são fundamentais às pequenas propriedades, ajudando a manter o homem no campo.

O mercado da carne ovina esta em franca ascensão. Nos últimos anos têm-se evidenciado um processo sólido de valorização da carne ovina no mercado interno, por meio do crescimento linear nos preços nominais. Porém, a produção de ovinos possui fatores limitantes, sendo a infecção por parasitas gastrintestinais o que mais se destaca.

Os parasitas gastrintestinais são responsáveis por grandes perdas econômicas na ovinocultura, devido à queda da produção e qualidade da lã, redução no ganho de peso e mortalidade de animais infectados (ECHEVARRIA, 1988). Segundo GASBARRE (1997) as perdas anuais nos Estados Unidos da América chegam a US\$ 2 bilhões. Os cordeiros desmamados constituem a categoria etária mais acometida pela verminose e também a de maior valor econômico dentro as cadeia produtiva (ECHEVARRIA et al, 1989). Ovinos até seis meses de idade são altamente predispostos à infecção, pois apresentam baixa resposta imunitária (CHRISTIE, 1970). Segundo FERNANDES et al. (2004), o *Haemonchus contortus* é predominante em diversas regiões do Brasil, onde é considerado o principal parasita de ovinos.

O ciclo de vida do *Haemonchus contortus* envolve uma fase de vida livre e uma parasitária. A primeira ocorre nas pastagens, sendo caracterizada pelo desenvolvimento de um ovo embrionado até a fase de larva infectante (L3). A segunda ocorre pela ingestão da L3 pelo ovino dando prosseguimento ao desenvolvimento larval até a fase adulto. Nesse momento cada fêmea em postura chega a ingerir 0.05ml de sangue ao dia (ORTOLANI, 1997). A patogenia e a grande mortalidade de ovinos acometidos pela Hemoncose são decorrentes da anemia causada pela ingestão de sangue pelos parasitas no abomaso do hospedeiro (MOLENTO et al., 2004). Assim, animais com intensa parasitose, principalmente os jovens, podem apresentar leucopenia (HARNESS et al, 1970; ADAMS, 1993) por linfopenia; perdas protéicas que caracterizam uma hipoproteinemia com hipogamaglobulinemia (SAHAI, 1966). A hematofagia também gera perda de outros elementos figurados sanguíneos, macro e microelementos, vitaminas, hormônios etc.

Os mamíferos respondem à infecção por nematódeos gastrintestinais com uma reação de hipersensibilidade imediata clássica, caracterizada pela secreção de imunoglobulinas E, hiperplasia de mastócitos na mucosa, e marcada eosinofilia periférica e tissular (GARCIA, 2003). O ambiente promovido pelo hospedeiro não é passivo, reage à presença dos parasitas que são confrontados por uma variedade de fatores potencialmente destrutivos, por exemplo, anticorpos, componentes do complemento, citocinas, enzimas lisossomais, bem como células fagocíticas. (WAKELIN et al, 1984).

Os leucócitos têm como mecanismo básico de ação a fagocitose e posterior destruição dos agentes estranhos via mecanismos enzimáticos ou dependentes de oxigênio. Os neutrófilos são células envolvidas na respostas imunes não específicas e são os primeiros a chegar ao local da lesão provocada pelo *Haemonchus contortus* na mucosa abomasal (FELDMAN et al., 2000; SOUZA et al., 2006). Além dessas funções, os neutrófilos ao iniciarem a resposta inflamatória, induzem a ativação e proliferação dos demais leucócitos, em especial os linfócitos (VEER et al., 2007). Existe uma significativa correlação inversa entre a contagem de linfócitos T sobre a fecundidade, tamanho e a sobrevivência da fêmea adulta de *Haemonchus contortus* (ROWE et al., 2008). Esses linfócitos quando ativados pela presença do helminto no lúmen abomasal são capazes de produzir interleucinas (IL-4, IL5, IL13) e IFN- $\gamma$ , que promovem o recrutamento de eosinófilos e proliferação de mastócitos na mucosa abomasal (JASMER, et al., 2007), além de estimularem a proteção específica (IgG) do organismo (LACROUX et al., 2006; MILLER & HOROHOV, 2006).

Entre vários agentes químicos produzidos pelos leucócitos contra os parasitas, citam-se a produção de radicais livres (KAZURA & MESNICK, 1984). Radicais livres é qualquer espécie química de existência independente que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Esta configuração eletroquímica muito instável confere a estas estruturas alta reatividade e vida curta. Uma vez formados os radicais livres interagem com outras moléculas, células e tecidos do organismo, através de reações de oxirredução com o propósito de estabilizar sua configuração eletrônica. Dessa forma ocorrem reações em cadeia de lesão celular (SCHANAIDER, 2000) que termina por alterar a conformação, a estrutura e as funções das proteínas, fosfolipídios de membrana, ácidos nucléicos e outros componentes celulares (RIEGEL, 2002). Esta deteriorização oxidativa dos lipídios polinsaturados das membranas é chamada de lipoperoxidação (NORDBERGER & ARNER, 2001).

A classificação dos radicais livres se dá pelo grupo funcional presente em sua molécula, porém os processos aeróbicos que envolvem o oxigênio são os mais comuns e seus

produtos são denominados de espécies reativas do oxigênio (ERO) (CHIHUAILAF et al., 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

As ERO incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HERSHKO, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Em relação à resposta inata, os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) atacam os parasitas e secretam substâncias microbicidas para matar organismos que são muito grandes para serem fagocitados (ABBAS et al, 2003). A atividade dos neutrófilos envolve dois eventos celulares: a explosão respiratória, iniciada pela ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), e a degranulação (JAIN, 1993). A enzima NADP oxidase, depois de ativada, localiza-se na membrana plasmática, incorporando-se dentro do vacúolo fagocítico, catalisando a redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) em superóxido aniônico, o qual é fundamental para atividade microbicida neutrofilica (MAUG, 1973). A produção de ERO (incluindo o ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio) pelo sistema fagocítico desempenha papel fundamental na tentativa dos ovinos em expulsar os *Haemonchus contortus* do lúmen abomasal (KOTZE, 2003). A atividade oxidativa dos neutrófilos pode ser mensurada pela redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT) (COSTA, 2004).

Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agente óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986 ; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A GSH-Px é assinalada como o principal sistema antioxidante do organismo, inativando derivados ERO do metabolismo aeróbico, sendo responsável pela proteção da membrana das células que funcionam em presença de oxigênio (MILLER et al, 1993). Esta enzima também participa da cadeia de reações que catalizam a formação de prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (STADTMAN,

1990), e se relaciona com o funcionamento normal do sistema imunológico (HURLEY & DOANE, 1989). A presença de selênio (Se) na estrutura da enzima permite que exista uma alta relação entre a concentração sanguínea e tissular de Se com a atividade da GSH-Px. A deficiência de Se induz a uma baixa atividade da GSH-Px, deixando as células exposta a ação nociva das ERO, o que produz alterações na estrutura de lipídios, proteínas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas celulares (MILLER et al, 1993).

A vitamina E (alfa-tocoferol) é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares (KAY et al., 1986). A vitamina E é capaz de quelar formas reativas de oxigênio, diminuindo a formação de peróxidos por inibir a NADPH oxidase de fagócitos, já que muitas dessas moléculas são auto-tóxicas, e podem destruir neutrófilos e macrófagos (BUTTERICK, 1983; SHARMANOV et al., 1990). Dessa forma, essa vitamina protege a membrana lipídica, receptores e outros componentes celulares envolvidos na modulação da resposta imunológica (MEYDANI, 1995).

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

Ainda com relação aos neutrófilos, a suplementação com selênio e vitamina E, demonstrou um aumento significativo da quimiotaxia, migração celular, da habilidade fagocítica (melhor estabilidade das membranas) e poder bactericida (maior produção de peróxidos de hidrogênio) dessas células (MEYDANI, 1995).

O selênio e a vitamina E, dois elementos quimicamente diferentes, com propriedades antioxidantes individuais, têm o mesmo objetivo no sistema biológico (UNDERWOOD & SUTLLE, 1999). Ambos protegem as membranas celulares da degeneração oxidativa. A vitamina E e a glutathione peroxidase atuam em locais diferentes. A primeira é parte integrante das membranas lipídicas e a segunda atua no citosol. (MCDOWELL, 1996). SMITH et al. (1986) demonstraram que dieta suplementada com vitamina E e Selênio foi importante para manter os mecanismos de defesa do organismo, incluindo a produção de anticorpos, proliferação celular, produção de citocinas, metabolismo das prostaglandinas e função das células do sistema inato de defesa imune em vacas leiteiras. O perfeito funcionamento desses

mecanismos é indispensável aos ovinos na tentativa de resistir a infecção parasitária (DEGER et al., 2008).

A erradicação do *Haemonchus contortus* é, na maioria dos casos, impraticável e geralmente desnecessária para que se possa controlá-lo. O sucesso de um programa de controle parasitário não depende somente de um esquema de tratamento eficaz, mas também de uma combinação de práticas de manejo que possam ser adotadas em várias ocasiões. Aliado a utilização criteriosa de anti-helmínticos, se faz necessário o uso de elementos que possam potencializar a resistência do animal frente às ações nocivas desse parasita. Nesse sentido, o selênio e a vitamina E tem sido foco de pesquisas por exercer estímulo ao sistema imune de ovinos. Resultados prévios demonstraram que esses elementos, quando em deficiência, afetam negativamente as habilidades dos animais em desenvolver competência imune frente à Hemoncose.

Face à escassez de informações concretas acerca da resposta de ovinos suplementados com selênio e vitamina E, quando estes passam pelo desafio parasitário, este trabalho objetiva avaliar o efeito da suplementação com esses elementos na a atividade neutrofílica e perfil oxidativo de cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus*. Nessa dissertação o experimento foi dividido em dois artigos e serão apresentados sob a forma de capítulos.

## 2. CAPÍTULO 1

### **Neutrophil oxidative metabolism and hemogram of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E or association**

Emmanuel Veiga de Camargo<sup>a</sup>; Sônia Terezinha dos Anjos Lopes<sup>a</sup>; Marcio Machado Costa<sup>a</sup>;  
Francine Paim<sup>a</sup>, Clarissa Strieder Barbosa<sup>a</sup>; Marta Lizandra R. Leal<sup>ab</sup>

(Artigo aceito para publicação no Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition  
DOI: 10.1111j.1439-0396.2010.00986.x)

<sup>a</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria,  
RS 91105900, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa  
Maria, RS 91105900, Brasil

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate neutrophil oxidative metabolism and hemogram in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E. Twenty male Corriedale sheep were utilized and distributed into four experimental groups each with 5 animals infected with larvae: G1- supplemented with sodium selenite, 0.2 mg/kg body weight (bw) given intramuscularly (IM); G2- supplemented with sodium selenite and vitamin E, 0.2 mg/kg bw and 2000 IU per animal, respectively, both IM; G3- supplemented with vitamin E, 2000 IU per animal IM; G4- not supplemented. A hemogram and the number of parasite eggs were determined in samples of blood and feces, respectively, on days zero (T0), 20 (T1), 40 (T2) and 60 (T3), and NBT assays were performed on heparinized blood samples taken on days zero, 30 and 60. A lower total leukocyte count was detected in G1 in relation to G4 at T4. Lymphocytes were reduced in G1 in relation to G3 and G4 at T3. In both non-stimulated (NBT-NS) and stimulate (NBT-S) dye reduction assays, there was reduced activity at 60 day in relation to other times in the groups treated with selenium (G1 and G2). Based on the results obtained, we conclude that supplementation with selenium provides better antioxidant protection to neutrophils.

**Key words:** sheep, neutrophil function, hemogram, supplementation.

## INTRODUCTION

Gastrointestinal parasitism by *Haemonchus contortus* (HC) is responsible for large production losses in the breeding of small ruminants. The pathogenicity is associated with hematophagy, producing losses of blood and other blood cell components (Jain, 1986). Thus, animals with intense parasitosis can show alterations associated with the hemogram such as

decreased erythrogram values. Utilizing the immune response as an auxiliary tool to combat infection by HC can delay the phenomenon of resistance, besides reducing the residues of frequent anti-helminthic treatments.

A basic mechanism of action of neutrophils is phagocytosis and destruction of foreign agents by enzymatic or oxygen-mediated activities. These leukocytes are involved in the nonspecific immune response, and they are the first to arrive at the lesion caused by HC (Feldman et al., 2000; Souza et al., 2006). The killing mode of action of neutrophils involves respiratory burst (Jain, 1986), where molecular oxygen ( $O_2$ ) is reduced forming reactive oxygen species (ROS) which are essential in neutrophil activity (Maug, 1973), since these ROS cause secondary reactions capable of destroying the parasite (Babior, 1978; Zinkl & Kabbur, 1997). In vitro studies by Mackenzie et al. (1981) utilizing the nematodes *T. spiralis* and *N. brasiliensis* and by Dennis et al. (1988) with *Strongylus vulgaris* showed the adherence of neutrophils to the surface of the helminths and activation of this oxidative metabolism.

The evaluation of the oxidative potential of neutrophils through the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) to a formazan is an indirect manner of measuring the capacity of these cells to be active to respond to infection (Miller & Kaplan, 1970, Costa, 2004).

As a result of the aggressive nature of the host, neutrophils initiate an inflammatory response and induce the activation of the other leukocytes, especially lymphocytes (Veer et al., 2007). Based on the results of Rowe et al. (2008), there is a significant inverse correlation between T lymphocyte count and fecundity, size and survival of adult HC females. These lymphocytes when activated by the presence of helminths in the abomasal lumen are capable of producing interleukins (IL-4, IL5, IL13) and IFN- $\gamma$ , which promote the recruitment of eosinophils and proliferation of mast cells in the abomasal mucosa (Jasmer, et al., 2007), besides stimulating the specific protection (IgG) of the animal (Lacroux et al., 2006; Miller & Horohov, 2006).

Selenium and vitamin E act synergistically with the main aim of protecting cell membranes from oxidative degeneration (Underwood & Suttle, 1999). Vitamin E is lipid soluble and capable of scavenging ROS in the membranes, diminishing the formation of peroxides. On the other hand, this vitamin protects the lipid membrane, receptors and other cellular components involved in the modulation of the immune response (Meydani, 1995). However, selenium acts through the glutathione system (GSH) to inactivate ROS from aerobic metabolism before they can cause damage, protecting membranes that function in the presence of oxygen (Miller et al., 1993). GSH also participates in a chain of reactions of arachidonic acid derivatives and is related to the normal functioning of the immune system (Hurley & Doane, 1989). Therefore, animals supplemented with these agents display a better response when faced with a parasitic challenge (Miller & Horohov, 2006). For this purpose, the utilization of the “circulating status” of the cells of the innate immune system and their bactericidal capacity were described by Aimee & Villamor (2007) as an indirect way of determining the influence of nutritional supplementations in proliferation, differentiation and cellular activation.

This work examined the hypothesis that the inflammatory process that occurs in response to a parasitic infection produces oxidative stress resulting in tissue damage and lesions, and that supplementation with selenium and vitamin E can make blood cells less susceptible to this damage, improving immunological competence and the response capacity of the host. The aim of this study was to evaluate neutrophil oxidative metabolism and hematological parameters in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and vitamin E.

## **MATERIAL and METHODS**

In the present study, 20 male sheep of the Corriedale breed, 6 months old, were utilized, and they were distributed into four experimental groups of animals infected with *Haemonchus contortus* (HC) larvae: G1 (n=5), supplemented with 0.2 mg/kg body weight (bw) of sodium selenite; G2 (n=5), supplemented with 0.2 mg/kg bw sodium selenite and 2000 IU per animal of vitamin E; G3 (n=5), supplemented with 2000 IU per animal of vitamin E; and G4 (n=5), no supplements given. Supplementation with sodium selenite (Merck®), given intramuscular (IM), was done 30 days before the start of the experiment (T-30) and on day zero (T0). Vitamin E (MONOVIN E®-acetate of DL- $\alpha$ -tocopherol) (IM) was administered on days zero and 30.

Before experimental infection, for 40 days, the animals were confined in collective stalls (one stall for each group) located in the Hospital Veterinario Universitario of UFSM, for adaptation to the diet and experimental environment. During this period, the sheep received anti-helminthic treatment with closantel plus albendazole combination (CLOSALBEN).

All groups were infected orally with 500 larvae (L3) of *Haemonchus contortus* per animal every two days, for a period of 20 days starting at T0. The larvae were from the coproculture of animals infected only by this parasite.

Blood samples were collected to obtain a hemogram, and blood was drawn by venipuncture of the jugular vein utilizing Vacutainer® tubes with sodium EDTA on days zero (T0), 20 (T1), 40 (T2) and 60 (T3). The erythrocyte and leukocyte counts were performed in a Neubauer chamber, and the concentration of hemoglobin was determined with a colorimetric kit (Labtest®) with the absorbance read at 540 nm. MCV and MCHC were utilized as RBC indices, leukocyte differential count was carried out on blood smears, and reticulocytes were counted according to the techniques recommended by Jain (1986). Neutrophil oxidative metabolism was determined by means of cytochemical assays, namely reduction of *nitroblue*

*tetrazolium*, under non-stimulated (NBT-NS) and stimulated (NBT-S) conditions, in blood samples obtained by jugular venipuncture, where 1 ml of blood was drawn utilizing 25 x 0.8 mm needles and tubes containing 20 µL of heparin. Oxidative metabolism was measured immediately after blood was drawn on days zero, 30 and 60 by counting 200 neutrophils per slide, done in duplicate, in accordance with the technique described by Park & Good (1970).

To verify infestation by *Haemonchus contortus*, eggs per gram feces (EPG), was determined, where feces were collected directly from the rectal ampulla on days zero (T0), 20 (T1), 40 (T2) and 60 (T3) and processed according to the technique modified by Gordon & Whitlock (1939).

Statistical analysis was carried out with the help of the program SAS System for Windows (SAS, 2000). The data obtained were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test for comparison between paired means. The data for EPG and number of monocytes and eosinophils were log transformed before analysis. The data were displayed as means and standard deviations. The level of significance was set at 5%.

## **RESULTS and DISCUSSION**

The results obtained in this study are shown in Tables 1 and 2. The highest EPG values were observed at T1, T2 and T3 in relation to time zero in all experimental groups (Table 1) characterizing the success of the experimental infection with HC.

With respect to the erythrogram (Table 1), lower erythrocyte counts were observed at T1 of G4 in relation to the other groups. Higher hematocrit and MCV values were obtained in G1 and G2 in relation to G3 and G4 at T2. Higher hemoglobin levels were detected at T2 of G3 when compared to G1, G2 and G4. However, the values of the erythrogram parameters remained within the physiological range established for this (ovinos) (Jain, 1986)

Different results were obtained by Nicolodi (2008) with selenium and vitamin E supplementation in sheep experimentally infected by HC, and by Mattos et al. (2005) with such supplementation in goats naturally infected by HC. These authors observed a marked decrease in erythrogram values. However, the discrete variation in the erythrocyte count, hematocrit, hemoglobin and MCV, demonstrated in this study, is probably due to the different parasite loads shown by the animals, where it was less than that in other works carried out in sheep infected by HC. Pisek et al. (2008) on supplementing ewes in pre- and post-partum with organic and inorganic selenium, and Bednarek et al. (1996) on administering selenium and vitamin E to healthy calves, also demonstrated that there was no influence of these supplements on the erythrogram.

With regard to the components of the leukogram, higher total leukocyte counts were observed in the infected animals supplemented with Se (G1) at T0, where the neutrophils were responsible for the increase in the total leukocyte count (Table 1). It is possible that these results are related to the administration of Se at thirty days prior to the start of the experiment. Since the animals in this period were not parasitized by HC, this supplement provided a greater stimulation of the production of these cells. According to Ramirez-Bribiesca et al. (2005), the peak of selenium action can occur up to 60 days after application, suggesting that the second dose of selenium, utilized at the beginning of the experiment, probably promoted a greater antioxidant protection of neutrophils, as observed in other experimental studies (Rooke et al. 2004). At T3, there was a significant decrease in total leukocytes in G1 in relation to G2 and G4. This decrease is related to the fall in the number of lymphocytes, since selenium activates cyclooxygenase to produce arachidonic acid derivatives which have deleterious and inhibitory effects on lymphocyte replication (Rooke et al., 2004).

The increase in the number of lymphocytes in the group supplemented with vitamin E when compared to animals that received only selenium (G1) is due to the protection of the lipid membrane, receptors and other cellular components involved in the modulation of the immune response promoted by vitamin E (Meydani, 1995).

Synergism between selenium and vitamin E has been demonstrated by the significant increase in lymphocyte counts in healthy sheep (Larsen et al., 1988) and pregnant sows (Mavromatis et al., 1999), but was not seen in this experiment. Lymphocytes are considered the population of cells most sensitive to ROS due to the high level of free fatty acids in their membranes (Nemec, 1990). We expected a significant increase in the number of lymphocytes in sheep parasitized by HC and supplemented with a combination of selenium and vitamin E, when compared to animals in the control group and those supplemented with only selenium or vitamin E. Our actual findings suggest that selenium and vitamin E when given in combination are antagonistic.

Statistical differences were also observed in neutrophil oxidative function in the experimental groups (Table 2). In the NBT-NS test, there was a decrease in NBT reduction capacity by neutrophils in G1 in relation to G3 and G4 at 60 days. With respect to reduction in the NBT-S assay, lower values were detected in G1 compared to G4 at 60 days and in G2 in relation to G4 at 30 days. These results were higher than those of Milad et al. (2001) in ewes in the pre-partum period treated with selenium and vitamin E and of those observed by Lopes et al. (2003) in goats with *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and treated with vitamin E only. Suggested that the animals supplemented only with selenium (G1) obtained greater antioxidant protection even when stimulated to produce large amounts of ROS in the NBT-S assay, supporting the observations of Finch & Turner (1996) that selenium is truly more effective than vitamin E with respect to the microbicidal activity of these cells.

## **CONCLUSION**

Under the conditions in which this study was carried out, it is concluded that selenium provides a greater capacity of antioxidant protection to neutrophils of animals experimentally parasitized by *Haemonchus contortus*.

## **COMMITTEE OF ETHICS and BIOSAFETY**

The study was approved by the Committee of Ethics in Research of the Universidade Federal de Santa Maria, process number: 061/2008.

## **REFERENCES**

- Aimee, L.W.; Villamor, E., 2007: Update: Effects of antioxidant and non-antioxidant vitamin supplementation on immune function. *Nutrition Reviews*. 64, 181-217.
- Babior, B.M., 1978: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New England Journal of Medicine*. 298, 659-668.
- Bednarek D.; Kondracki M.; Cakala S., 1996: Untersuchungen über den einfluss von selen und vitamin E auf rotes weisses blutbild, serum Konzentration einiger mineralstoffe und spurenelemente sowie immunologische parameter beim kalb. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 103, 457-459.
- Costa J.N.; Peixoto A.P.C.; Kohayagawa A.; Ferreira A.F.M.S.C.F.; Cassetari M.L.; Crocci A.J., 2004: Influência do desenvolvimento etário e da suplementação com vitamina E (acetato de DL-alfa-tocoferol) no metabolismo oxidativo de neutrófilos de bovinos da raça holandesa. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 41, .293-298.
- Dennis V.A.; Klei T.R.; Chapman M.R.; Jeffers G.W., 1988: In vivo activation of equine eosinophils and neutrophils by experimental *Strongylus vulgaris* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 20, 61-74.

Feldman, B.F.; Zinkl J.G.; Jain N.C., 2000: Schalm's Veterinary Hematology, Fifth ed. Williams & Wilkins, Philadelphia, EUA.

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

Gordon H.M.; Whitlock H.V., 1939: A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal Council Science In Australian*. 12, 50-52.

Hurley W.L.; Doane R.M., 1989: Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *Journal of Dairy Science*. 72, 784-804.

Jain N.C., 1986: Schalm's veterinary hematology. Fifth ed. Lea & Febinger, Philadelphia, EUA.

Jasmer D.P.; Lahmers K.K.; Brown W.C., 2007: *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. *Parasite Immunology*. 29, 139-151.

Lacroux C.; Nguyen T.H.C.; Andreoletti O.; Prevot F.; Grizes C.; Bergeaud J.P.; Gruner L.; Brunel J.C.; Francois D.; Dorchies P.; Jacquet P., 2006: *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research*. 37,607-622.

Larsen H.J.; Overnes G.; Moksnes K., 1988: Effect of selenium on sheep lymphocyte responses to mitogens. *Research in Veterinary Science*. 45, 11-15.

Lopes S.T.A.; Paes P.R.O.; Kohayagawa A.; Lopes R.S.; Bulla C.; Langrafe L., 2003: Atividade funcional neutrofílica em cabras com mastite por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetate DL- $\alpha$ -tocoferol). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 55, 515-521.

Mattos M.J.T.; Oliveira C.M.B.; Lustosa A.; Lacerda A.; Terra S., 2005: Influência do parasitismo por nematódeos sobre o perfil hematológico de caprinos. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57, 133-135.

- Maug J.H., 1973: Singlet oxygen: A unique microbicidal agent in cells. *Science*. 182,44.
- Mackenzie C.D.; Jungery M.; Taylor P.M.; Olgivie B.M., 1981: The *in vitro* interaction of eosinophils, neutrophils, macrophages and mast cells with nematode surfaces in the presence of complement or antibodies. *Journal of Pathology*. 133, 161-175.
- Mavromatis J.; Koptopoulos G.; Kyriakis S.C.; Papasteriadis A.; Saoulidis K., 1999: Effects of  $\alpha$ -tocopherol and selenium on pregnant sows and their piglets' immunity and performance. *Journal Veterinary Medicine*. 46, 545-553.
- Meydani M., 1995: Vitamin E. *The Lancet*. 345, 170-175.
- Milad K.; Racz O.; Sipulova A.; Bajova V.; Kovac G., 2001: Effect of vitamin E and selenium on blood glutathione peroxidase activity and some immunological parameters in sheep. *Veterinary Medicine Czech*. 46, 1-5.
- Miller D.R.; Kaplan H.G., 1970: Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. *Pediatrics*. 45, 861-865.
- Miller J.K.; Brzezinska-Slebozinska E.; Madsen F.C., 1993: Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*. 76, 2812-2823.
- Miller J.E.; Horohov D.W., 2006: Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal Animal Science*. 84, 124-132.
- Nemec M.; Hidioglou M.; Nielsen K.; Proulx J., 1990: Effect of vitamin E and selenium supplementation on some immune parameters following vaccination against brucellosis in cattle. *Journal Animal Science*. 68, 4303-4309.
- Nicolodi P.R.S.J., 2008: Efeito do selênio e da vitamina E sobre o hemograma, proteinograma e metabolismo oxidativo de cordeiros infectados experimentalmente pelo *Haemonchus contortus*. 72f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- Park B.H.; Good R.A., 1970: NBT test stimulated. *Lancet*. 2, 616.

Pisek L.; Travnicek J.; Salay J.; Kroupova V.; Soch M., 2008: Changes in white cells in sheep blood during selenium supplementation. *Veterinarni Medicina*. 53, 255-259.

Ramirez-Bribiesca, E.; Hernandez-Camacho E.; Hernandez-Calva L.; Tortora-Perez J.L., 2004: Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sódio em la mortalidad de cordeiros y los valores hemáticos de selênio. *Agrociencia* 38, 43-51.

Rooke J.A.; Robinson J.J.; Arthur J.R., 2004: Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. *Journal of Agricultural Science* 142, 253-262.

Rowe A.; Gondro C.; Emery D.; Sangster N., 2008: Genomic analyses of *Haemonchus contorts* infection in sheep: Abomasal fistulation and two *Haemonchus* strains do not substantially confound host gene expression in microarrays. *Veterinary Parasitology*. 154, 71-81.

Souza C.; Lopes S.T.A.; Batina P.N.; Cecim M.; Cunha C.M.; Conrado A.C.; Beck A., 2006: Estresse parasitário em cabras Saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. *Veterinária Notícia*. 12, 17-23.

Underwood E.J.; Suttle N.F.; 1999: *The Mineral Nutrition of Livestock*. Third ed. CABI, Wallingford.

Veer M.J.; Kemp J.M.; Meeusen N.T., 2007: The innate defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*. 29, 1-9.

Zinkl J.G.; Kabbur M.B., 1997: Neutrophil function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego. 285-302.

**Table 1-** Means and standard deviation of hemogram components em EPG counts of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. G1- group infected and supplemented with selenium; G2- group infected and supplemented with selenium and vitamin E; G3- group infected and supplemented with vitamin E; G4- control group infected.

Grupo	Tempo	Eritrócitos x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	Hemoglobina g/dl	Hematócrito %	VCM fl	Leucócitos /mm <sup>3</sup>	Neutrófilos /mm <sup>3</sup>	Linfócitos /mm <sup>3</sup>	OPG
G1	T0	9.18 ±1.19 <sup>a</sup>	10.14±0.80 <sup>a</sup>	32.9±2.16 <sup>a</sup>	36.11±4.16 <sup>a</sup>	9220±1446.37 <sup>a</sup>	4188±1649.97 <sup>a</sup>	4811±1069.3 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	T1	7.76±0.90 <sup>ab</sup>	10.35±0.71 <sup>a</sup>	32.6±2.07 <sup>a</sup>	42.02±4.62 <sup>a</sup>	7400 ±1079.35 <sup>a</sup>	3007 ±766.65 <sup>a</sup>	4289 ±785.23 <sup>a</sup>	440±151.67 <sup>a</sup>
	T2	8.81±0.90 <sup>a</sup>	9.92±0.71 <sup>a</sup>	29.2±1.3 <sup>b</sup>	33.45±4.62 <sup>b</sup>	9120 ±3943.60 <sup>a</sup>	4989 ±2283.04 <sup>a</sup>	3947±2020.4 <sup>a</sup>	3840±1947.56 <sup>a</sup>
	T3	8.82 ±1.15 <sup>a</sup>	10.51±0.37 <sup>a</sup>	32.6±1.14 <sup>a</sup>	37.44±5.03 <sup>a</sup>	5800 ±966.95 <sup>b</sup>	3128 ±1603.97 <sup>a</sup>	2586±980.98 <sup>b</sup>	3820±2055.97 <sup>a</sup>
G2	T0	9.31 ±2.88 <sup>a</sup>	10.9±1.35 <sup>a</sup>	32.6±5.27 <sup>a</sup>	36.11±5.13 <sup>a</sup>	7340 ±1327.78 <sup>b</sup>	3114±1257.57 <sup>ab</sup>	4026±1189.1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	T1	8.98 ±1.62 <sup>a</sup>	10.74±1.39 <sup>a</sup>	33.2±4.32 <sup>a</sup>	37.27±2.89 <sup>a</sup>	6400 ±1372.95 <sup>a</sup>	2770 ±871.51 <sup>a</sup>	3435±1484.9 <sup>a</sup>	320±164.31 <sup>a</sup>
	T2	9.55 ±0.59 <sup>a</sup>	10.11±0.69 <sup>a</sup>	30.6±1.34 <sup>b</sup>	32.08±1.46 <sup>b</sup>	8280 ±2393.12 <sup>a</sup>	5289 ±2109.99 <sup>a</sup>	2729±620.66 <sup>a</sup>	2580±1331.16 <sup>a</sup>
	T3	8.42 ±1.69 <sup>a</sup>	9.99±0.74 <sup>a</sup>	33 ±3.16 <sup>a</sup>	37.27±3.87 <sup>a</sup>	7600 ±1941.65 <sup>a</sup>	3735 ±1835.93 <sup>a</sup>	3737±464.18 <sup>ab</sup>	2800±1120.27 <sup>a</sup>
G3	T0	9.26 ±1.49 <sup>a</sup>	9.26±1.49 <sup>a</sup>	34 ±4.52 <sup>a</sup>	36.98±3.51 <sup>a</sup>	6820 ±1423.73 <sup>b</sup>	2566 ±496.926 <sup>b</sup>	4125±1461.96 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	T1	9.26 ±1.49 <sup>a</sup>	9.26±1.49 <sup>a</sup>	34.6 ±1.81 <sup>a</sup>	43.83 ±2.93 <sup>a</sup>	7780 ±1633.10 <sup>a</sup>	3502 ±1223.02 <sup>a</sup>	4246 ±860.30 <sup>a</sup>	180 ±192.35 <sup>b</sup>
	T2	9.56 ±1.48 <sup>a</sup>	10.54±0.72 <sup>a</sup>	31.6 ±2.70 <sup>a</sup>	40.15 ±3.21 <sup>a</sup>	7680 ±3401.76 <sup>a</sup>	4555 ±3676.05 <sup>a</sup>	2961 ±507.08 <sup>a</sup>	3980±3029.36 <sup>a</sup>
	T3	10.5 ±0.67 <sup>b</sup>	9.88±1.26 <sup>a</sup>	32.2 ±3.34 <sup>a</sup>	38.49 ±4.30 <sup>a</sup>	6820 ±881.47 <sup>ab</sup>	2606 ±340.32 <sup>a</sup>	4119 ±943.30 <sup>a</sup>	3880±2784.24 <sup>a</sup>
G4	T0	7.52 ±1.71 <sup>a</sup>	9.95 ±2.18 <sup>a</sup>	31 ±5.09 <sup>a</sup>	42.09±5.76 <sup>a</sup>	6140 ±971.08 <sup>b</sup>	2712 ±630.83 <sup>ab</sup>	3336 ±824.83 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	T1	7.26 ±1.42 <sup>b</sup>	10.06 ±0.6 <sup>a</sup>	32.2 ±1.78 <sup>a</sup>	45.24±5.96 <sup>a</sup>	6920 ±1472.07 <sup>a</sup>	8844 ±970.18 <sup>a</sup>	3137 ±694.66 <sup>a</sup>	360 ±194.93 <sup>ab</sup>
	T2	9.07 ±1.53 <sup>a</sup>	10.29 ±0.65 <sup>a</sup>	33.6 ±2.3 <sup>a</sup>	37.73±5.50 <sup>a</sup>	8580 ±3534.40 <sup>a</sup>	4438 ±1423.43 <sup>a</sup>	3513 ±2040.55 <sup>a</sup>	1740 ±492.95 <sup>a</sup>
	T3	9.36 ±1.30 <sup>a</sup>	10.84 ±0.48 <sup>a</sup>	31.8 ±0.83 <sup>a</sup>	34.53±5.26 <sup>a</sup>	7580 ±697.85 <sup>a</sup>	3410 ±1362.93 <sup>a</sup>	3923 ±1109.07 <sup>a</sup>	2460±1057.36 <sup>a</sup>

T0- day zero; T1- day 20; T2- day 40; T3- day 60. Different letters denote statistical difference between the values, and should be analyzed comparing the same periods between the different groups.

**Table 2** - Means and standard deviations of the non-stimulated (NBT-NS) and stimulated (NBT-S) NBT values of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* in the 4 infected groups. G1- supplemented with selenium; G2- supplemented with selenium and vitamin E; G3- supplemented with vitamin E; G4- control, not supplemented.

Group	Time	NBT-NS %	NBT-S %
G1	0	8.40 ±4.56 <sup>a</sup>	12.80 ±4.14 <sup>a</sup>
	30	9.00 ±3.93 <sup>a</sup>	8.80 ±3.70 <sup>ab</sup>
	60	4 ±1.87 <sup>b</sup>	3.40 ±1.81 <sup>b</sup>
G2	0	11.60 ±3.28 <sup>a</sup>	11.20 ±1.78 <sup>a</sup>
	30	10.20 ±2.04 <sup>a</sup>	8.00 ±2.34 <sup>b</sup>
	60	7.80 ±3.49 <sup>ab</sup>	7.80 ±3.49 <sup>ab</sup>
G3	0	9.80 ±4.14 <sup>a</sup>	11.20 ±3.63 <sup>a</sup>
	30	9.00 ±3.31 <sup>a</sup>	10.20 ±1.48 <sup>ab</sup>
	60	8.60 ±1.94 <sup>a</sup>	9.80 ±1.48 <sup>ab</sup>
G4	0	8.6 ±3.28 <sup>a</sup>	9 ±4.35 <sup>a</sup>
	30	9.4 ±6.06 <sup>a</sup>	12.8 ±4.60 <sup>a</sup>
	60	9.8 ±3.63 <sup>a</sup>	10.80 ±5.35 <sup>a</sup>

Different letters denote statistical difference between the values, and should be analyzed comparing the same periods between the different groups.

### **3. CAPÍTULO 2**

#### **ESTRESSE OXIDATIVO EM CORDEIROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Haemonchus contortus* E SUPLEMENTADOS COM SELÊNIO E VITAMINA E**

**Emmanuel Veiga de Camargo<sup>a</sup>; João Batista Teixeira da Rocha<sup>c</sup>; Daniel  
Henrique Ross<sup>c</sup>; Marcelo Beltrão Molento<sup>d</sup>; Marta Lizandra R. Leal<sup>ab</sup>**

(Artigo a ser submetido a tradução e posterior submissão ao Journal of Animal Physiology  
and Animal Nutrition)

<sup>a</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, RS 91105900, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 91105900, Brasil

<sup>c</sup>Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 91105900, Brasil

<sup>d</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

## **RESUMO**

Com o objetivo de avaliar o perfil oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E, foram utilizados 20 cordeiros machos, da raça Corriedale, com seis meses de idade, distribuídos em quatro grupos experimentais com 5 animais: G1- animais infectados com larvas e suplementados com 0,2mg/kg de peso vivo (PV) de selenito de sódio por via intramuscular (IM); G2- animais infectados com larvas e suplementados com 0,2mg/kg PV de selenito de sódio IM e 2000 UI por animal de Vitamina E IM; G3- animais infectados com larvas e suplementados com 2000 UI por animal de Vitamina E IM; G4-animais infectados com larvas. Todos os grupos receberam 500 larvas na fase L3 de *Haemonchus contortus* a cada dois dias por um período de vinte dias a partir do dia zero. Para as análises bioquímicas e avaliação do OPG foram realizadas coletas de sangue e fezes, respectivamente, nos dias zero (T0), 20 (T1), 40 (T2) e 60 (T3). A pesagem dos animais foi realizada nos mesmos períodos experimental. Menores valores de TBARS foram observados nos animais suplementados quando comparados ao do grupo controle. Houve aumento expressivo na atividade da enzima GSH-Px nos grupos suplementados com selênio. Maiores concentrações eritrocitárias da enzima catalase foram detectadas nos animais suplementados com selênio e vitamina E. Correlação negativa foi obtida entre as concentrações de GSH-Px e TBARS e entre GSH-Px e os valores de OPG. A suplementação com selênio foi mais efetiva em proporcionar uma maior proteção antioxidante ao organismo de cordeiros frente ao estresse oxidativo gerado pela infecção experimental com *H. contortus*.

**Palavras chave:** Cordeiros, estresse oxidativo, selenito de sódio, vitamina E.

## INTRODUÇÃO

O parasitismo gastrointestinal pelo *Haemonchus contortus* (***H. contortus***) é o principal responsável por perdas produtivas na criação de pequenos ruminantes (Bambou et al., 2008). O ambiente promovido pelo hospedeiro não é passivo, reage à presença dos parasitas mediante fatores potencialmente destrutivos (Woodbury et al., 1984) como as espécies reativas do oxigênio (ERO) que lesiona o parasita e, conseqüentemente, gera estresse oxidativo

As ERO incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Hershko, 1989) quando da infecção pelo ***H. contortus*** (Abbas & Lichtman, 2003; Kotze, 2003).

É essencial o equilíbrio entre agente óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Para proteger-se, a célula possui uma linha de defesa antioxidante constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa é constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e também pela GSHPx.

A GSH-Px é assinalada como o principal sistema antioxidante do organismo (Miller et al, 1993). Essa enzima participa da cadeia de reações que catalizam a formação de prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina e tromboxanos (Stadman, 1990) e está relacionada com o funcionamento normal do sistema imunológico (Hurley & Doane, 1989). A presença de selênio (Se) na estrutura da GSH-Px permite que exista uma alta relação entre a concentração sanguínea e tissular de Se com a atividade da mesma. A deficiência de Se induz a uma baixa atividade da GSH-Px, deixando as células expostas à ação nociva das ERO (Miller et al, 1993).

A vitamina E (alfa-tocoferol) é o maior antioxidante lipossolúvel presente nas membranas celulares (Kay et al., 1986). Ela possui a capacidade de quelar formas reativas de oxigênio, diminuindo a formação de peróxidos que podem destruir neutrófilos e macrófagos (Butterick et al., 1983; Sharmanov et al., 1990). Dessa forma essa vitamina protege a membrana lipídica, receptores e outros componentes celulares envolvidos na modulação da resposta imunológica (Meydani, 1995).

Em uma série de estudos, demonstrou-se que nas células dos hospedeiros infectados com diferentes espécies de parasitas, as quantidades de ERO que causam lipoperoxidação foram elevadas, causando danos aos tecidos e as células (Kotze, 2003, Bambou et al., 2008; Deger, 2008).

O selênio e a vitamina E, dois elementos quimicamente diferentes, com propriedades antioxidantes individuais, têm o mesmo objetivo no sistema biológico (Underwood & Suttle, 1999). A função metabólica do selênio esta intimamente ligada à vitamina E. Ambos protegem as membranas celulares da degeneração oxidativa.

Este trabalho parte da hipótese de que o estresse oxidativo que ocorre em resposta a infecção parasitária produza danos e lesões teciduais, e que a suplementação com selênio e vitamina E possa manter a integridade das membranas celulares susceptíveis a esses danos, melhorando a competência imunológica e a capacidade de resposta do hospedeiro. O estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados com *H. contortus* e suplementados com selênio e vitamina E.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 20 cordeiros machos, da raça Corriedale, com 6 meses de idade distribuídos em quatro grupos experimentais: G1 (n=5) animais infectados com larvas de *H. contortus* e suplementados com 0,2mg/kg de peso vivo (PV) de selenito de sódio; G2 (n=5)

animais infectados com larvas de *H. contortus* e suplementados com 0,2mg/kg PV de selenito de sódio e 2000 UI por animal de Vitamina E; G3 (n=5) animais infectados com larvas de *H. contortus* e suplementados com 2000 UI por animal de Vitamina E e G4 (n=5) animais infectados com larvas de *H. contortus*. A suplementação com selenito de sódio (Merck®), por via intramuscular (IM), foi realizada trinta dias antes do início do experimento e no dia zero (T0). A administração da Vitamina E (MONOVIN E®-acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol; BRAVET) (IM) foi efetuada nos dias zero e 30.

Antes da infecção experimental os animais permaneceram por 40 dias alocados em baias coletivas (uma baía para cada grupo) localizadas no Hospital Veterinário Universitário da UFSM, para adaptação a dieta (feno de tifton e concentrado, totalizando 12% de proteína bruta) e ao ambiente experimental. Durante este período os cordeiros receberam tratamento anti-helmintico com associação de closantel e albendazole (CLOSALBEN®)

Todos os grupos foram infectados, pela via oral, com 500 larvas (L3) de *H. contortus* por animal a cada dois dias, pelo período de vinte dias a partir do T0. As larvas foram obtidas por meio da técnica de coprocultura realizada no laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná (Roberts & O'Sullivan, 1950), sendo obtidas apenas larvas de *H. contortus*.

Foram realizadas coletas de sangue utilizando-se o sistema vacutainer®. As amostras sanguíneas foram obtidas nos dias zero (T0), 20 (T1), 40 (T2), e 60 (T3). Após coleta, as amostras foram centrifugadas, processadas, e armazenadas a -70 °C para posterior análise. A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com o método de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa et al.,1979). A determinação da GSH-Px baseou-se na redução do ditionitrobenzeno (Ellman,1959). Os resultados finais da atividade da GSH-Px foram expressos em unidades por mililitro de eritrócitos. A atividade da enzima catalase foi quantificada pela diminuição da absorbância a 240nm pela decomposição de

peróxido de hidrogênio, sendo expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\mu\text{l}$  eritrocitos (Aebi, 1984). As amostras de fezes para a quantificação de ovos por grama (OPG) foram colhidas nos dias T0, 20 (T1), 40 (T2) e 60 (T3) (Gordon & Whitlock, 1939). A pesagem dos animais foi realizada nesses mesmos tempos experimentais.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Duncan para comparação entre pares de médias. Os dados referentes à OPG foram submetidos à transformação logarítmica. Os resultados foram expressos em médias e desvios-padrão. O nível de significância utilizado foi de 5%. Para o estudo da relação entre duas variáveis foram utilizadas as análises de regressão linear e o coeficiente de correlação. A significância obtida na regressão linear foi avaliada por meio do teste F. Foram consideradas diferenças significativas quando o P foi inferior a 0,05. A relação foi considerada alta quando  $r > 0,50$ ; média quando os valores de r estavam entre 0,30 e 0,50; e baixa quando  $r < 0,30$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos no presente trabalho são apresentados na tabela 1. Maiores valores de OPG foram observados nos T1, T2 e T3 em relação ao tempo zero para todos os grupos experimentais, demonstrando sucesso na infecção experimental. Durante o T1, os animais do G1 demonstraram contagens superiores de OPG em relação ao G3. Quanto ao peso, maiores médias foram obtidas no T2 do G2 em relação ao G3 (Tabela 1).

A produção de ERO pelos fagócitos desempenha papel importante na tentativa de combater a infecção parasitária mediante danos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos dos parasitas (Smith, 1989; Kotze et al., 2003). Durante esse evento as ERO também causam severos danos ao organismo do hospedeiro (Bagnal & Kotze, 2004; Menzies, et al. 2010).

Os dados obtidos nesse estudo demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo gerado pela infecção parasitária. Os cordeiros suplementados apenas com selênio exibiram

melhor resposta antioxidante em relação aos animais suplementados com a associação de selênio e vitamina E e quando foi administrado apenas vitamina E.

As células dos ovinos possuem sistemas antioxidantes para detoxificação de ERO e reparação das modificações oxidativas deletérias sobre as suas estruturas. Uma das enzimas mais importantes na detoxificação da ERO é a GSH-Px. A GSH-Px aumenta na circulação sanguínea em decorrência da maior disponibilidade de selênio sanguíneo, visto que é uma enzima dependente desse mineral (Rooke et al., 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007). Em vacas leiteira com retenção de placenta, em búfalas com distocia e em ovinos infectados experimentalmente pelo *H. contortus* a suplementação com selênio associado à vitamina E promoveu diminuição da peroxidação lipídica e aumento nas concentrações sanguíneas de GSH-PX (Gupta et al., 2005; Sathya et al., 2007; Nicolodi, et al., 2010) . No entanto, em nenhum desses estudos o selênio e a vitamina E foram avaliados de forma isolada. Na avaliação do estresse oxidativo dos animais experimentais pôde-se observar relação positiva entre a suplementação com selênio e a atividade da GSH-Px. No T0, o G1 demonstrou elevação de 47 e 243% na atividade da enzima GSH-Px quando comparado ao G3 e ao G4, respectivamente. Já os animais do G2, no T0, exibiram um incremento de 137% de atividade dessa enzima em relação ao G4. No T1, observou-se que os animais do G1 obtiveram valores percentuais mais elevados (119 e 145) da GSH-Px quando comparados com àqueles do G3 e G4, respectivamente. Semelhante comportamento foi evidenciado no T3 quando o G1 diferiu do G4 com atividade enzimática superior a 168% (Tabela 1). Os valores mais elevados no T0 da GSH-Px nos grupo suplementado apenas com selênio deve-se a previa aplicação do elemento trinta dias antes do período experimental, já que o mesmo atinge o pico de ação em torno de 60 dias (Ramirez-Bribiesca et al., 2005).

Quanto à catalase, maior atividade enzimática foi observada no G1 em relação aos demais grupos no T1 (Tabela 1). Ainda neste mesmo tempo, os animais do G2 e G3 exibiram

valores superiores aos cordeiros do G4. No G2 observou-se maior atividade da catalase no T2 quando comparado aos resultados do G3 e G4. Ainda no T2 valores superiores da catalase foram obtidos no G1 e G3 em relação ao G4. A catalase desempenha a função de decompor o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), um produto tóxico do metabolismo, em água e oxigênio molecular (Gaetani et al., 1989). Quando o  $H_2O_2$  esta presente em baixas concentrações (condições fisiológicas normais) a GSH-Px é que se encarrega de transformá-la em água. Conforme Halliwell & Gutteridge (2007) experimentos executados na tentativa de avaliar a competição entre as enzimas catalase e GSH-Px demonstraram, que a primeira eleva sua atividade somente quando os limiares de  $H_2O_2$  ultrapassar a capacidade detoxificante da GSH-Px. Neste trabalho, os valores mais elevados da atividade da catalase foram observados nos grupos suplementados com selênio e vitamina E. Sugere-se, desta forma, que esses elementos possuam efeitos estimulantes sobre a produção de peróxido de hidrogênio celular.

Durante o T0 observou-se uma menor peroxidação lipídica (TBARS) no G1 e G2 quando comparado ao G4. Menores valores de TBARS foram detectados no T2 do G1 em relação ao G4. No T3 maior peroxidação lipídica foi observada no grupo controle com relação aos grupos suplementados com selênio (G1 e G2). A correlação de Pearson revelou a existência de uma alta correlação negativa entre as concentrações de TBARS e a atividade da GSH-Px ( $r=0.52$ ) e uma média correlação negativa entre GSH-Px e a OPG ( $r=0.38$ ). As menores concentrações de TBARS, observadas nos animais suplementados somente com selênio (G1) ou quando associado à vitamina E (G2), comparativamente aqueles que receberam somente a vitamina E (G3) ou aos do grupo controle (G4), demonstram a superioridade do elemento selênio na manutenção das defesas antioxidantes frente ao desafio da Hemoncose. As correlações negativas entre a atividade da GSH-Px e as concentrações plasmáticas de TBARS e a OPG, no presente estudo, sugerem que as reservas diminutas deste

antioxidante podem exacerbar a geração de radicais livres com um aumento da peroxidação lipídica e o aumento da contaminação ambiental pelos ovos de *H. contortus*.

Os resultados do presente estudo sugerem que o uso isolado do selênio tem superior atividade antioxidante em relação a vitamina E, discordando daqueles apresentados por Finch & Turner (1996), Milad et al. (2001), Liesegang et al. (2008) quando sugerem que o uso concomitante de selênio e vitamina E apresenta melhores respostas para pequenos ruminantes quando comparados a suplementação de apenas um dos elementos. Mesmo o selênio induzindo uma maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular, o estresse oxidativo nos grupos suplementados com esse elemento foi inferior aos demais grupos.

## **CONCLUSÃO**

A suplementação com selênio proporciona maior proteção antioxidante ao organismo de cordeiros frente ao estresse oxidativo causado pela infecção experimental com *H. contortus*.

## **COMITE DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, processo número: 061/2008

## **REFERÊNCIAS**

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H., 2003: Imunologia celular e molecular, 4a ed. Revinter, Rio de Janeiro, Brasil.
- Aebi, H., 1984: Catalase in vitro. Methods Enzymology 105, 121-126.

Bagnal, N.H.; Kotze, A.C., 2004: cDna cloning and expression patterns of a peroxiredoxin, a catalase and glutathione peroxidase from *Haemonchus contortus*. Parasitology Research 94, 283-289.

Bambou, J.C.; Garcia, E.G.; Chevrotiere C.; Aruqet, R.; Vachiery, N.; Mandonnet, N., 2009: Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole Kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Small Ruminant Research 82, 34-39.

Butterick, C.J.; Baehner, R.L.; Boxer, L.A.; Jersild, R.A., 1983: Vitamin E – selective inhibitor of the NADPH oxidoreductase enzyme system in human granulocytes. American Journal of Pathology 112, 287-293.

Comparti, M., 1989: Free radical induces cell injury. Chemico Biological Interactions 72, 1-56.

Deger, Y.; Erteki, A.; Deger, S.; Mert, H., 2008: Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver infected naturally with Dismatosis. Turkiye Parazitoloji Dergisi 32, 23-26.

Ellman, G.L., 1959: Tissue sulphhydryl groups. Archives Biochemistry and Biophysics 82, 70-77.

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

Gaetani, G.F.; Galiano, S.; Canepa, L.; Ferraris, A.M.; Kirkiman, H.N., 1989: Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood 73, 334-339.

Gordon, H.M.; Whitlock, H.V., 1939: A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. Journal Council Science in Australian 12, 50-52.

Gupta, S.; Gupta, H.K.; Soni, J., 2005 Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. Theriogenology 64, 1273-1286.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., 2007: Free radicals in biology and medicine. 6a ed. Oxford University, New York, EUA.

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

Hurley, W.L.; Doane, R.M., 1989: Recent developments in the roles of vitamins and minerals reproduction. *Journal of Dairy Science* 72, 784-804.

Kay, M.M.B.; Bosman, G.J.; Shapiro, S.S.; Bendich, A.; Bassel, P.S., 1986: Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Science* 83, 2463-2467.

Kotze, A.C., 2003: Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide in vitro. *International Journal Parasitology* 33, 392-400.

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

Menzies, M.; Reverter, A.; Andronicos, N.; Hunt, P.; Windon, R.; Ingham, A., 2010: Nematode challenge induces differential expression of oxidant, anti-oxidant and mucus genes down the longitudinal axis of the sheep gut. *Parasite Immunology* 32, 36-46.

Meydani, M. Vitamin E. 1995: *The Lancet* 345, 170-175.

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

Miller, J.K.; Brzezinska-Slebodzinska, E.; Madsen, F.C., 1993: Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science* 76, 2812-2823.

Morgante, M.; Beghelli, D.; Pauselli, M.; Dall'ara, P.; Capucella, M.; Ranucci, S., 1999: Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes. *Journal Dairy Science* 82, 623-631.

Nicolodi, P.S.R.J.; Camargo, E.V.; Zeni, D.; Rocha, R.X., Cyrillo, C.F.; Souza, F.N.; Della Libera, M.M.; Bondan, C.; Leal, M.L.R., 2010: Perfil proteico e metabolism oxidative de cordeiros experimentalmente pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. *Ciência Rural* In Press.

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

Ramirez-bribiesca, J.E.; Tortora, J.L.; Huerta, M.; Crosby, M.M., 2005: Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on Mexican plateau. *Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária* 57, 77-84.

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

Rooke, J.A.; Robinson, J.J.; Arthur, J.R., 2004: Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. *Journal Agricultural Science* 142, 253-262.

Sathya, A.; Prabhakar, S.; Sangha, S.P.S.; Ghuman, S.P.S., 2007: Vitamin E and selenium supplementation reduces plasma cortisol and oxidative stress in dystocia-affected buffaloes. *Veterinary Research Communications* 31, 809-818.

Sharmanov, A.T.; Aidarkhanov, B.B.; Hurmangalinov, S.M., 1990: Effects of vitamin E deficiency on oxidative metabolism and antioxidant enzyme activity macrophages. *Annals Nutrition and Metabolism* 34, 143-146

Smith, N.C., 1989: the role of free oxygen radicals in the expulsion of primary infections of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology Research* 75, 423-438.

Stadman, T.C., 1990: Selenium Biochemistry. *Annual Review Biochemistry* 59, 111-127.

Underwood, E.J.; Suttle, N.F., 1999: *The mineral Nutrition of Livestock*. 3a ed. Cabi: Wallingford, EUA.

Woodbury, R.G.; Miller, H.R.P.; Huntley, J.F.; Newlands, G.F.J; Palliser, A.C.; Wakelin, D., 1984: Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature* 312, 450-452.

**Tabela 1** - Valores médios e desvio padrão da atividade da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase, espécies reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS), peso e contagens de ovos por grama de fezes (OPG) dos grupos experimentais. G1- grupo infectado e suplementado com selênio; G2- grupo infectado e suplementado com selênio e vitamina E; G3- grupo infectado e suplementado com vitamina E; G4- grupo controle infectado.

Grupo	Tempo	GSH-Px U/ml eritrócitos	Catalase $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\mu\text{l}$ eritrócitos	TBARS Mda/g Hb	Peso Kg	OPG
G1	T0	0.348±0.04 <sup>A</sup>	1.0665±0.751 <sup>A</sup>	84.99±2.416 <sup>B</sup>	20.740±2.379 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
	T1	0.230±0.09 <sup>A</sup>	1.725±0.180 <sup>A</sup>	53.92±9.499 <sup>A</sup>	20.900±2.340 <sup>A</sup>	440±151.67 <sup>A</sup>
	T2	0.102±0.08 <sup>A</sup>	1.588±0.357 <sup>AB</sup>	69.37±4.352 <sup>B</sup>	21.360±2.159 <sup>AB</sup>	3840±1947.56 <sup>A</sup>
	T3	0.125±0.03 <sup>A</sup>	1.617±0.426 <sup>A</sup>	61.56±1.219 <sup>B</sup>	24.120±3.563 <sup>A</sup>	3820±2055.97 <sup>A</sup>
G2	T0	0.236±0.067 <sup>B</sup>	1.136±0.347 <sup>A</sup>	89.14±8.197 <sup>B</sup>	21.280±2.682 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
	T1	0.190±0.08 <sup>AB</sup>	1.066±0.117 <sup>B</sup>	60.92±11.856 <sup>A</sup>	22.060±2.839 <sup>A</sup>	320±164.31 <sup>A</sup>
	T2	0.095±0.1 <sup>A</sup>	1.846±0.173 <sup>A</sup>	75.03±7.815 <sup>AB</sup>	22.920±3.554 <sup>A</sup>	2580±1331.16 <sup>A</sup>
	T3	0.095±0.04 <sup>AB</sup>	1.892±0.828 <sup>A</sup>	67.97±9.493 <sup>B</sup>	25.240±4.299 <sup>A</sup>	2800±1120.27 <sup>A</sup>
G3	T0	0.241±0.127 <sup>B</sup>	1.451±0.515 <sup>A</sup>	115.39±23.706 <sup>AB</sup>	17.600±2.162 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
	T1	0.105±0.09 <sup>B</sup>	0.969±0.208 <sup>B</sup>	73.91±21.008 <sup>A</sup>	18.460±2.575 <sup>A</sup>	180 ±192.35 <sup>B</sup>
	T2	0.080±0.05 <sup>A</sup>	1.427±0.290 <sup>B</sup>	94.65±17.729 <sup>AB</sup>	18.620±3.229 <sup>B</sup>	3980±3029.36 <sup>A</sup>
	T3	0.060±0.07 <sup>AB</sup>	1.582±0.446 <sup>A</sup>	84.28±12.198 <sup>AB</sup>	21.200±3.492 <sup>A</sup>	3880±2784.24 <sup>A</sup>
G4	T0	0.102±0.047 <sup>c</sup>	1.668±0.332 <sup>A</sup>	136.55±53.573 <sup>A</sup>	17.900±3.895 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
	T1	0.094±0.05 <sup>B</sup>	0.653±0.209 <sup>C</sup>	78.15±31.631 <sup>A</sup>	18.280±2.987 <sup>A</sup>	360 ±194.93 <sup>AB</sup>
	T2	0.067±0.06 <sup>A</sup>	1.026±0.281 <sup>C</sup>	107.35±42.595 <sup>A</sup>	19.640±2.659 <sup>AB</sup>	1740 ±492.95 <sup>A</sup>
	T3	0,046±0.02 <sup>B</sup>	1.680±0.552 <sup>A</sup>	92.75±37.110 <sup>A</sup>	23.100±1.104 <sup>A</sup>	2460±1057.36 <sup>A</sup>

Letras não coincidentes denotam diferença estatística entre os valores, e devem ser analisadas comparando os mesmos períodos entre os diferentes grupos.

## 4. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado esse estudo, conclui-se que:

- O selênio proporciona uma maior capacidade de proteção antioxidante aos neutrófilos e maximiza a geração de espécies reativas ao oxigênio nessas células aumentando a seu poder bactericida.
- O selênio proporciona uma maior proteção contra o estresse oxidativo gerado pela infecção experimental por *Haemonchus contortus* mediante elevação dos níveis das enzimas glutathiona peroxidase e catalase e diminuição da peroxidação lipídica.
- A suplementação com selênio e vitamina E estimula a produção de peróxido de hidrogênio pelas células.



## 5. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

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

BUTTERICK, C. Vitamin E-selective inhibitor of the NADPH oxidoreductase enzyme system in human granulocytes. **American Journal of Pathology**. v.112, p.287-293, 1983.

CHRISTIE, M.G. The fate of very large doses on *Haemonchus contortus* and their effect on conditions in the ovine abomasum. **Journal Comparative Pathology**, v.80, p. 89-100, 1970.

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

COSTA, J. N. et al. Influência do desenvolvimento etário e da suplementação com vitamina E (acetato de DL-alfa-tocoferol) no metabolismo oxidativo de neutrófilos de bovinos da raça holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.293-298, 2004.

DEGER, Y. et al. Lipid Peroxidation and Antioxidant Potential of Sheep Liver Infected Naturally with Distomatosis. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v.32, p.23-26, 2008.

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

ECHEVARRIA, et al. Controle estratégico da verminose ovina no Rio Grande do Sul. In: CURSO DE PARASITOLGIA ANIMAL, 2., 1989, Bagé,: Anais...: CBPV. p.159-163.

ECHEVARRIA, F.A.M. Doenças parasitárias de ovinos e seu controle. In: SIMPÓSIO PARANAENSE DE OVINO CULTURA, 3., 1988, Guarapuava, Anais...: Londrina: IAPAR. p.46-47.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JAIN, N.C. **Essentials Of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993.

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

KAY, M.M.B. et al. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.83, p.2463-2467. 1986.

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

KOTZE, A.C. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide in vitro. **International Journal Parasitology**. v. 33, p. 392-400, 2003.

LACROUX, C. et al. *Haemonchus contortus* (Nematoda:Trichostrongylidae) infection in lambs elicits a unequivocal Th2 immune response. **Veterinary Research**, v.37, p.607-622, 2006.

MAUG, J. H. Singlet oxygen: A unique microbicidal agent in cells. **Science**, v.182, p.44, 1973.

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

MEYDANI, M. Vitamin E. **The Lancet**. v.345, p.170–175, 1995.

MILLER, J.K. et al. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v76, p.2812-2823, 1993.

MILLER, J.E.; HOROHOV D.W., Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. **Journal Animal Science**, n.84, p.124-132, 2006.

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

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

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

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

ROWE A. et al. Genomic analyses of *Haemonchus contortus* infection in sheep: Abomasal fistulation and two *Haemonchus* strains do not substantially confound host gene expression in microarrays. **Veterinary Parasitology**. v. 154, p. 71-81, 2008.

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

SHARMANOV, A.T. et al. Effects of Vitamin E deficiency on oxidative metabolism and antioxidant enzyme activity of macrophages. **Annals Nutrition and Metabolism**, v.34, p.143-146, 1990.

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

SMITH, K.L. et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal Dairy Science**, n.67, p.1293-1300, 1984.

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

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

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

VEER et al. The innate host defence against nematode parasites, **Parasite Immunology**. v. 29, p. 1-9, 2007.

VEER. M.J. et al. The innate defence against nematode parasites. **Parasite Immunology**. v. 29, p.1-9, 2007.

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