

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

**PERFIL OXIDATIVO DE CORDEIROS
INFECTADOS POR *Haemonchus contortus* E
TRATADOS COM EDETATO DE ZINCO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felipe Lamberti Pivoto

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**PERFIL OXIDATIVO DE CORDEIROS INFECTADOS POR
Haemonchus contortus E TRATADOS COM EDETATO DE
ZINCO**

Felipe Lamberti Pivoto

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 do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof^a. Marta Lizandra do Rego Leal

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**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**

**PERFIL OXIDATIVO DE CORDEIROS INFECTADOS POR
Haemonchus contortus E TRATADOS COM EDETATO DE ZINCO**

elaborado por
Felipe Lamberti Pivoto

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. Marta Lizandra do Rego Leal, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)

Ricardo Xavier da Rocha, Dr. (UNOESC)

Santa Maria, 22 de Dezembro de 2014

RESUMO

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

PERFIL OXIDATIVO DE CORDEIROS INFECTADOS POR *Haemonchus contortus* E TRATADOS COM EDETATO DE ZINCO

AUTOR: FELIPE LAMBERTI PIVOTO
ORIENTADORA: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL
Santa Maria, 22 de dezembro de 2014.

O surgimento da resistência parasitária à maioria das classes de anti-helmínticos e, conseqüentemente, a dificuldade no controle do *Haemonchus contortus*, tornou a infecção por este parasito um dos principais entraves da criação de ovinos. Para minimizar as perdas causadas pelo *H. contortus*, métodos de controle alternativo e/ou auxiliar tornaram-se fundamentais. O processo inflamatório causado pela infecção parasitária aumenta a produção de espécies reativas, as quais quando produzidas em demasia agravam os danos causados por essa infecção. Visando a importância de métodos alternativos e sabendo que o zinco tem importante papel na atividade de enzimas ligadas ao perfil oxidativo o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação de uma fonte de zinco parenteral (edetato de zinco) no perfil oxidativo de cordeiros infectados por *H. contortus*. Para isto 24 cordeiros foram divididos em quatro grupos, sendo Grupo I - animais não infectados, Grupo II – animais não infectados e tratados com 3 mg de edetato de zinco, via subcutânea (SC) kg⁻¹ de peso vivo, Grupo III – animais infectados com 12000 larvas de terceiro estágio de *H. contortus* e Grupo IV – animais infectados com 12000 larvas de terceiro estágio de *H. contortus* e tratados com 3 mg de edetato de zinco, via subcutânea (SC) kg⁻¹ de peso vivo. Estes cordeiros foram acompanhados por um período experimental de 38 dias, sendo realizada coleta de fezes e sangue em intervalo de sete dias a partir do dia zero. Nas amostras de soro foi analisado o perfil oxidativo, através da quantificação da capacidade antioxidante total (TAC) e do status de oxidação total (TOS), e na de fezes a contagem de ovos por grama de fezes (OPG). No ultimo dia experimental, três animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia e então realizada a contagem do número de *H. contortus* adultos no abomaso. Os resultados demonstraram que 17 dias após o tratamento com edetato de zinco o estresse oxidativo dos cordeiros do grupo IV foi inferior aos do grupo I e que 24 dias após o tratamento o grupo IV apresentou redução no estresse oxidativo em relação ao grupo III, porém sem interfere na carga parasitária. Demonstrando que o tratamento com edetato de zinco pode auxiliar na redução dos danos causados pelo estresse oxidativo, embora não reduza a infecção por *H. contortus*.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Microminerais. Ovinos

ABSTRACT

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

OXIDATIVE PROFILE IN THE LAMBS INFECTED BY *Haemonchus contortus* AND TREATED WITH EDETATE ZINC

AUTOR: FELIPE LAMBERTI PIVOTO
ORIENTADORA: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL
Santa Maria, 22 de dezembro de 2014.

The emergence of parasite resistance to most classes of anthelmintics, as well as the difficulty of controlling *Haemonchus contortus* infection, are among the main problems faced in the sheep farming industry. Alternative and/or auxiliary control methods are essential to minimize the losses caused by *H. contortus* infection. The inflammatory process caused by parasitic infection increases the production of reactive species, when produced in excess exacerbate the damage caused by such infections. Given the importance of alternative control methods and the role that zinc plays in the activity of enzymes associated with the oxidative profile, the aim of the present study was to assess the action of a source of parenteral zinc (edetate zinc) in oxidative profile of lambs infected by *H. contortus*. For this, 24 lambs were divided into four groups: Group I - uninfected animals; Group II - uninfected animals and treated with 3 mg of edetate zinc kg^{-1} body weight; Group III - animals infected with 12000 larvae in the third stage of *H. contortus*; and Group IV - animals infected with 12000 larvae in the third stage of *H. contortus* and treated with 3 mg of edetate zinc kg^{-1} body weight. The lambs were monitored for 38 days, during which time feces and blood samples were collected on day zero and at seven days intervals. Serum samples from animals with an oxidative profile were analyzed by quantifying the total antioxidant capacity (TAC) and the total oxidation status (TOS). The eggs per gram (EPG) in feces were also counted. On the last experimental day, three animals from each group were euthanized and the quantity of *H. contortus* adults in the abomasums was determined. The results showed that oxidative stress in the animals from group IV was lower than in Group I 17 days after treatment with edetate zinc. Furthermore, 24 days after treatment, group IV showed a reduction in oxidative stress in relation to group III. No interference in the parasite load was recorded. These results show that treatment with edetate zinc could assist in reducing the damage caused by oxidative stress, but does not reduce infection with *H. contortus*.

Key words: Oxidative stress. Sheep. Trace element.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relatos de <i>Haemonchus contortus</i> resistente a anti-helmínticos em diferentes países para diferentes classes farmacológicas.	15
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo evolutivo do <i>Haemonchus contortus</i>	11
Figura 2 - Diagnostico de infecção por <i>Haemonchus contortus</i>	12
Figura 3 - Método de diagnostico específico para <i>Haemonchus contortus</i> em microscopia fluorescente.....	12
Figura 4 - Mecanismo de defesa antioxidante	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. CAPITULO 1	10
REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. <i>Haemonchus contortus</i>	10
2.2. Zinco	16
2.3. Estresse oxidativo em infecções por <i>Haemonchus contortus</i>	19
3. CAPITULO 2	23
MANUSCRITO - Oxidative Stress by <i>Haemonchus contortus</i> in lambs: Influence of treatment with Zinc Edetate	23
Abstract	24
Introduction	24
Material and methods	25
<i>Animals</i>	26
<i>Experimental groups</i>	26
<i>Experimental infection</i>	26
<i>Treatment</i>	27
<i>Sample collection</i>	27
<i>Laboratory procedures</i>	27
<i>Oxidative profile assay</i>	28
<i>Total oxidant status (TOS)</i>	28
<i>Total antioxidant capacity (TAC)</i>	28
<i>Oxidative stress index (OSI)</i>	28
<i>Statistical analysis</i>	29
Results	29
<i>Parasitic parameters</i>	29
<i>Oxidative profile</i>	29
Discussion	30
References	32
4. CAPITULO 3	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
5. REFERENCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Estudo revela que nos últimos anos a população de ovinos no Brasil sofreu redução em relação aos anos 80 e 90, e aponta como um dos pontos-chaves para essa redução a falta de efetividade no controle dos parasitos gastrointestinais (AMARANTE, 2014). Entre esses parasitos gastrointestinais o mais patogênico para ovinos é o *Haemonchus contortus* (*H. contortus*), o qual provoca um quadro clínico de anemia que se não controlado ocasiona a morte de seus hospedeiros (MILLER et al., 2012; ZAJAC, 2006).

A resistência parasitária está relatada em todo o mundo (ALMEIDA et al., 2010; CEZAR et al., 2010; DOMKE et al., 2012; FALZON et al., 2013; GEURDEN et al., 2014; MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013) e se tornou o maior desafio para os criadores de ovinos, os quais buscam medidas alternativas para dar continuidade na atividade. Entre essas medidas alternativas o uso de dietas com altos teores de proteína demonstrou bons resultados (BAMBOU et al., 2011; BRICARELLO et al., 2005; KHAN et al., 2012; NNADI; KAMALU; ONAH, 2007), porém com custo elevado, sendo impraticável em muitos rebanhos.

A utilização de alguns microminerais, com intuito de incrementar a resposta imune dos animais (GALINDO-BARBOZA et al., 2011; LEAL et al., 2014), ou de promover a morte do parasito, quando em contato direto com o mesmo (SOLI et al., 2010), mostrou-se ser uma alternativa eficaz no auxílio ao controle da haemonchose e ainda com custo razoavelmente baixo. 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 predispor a enfermidades (HERDT; HOFF, 2011). Entre esses microminerais temos o zinco que exerce funções primordiais no organismo, atuando na replicação do DNA, na transcrição do RNA, na expressão do código genético, na regulação do apetite, no crescimento animal, na função imunológica e no perfil oxidativo (GARG; MUDGAL; DASS, 2008; HERDT; HOFF, 2011). O que leva a creditar esse elemento traço como um auxiliar no controle das parasitoses, embora estudos utilizando esse micromineral de forma isolada em ovinos infectados por *H. contortus* não tenha sido realizados até o momento, com relatos apenas de sua ação associado a outro micromineral (SCHAFER et al., 2014).

O estresse oxidativo, que ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e antioxidantes, é um fenômeno frequente em infecções por *H. contortus*

(MACHADO et al., 2014) e ocasiona danos as células do hospedeiro reduzindo a capacidade do organismo em suportar a infecção (ROSENFELDT et al., 2013). Com isso medidas que reduzam o estresse oxidativo são importantes para auxiliar o controle da infecção por *H. contortus*.

Visto que a infecção por *H. contortus* é um grande problema para a criação de ovinos e medidas alternativas para o controle desse parasito são fundamentais devido a presença da resistência parasitária por todo o mundo. E, além disso, que o estresse oxidativo é prejudicial ao organismo e o zinco tem propriedades que podem reduzir esses danos. Avaliar o efeito do edetato de zinco no perfil oxidativo de ovinos infectados por *H. contortus* é de suma importância quando se deseja buscar alternativa para reduzir as perdas causadas por este helminto.

2. CAPITULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Haemonchus contortus*

Um dos principais problemas da criação de ovinos é a infecção por parasitos gastrointestinais, dentre os quais se destaca o *H. contortus*. A infecção por este parasito, em um período de seis meses, causa redução no ganho de peso de cordeiros na faixa de 3,3 Kg a 4,7 Kg (MILLER et al., 2012; PIVOTO et al., 2014) e redução de 14% no peso final da carcaça (SUTHERLAND; SHAW; SHAW, 2010). Além disso, essa infecção acarreta custo com mão de obra, com a utilização de anti-helmínticos, com serviços veterinários e, em casos mais graves, com a morte do hospedeiro.

O ciclo desse parasito é direto (Figura 1), onde os ovos larvados no bolo fecal dão origem às larvas de primeiro estágio (L1) que se alimentam de bactérias, passam por duas trocas de cutícula e dão origem as larvas infectantes (L3). O tempo decorrido dessa fase de vida livre é influenciado por condições climáticas, principalmente temperatura e umidade relativa do ar, as quais em condições ideais (26 °C e 80% umidade) tem duração de no mínimo quatro dias. As L3 migram do bolo fecal para as forrageiras e permanecem até serem ingeridas pelos hospedeiros. No animal inicia a fase de vida parasitária que se desenvolve na mucosa do abomaso onde se alimentam de sangue. Nesse local passam por duas trocas de cutículas e tornam-se larvas adultas (L5). Após fecundação, as L5 liberam ovos no lúmen abomasal que são liberados ao ambiente junto às fezes. O período pré-patente nessa fase é de 18 a 21 dias (ZAJAC, 2006).

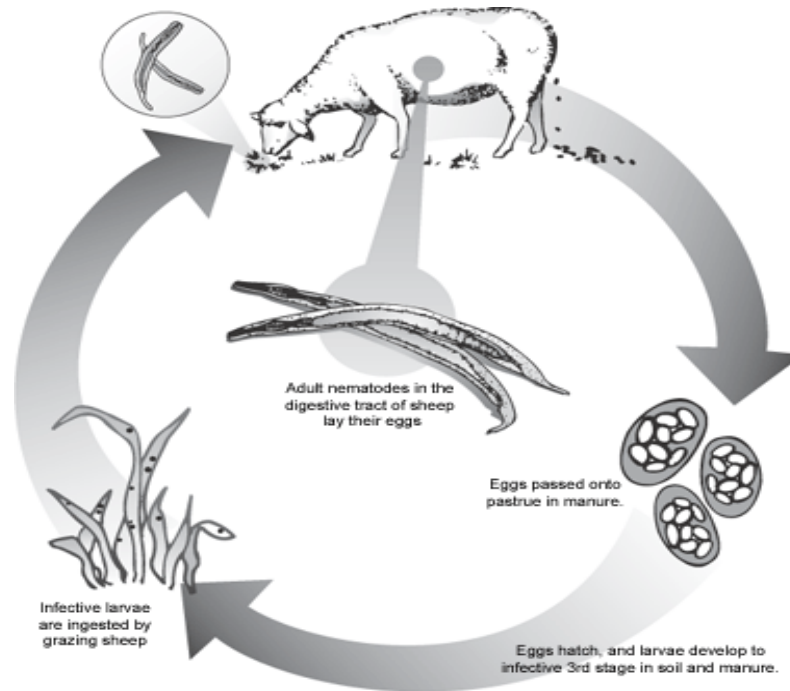


Figura 1 - Ciclo evolutivo do *Haemonchus contortus*.

Fonte: http://labmedvet.blogspot.com.br/2011_12_01_archive.html

O diagnóstico da infecção por *H. contortus* pode ser realizado mediante a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), utilizando a técnica de McMaster modificada. Para este exame são utilizadas duas gramas de fezes e 58 g de solução saturada com açúcar (70:30); a amostra é homogeneizada e suspensa em câmara de MacMaster (Figura 2A), onde permanece em repouso por cinco minutos, com posterior identificação e contagem dos ovos da família Trichostrongylidae (Figura 2B), sendo que cada ovo identificado na câmara representa 100 ovos por grama de fezes (COLES et al., 2006).

Porém a técnica de McMaster tem como limitante não ser específica para o gênero *H. contortus*. O diagnóstico definitivo é obtido pela técnica de Roberts & O'Sullivan, onde fezes são cultivadas em meio com temperatura e umidade controlada (26° e 80%) por um período de 14 dias, com posterior identificação das L3 (Figura 2C) (VAN WYK; CABARET; MICHAEL, 2004).

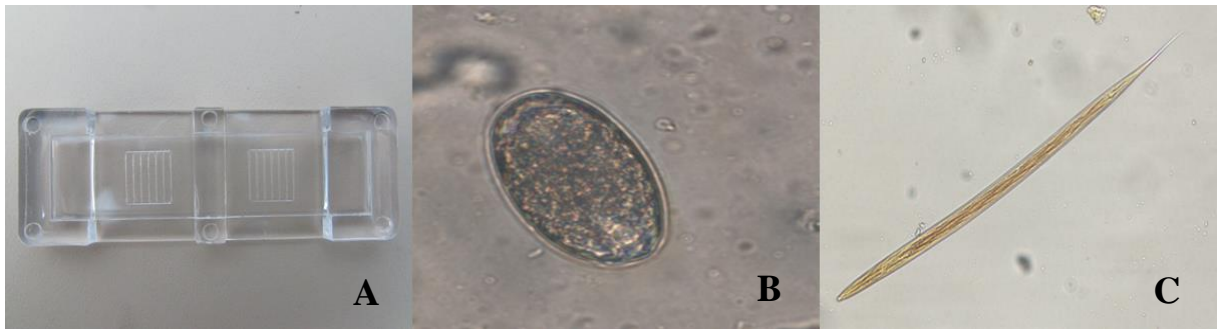


Figura 2 - Diagnostico de infecção por *Haemonchus contortus*

Câmara de McMaster (A); Ovos da superfamília Trichostrongylidae (B) e Larva de terceiro estágio de *Haemonchus contortus* (C).

No entanto, outras técnicas mais laboriosas possibilitam realizar a identificação específica dos ovos de *H. contortus*, como o uso de uma lectina conjugada com isotiocianato de fluoresceína que tem especificidade a esse parasito, onde no momento que é adicionada a amostra não se conjuga aos ovos de outros parasitos da superfamília Trichostrongylidae (Figura 3), somente aos ovos de *H. contortus* (JURASEK et al., 2010).

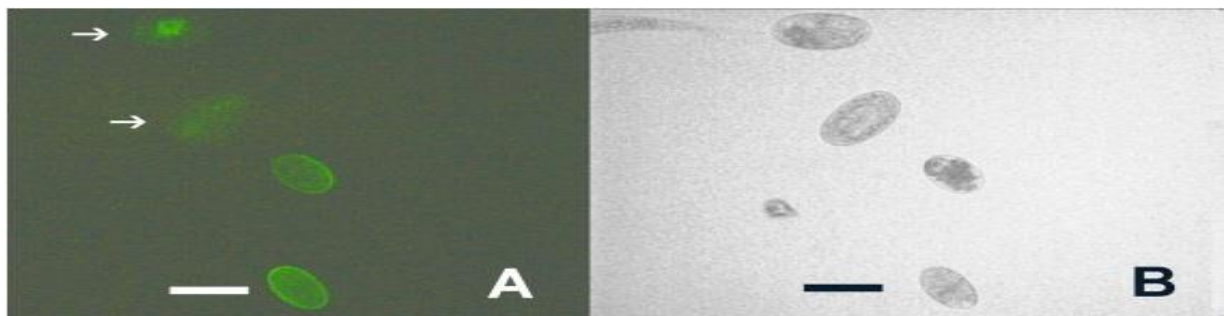


Figura 3 - Método de diagnostico específico para *Haemonchus contortus* em microscopia fluorescente

Ovos da superfamília Trichostrongylidae marcados com Lectina PNA em microscopia fluorescente (A); Ovos da superfamília Trichostrongylida (B). Ovos com delineamento completo identifica o gênero *Haemonchus contortus*.

Fonte: Imagem modificada de Jurasek et al. (2010), disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.003>

Para aumentar a sensibilidade e proporcionar um diagnóstico em fase inicial da infecção, métodos que necessitam de uma gama maior de equipamentos ou apresentam maior

custo foram padronizado, entre esses o ELISA o qual utiliza proteínas de excreção/secreção com 24 kDa do *H. contortus* (LI et al., 2007), ou ainda o LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) que é um método de amplificação de DNA do *H. contortus* presente nas fezes (MELVILLE et al., 2014).

No entanto, o OPG ainda é a técnica mais utilizada no meio científico (CEZAR et al., 2010; DOMKE et al., 2012; MITCHELL et al., 2010; PIVOTO et al., 2014; SANTOS et al., 2014), apesar de ter como outro limitante sua sensibilidade, uma vez que ovinos com alta carga parasitária podem apresentar fezes com pouco ou sem ovos do parasito, pelo fenômeno densidade dependente, onde fêmeas de *H. contortus* cessam a produção de ovos devido à elevada carga parasitária presente em seu habitat (ZAJAC, 2006).

A infecção pelo *H. contortus* causa acentuadas alterações no perfil hematológico de ovinos. Animais com haemonchose podem apresentar redução nos valores de hematócrito, de hemoglobina e do número total de eritrócitos (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 200 µl de sangue por dia (ZHONG et al., 2014), o que em altas infecções desencadeia sinais clínicos como anemia, edema submandibular e perda de peso (FAUSTO et al., 2014; PIVOTO et al., 2014). O organismo frente a infecção pelo *H. contortus* responde mobilizando células de defesa para controlar a infecção, como por exemplo, as proteínas de fase aguda soro amiloide A (SAA), haptoglobina (Hp) e Lipopolisacarídeos ligados à proteínas (LBP) (ZHONG et al., 2014) que apresentam importante papel na defesa imune inata, sendo moduladores da resposta inflamatória por sua interação com as células de defesa e com o patógeno (CECILIANI et al., 2012).

Na mucosa do abomaso, local onde o *H. contortus* se instala, ocorre um processo inflamatório por migração de neutrófilos e macrófagos (ANTHONY et al., 2007), que é mediado por citocinas pró-inflamatória, as quais em infecções por esse parasito apresentam maiores concentrações (SCHAFER et al., 2014). Esse processo inflamatório, através dessas células de defesa, produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), que causam danos às células do *H. contortus* e, conseqüentemente, morte desse parasito (KOTZE, 2003). Porém como mecanismo de defesa o *H. contortus* contém duas enzimas antioxidantes da família das peroxirredoxinas, uma mitocondrial (*HcPrx1*) e outra citoplasmática (*HcPrx2*), que degradam ERO em tiols, protegendo-o dos danos causados por estas moléculas (HUDSON; SOTIRCHOS; DAVEY, 2011).

O controle desse parasito é realizado basicamente com a utilização de quimioterápicos, principalmente dos grupos dos benzimidazóis, das lactonas macrocíclicas, dos imidazotiazóis

e das salicilanilidas (SANGSTER, 2001). Os quais são utilizadas 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 (BENTOUNSI; MERADI; CABARET, 2012).

No entanto, o conhecimento da eficácia anti-helmíntica do produto a ser utilizado nesse método é ponto chave para a efetividade do controle dos parasitos (PIVOTO et al., 2014). Caso contrário, o controle não terá efeito e levará a realização do tratamento supressivo, que utiliza intervalos entre tratamentos reduzidos e maior frequência no uso de anti-helmínticos, desenvolvendo resistência parasitária mais rapidamente e, em muitos casos, a todos os princípios ativos (JABBAR et al., 2006).

Um dos mais difundidos e indicados métodos de controle é o tratamento seletivo, onde através de critérios clínicos se identifica quais animais devem ser tratados (BENTOUNSI; MERADI; CABARET, 2012; CHYLINSKI et al., 2014). Uma das principais vantagens desse método em relação ao controle estratégico é a redução no número de animais tratados, embora os índices de produtividade dos animais dos diferentes métodos tenham demonstrado similaridade (MOLENTO et al., 2009). Com essa redução de animais tratados, o controle seletivo se destaca no retardo do surgimento da resistência parasitária em relação aos demais métodos de controle, uma vez que possibilita ter os refugia na população de helmintos, que são os parasitos susceptíveis que não entraram em contato com o produto anti-helmíntico utilizado (VAN WYK et al., 2006).

A resistência parasitária é o nome estipulado para quando um produto antiparasitário tem sua eficácia no combate ao parasito inferior a 90-95% (COLES et al., 2006) e hoje é sem dúvida o principal entrave da criação de ovinos, com relatos em todo o mundo e para varias classes de anti-helmínticos (Tabela 1).

Entre as práticas atreladas ao surgimento desse fenômeno, resistência parasitária, temos como os fatores com maior risco (relação de chance) de desenvolver a resistência parasitária a incorporação frequente de animais no rebanho, a rotação de pastagem, o tratamento com intervalos curtos e de todos os animais do rebanho e a rotação de anti-helmínticos (NICIURA et al., 2012).

Tabela 1 – Relatos de *Haemonchus contortus* resistente a anti-helmínticos em diferentes países para diferentes classes farmacológicas.

(continua)

País	Classe farmacológica	Princípio ativo	Método	Referência
Brasil	Benzimidazóis	Oxfendazole;	FECRT	(ALMEIDA et al., 2010; CEZAR et al., 2010; PIVOTO et al., 2014; SANTOS et al., 2014; VERÍSSIMO et al., 2012)
	Imidazotiazóis	Levamisol		
	Lactonas Macroclícas	Ivermectina;		
Canadá	Salicilanalidas	Closantel	FECRT	(BARRÈRE et al., 2013; FALZON et al., 2013)
	Benzimidazóis	Fenbendazole		
	Imidazotiazóis	Levamisol		
Dinamarca	Lactonas Macroclícas	Ivermectina	FECRT	(PEÑA-ESPINOZA et al., 2014)
	Benzimidazóis	Fenbendazole		
Espanha	Benzimidazóis	Albendazole	FECRT	(MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013)
	Imidazotiazóis	Levamisol		
	Lactonas macroclícas	Ivermectina;		
Estados Unidos	Moxidectina		FECRT	(GROSZ et al., 2013)
	Benzimidazóis	Albendazole		
França	Lactonas Macroclícas	Doramectina	FECRT	(GEURDEN et al., 2014)
	Benzimidazóis	Fenbendazole		
Grécia	Benzimidazóis	Albendazole	FECRT	(GEURDEN et al., 2014)
	Imidazotiazóis	Levamisol		
	Lactonas macroclícas	Ivermectina;		
Índia	Moxidectina		FECRT	(RIALCH; VATSYA; KUMAR, 2013)
	Benzimidazóis	Fenbendazole		
Itália	Imidazotiazóis	Levamisol	FECRT	(GEURDEN et al., 2014)
	Benzimidazóis	Fenbendazole		
País de Gales	Benzimidazóis	Albendazole	FECRT	(MITCHELL et al., 2010)
	Imidazotiazóis	Levamisol		
Republica tcheca	Benzimidazóis	Fenbendazole	FECRT	(VADLEJCH et al., 2014)
	Lactonas Macroclícas	Ivermectina		

Para auxiliar o controle desse parasito, grupos de pesquisas buscaram estudar a utilização de dietas com maiores teores de proteína (BAMBOU et al., 2011; BRICARELLO et al., 2005; KHAN et al., 2012; NNADI; KAMALU; ONAH, 2007) e demonstraram que

ovinos tratados com 150 g/kg de matéria seca resistem mais aos efeitos da infecção que os suplementados com 95 g/kg de matéria seca (KHAN et al., 2012), e ainda que o incremento na porcentagem de proteína bruta na dieta auxilia na resistência e resiliência dos cordeiros (BAMBOU et al., 2011; BRICARELLO et al., 2005); embora no estudo de NNADI; KAMALU; ONAH (2007) esse manejo não influenciou nos valores de hematócrito e de proteína sérica. No entanto, por questões econômicas estas práticas ainda pouco são utilizadas na criação de ovinos a campo.

Outra alternativa estudada é a suplementação com vitaminas, principalmente vitamina E que reduziu a carga parasitária de ovinos e aumentou o recrutamento de células da imunidade inata (DE WOLF et al., 2014) e a utilização de microminerais como o selênio que apresentou ação na redução do estresse oxidativo causado por *H. contortus* e o cobre que na dose 3,5 mg/ kg peso vivo por via subcutânea aumentou o ganho de peso de animais infectados em relação aos não suplementados (LEAL et al., 2010; LEAL et al., 2014). O cobre demonstrou ainda que por via subcutânea tem ação na resposta imune de cordeiros infectados por *H. contortus*, quando utilizado associado ao zinco (SCHAFER et al., 2014), e quando administrado por via oral tem ação direta no controle do *H. contortus* (GALINDO-BARBOZA et al., 2011; SOLI et al., 2010).

2.2. Zinco

O zinco é um micromineral essencial para o organismo animal, com importante influência na replicação do DNA, na transcrição do RNA, na expressão do código genético, na regulação do apetite, no crescimento animal, na função imunológica e no perfil oxidativo (HERDT AND HOFF, 2011). Esse micromineral está relacionado a atividade de várias enzimas, sendo requerido, como componente estrutural ou como cofator, pelas seis maiores classes de enzimas do organismo animal, como por exemplo a classe das tranferase, das oxiredutase e das isomerase (ANDREINI; BERTINI, 2012; EVANS; HALLIWELL, 2001).

Duas enzimas desempenham importante papel na atividade do zinco, a superóxido dismutase (SOD), enzima antioxidante que catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e água (VILLANUEVA; KROSS, 2012) e a metalotioneína que é a maior reserva de zinco no organismo animal (ANDREINI; BERTINI, 2012).

A suplementação com zinco é realizada com fontes inorgânica, como óxido de zinco (ZnO), sulfato de zinco (ZnSO₄), carbonato de zinco (ZnCO₃) e cloreto de zinco (ZnCl₂) ou orgânicas com o zinco complexado em metionina, polissacarídeos ou lisina, quelado em aminoácidos, proteínado ou enriquecido com levedura de *Saccharomyces cerevisiae* (KESSLER et al., 2003; PUCHALA et al., 1999; SANDOVAL et al., 1997; VILELA et al., 2011; VILELA et al., 2012).

A absorção do zinco a nível ruminal até o momento não está totalmente esclarecida, no entanto na absorção intestinal sabe-se que duas famílias de proteínas exercem papel importante no transporte desse elemento traço, a ZIP (*Zrt/Irt-like proteins*) e a CDF (*Cation diffusion facilitator*), com as proteínas da família ZIP transportando o zinco no interior do citoplasma e as proteínas da família CDF transportando o zinco fora do citoplasma (FUKUNAKA; KAMBE, 2010).

A biodisponibilidade do zinco está relacionada com a fonte de suplementação e com a espécie animal, com resultados distintos entre fontes inorgânicas e orgânicas. Para analisar a diferença da biodisponibilidade entre essas duas fontes de zinco WANG et al. (2014) estudaram a expressão de genes ligados a proteínas de transporte em tecidos distintos de caprinos suplementados com zinco inorgânico (sulfato de zinco) e zinco orgânico (zinco aminoácido quelado) e observaram que dependendo da fonte de zinco a expressão desses genes (SLC39A1, SLC39A2, e SLC39A3) podem variar. Ainda nessa mesma linha de pesquisa foi analisado o óxido de zinco, o zinco aminoácido quelado e o zinco proteínado e foi observado que ovinos suplementados com zinco aminoácido quelado apresentam menor absorção, embora as fontes orgânicas (zinco aminoácido quelado e zinco proteínado) tenha demonstrado maior acúmulo hepático que fontes inorgânicas (óxido de zinco) (VILELA et al., 2011). Nosso grupo de pesquisa buscando analisar o metabolismo e a excreção do edetato de zinco em ovinos observou que a principal via de excreção dessa fonte de zinco parenteral é a urinária, e que a concentração de zinco tecidual não difere de animais que receberam somente zinco dietético (Dados não publicados). Entretanto, mais estudos são necessários para identificar a biodisponibilidade e metabolização de diferentes fontes de zinco, uma vez que podemos observar que esses fatores são muito vulneráveis conforme o método de suplementação.

A atividade do zinco vem sendo estudada em vários seguimentos, com a resposta imunológica sendo um dos principais alvos da suplementação desse micromineral (SHANKAR; PRASAD, 1998), com estudo recente relatando uma maior concentração de imunoglobulinas e de citocinas em ovinos infectados por *H. contortus* e tratados com zinco e

cobre parenteral em relação a ovinos infectados e não tratados (SCHAFER et al., 2014), assim como quando o zinco foi disponibilizado por via oral associado a cobalto e selênio e aumentou os níveis de imunoglobulinas (KENDALL; MACKENZIE; TELFER, 2012). Porém, em humanos a função do zinco na resposta imune foi estudada sem associação com outro micromineral e demonstrou papel importante na redução do risco e na prevenção da infecções por *Trypanosoma cruzi* em mulheres gestantes (DA COSTA et al., 2013). Já em ruminantes raros são os estudos que utilizaram zinco orgânico ou inorgânico de maneira isolada, sendo de suma importância a realização de estudos nessa espécie animal buscando analisar os efeitos de sua utilização.

O benefício da suplementação do zinco está descrita na proteção do organismo contra a ação de agentes oxidantes, demonstrando papel importante na regulação da produção de óxido nítrico (ON) em processos inflamatórios, uma vez que reduz a atividade de citocinas mediadoras da síntese de ON por inibição da atividade de transativação do Fator Nuclear kappa B (CORTESE-KROTT et al., 2014). Além disso, em coelhos com diabetes induzida a suplementação com sulfato de zinco reduziu os danos causados pelo estresse oxidativo (DUZGUNER; KAYA, 2007). E em ratos a suplementação oral de cloreto de zinco demonstrou ação protetora no epitélio gastrointestinal, pois preveniu e reverteu o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e de espécies reativas causadas pela administração oral de etanol (INEU et al., 2013). O perfil oxidativo de ovinos tratados com zinco não foi relatado até o momento, apesar de várias enfermidades que acometem esses animais desencadearem processos inflamatórios severos, sendo uma lacuna importante de ser preenchida.

Há relatos da ação do zinco no desempenho de cordeiros com melhora na qualidade da garra de lã, quando esses foram tratados por via oral com fonte orgânicas de zinco (KESSLER et al., 2003), assim como no desenvolvimento de cordeiros que suplementados com 20 mg de $ZnSO_4$ por Kg de matéria seca, apresentaram melhor desenvolvimento que os não tratados (FADAYIFAR et al., 2012). Porém, na podridão do casco (Foot rot) de ovinos a suplementado com zinco por via oral não foi efetiva no controle (REJAS LÓPEZ et al., 1999). É possível que o zinco seja importante no auxílio e controle de outras enfermidades, as quais devem ser criteriosamente analisadas, buscando avaliar a ação desse micromineral.

2.3. Estresse oxidativo em infecções por *Haemonchus contortus*

Em detrimento a infecção por helmintos o organismo animal quando mobiliza respostas imune Th2, que gera um processo inflamatório com ação de macrófagos e neutrófilos (ANTHONY et al., 2007). Essas células de defesa para eliminar o parasito produzem ERO e ERN, que causam danos a células e consequente morte do parasito (RINALDI et al., 2007). As espécies reativas não tem ação especifica contra patógenos e dependendo dos níveis de produção, podem gerar lesões em células adjacentes àquele infectado, como por exemplo, lesões na mucosa do abomaso de cordeiros infectados por *H. contortus* (MACHADO et al., 2014). No entanto, apesar de estar evidenciado que a infecção por *H. contortus* gera aumento da lipoperoxidação em cordeiro (NICOLODI et al., 2010), futuros estudos com utilização de novos marcadores oxidativo são necessário para esclarecer o perfil oxidativo de cordeiros infectados por esse parasito.

Os radicais livres, moléculas com elétrons desemparelhados, e as espécies reativas, moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem, são agentes oxidantes que podem ser procedentes de fontes endógenas como mitocôndrias, peroxissomas e citocinas inflamatórias e exógenas como raios ultra violetas e quimioterápicos. Em infecções parasitárias as fontes endógenas são as mais frequentes causadoras de lesões, e entre as espécies reativas produzidas durante a infecção parasitária podemos citar àquelas reativas ao oxigênio, como o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) e as reativas ao nitrogênio, como o óxido nítrico (NO^{\cdot}), o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (VASCONCELOS et al., 2007).

Para combater ou minimizar a ação das espécies reativas existe o sistema antioxidantes que é formado por substancias que doam elétrons para os agentes oxidantes na tentativa de neutraliza-los ou até mesmo para reparar os danos causados pelas espécies reativas, podendo os antioxidantes ser enzimáticos, como a superóxido desmutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), ou ainda não enzimáticos, como as vitaminas A, E e C, os flavanoídes e o ácido úrico (ROSENFELDT et al., 2013).

O desequilíbrio entre agentes oxidantes e agentes antioxidantes leva ao fenômeno denominado estresse oxidativo. O mecanismo antioxidante doa elétrons para os agentes oxidantes para evita que esses se liguem à células do organismo e venham a causar dano

celular. Na primeira linha de defesa antioxidante do organismo a enzima SOD, que catalisa O_2^- em H_2O_2 , evita que o O_2^- entre na reação de fenton e gere o OH^- , o mais danoso radical livre. A segunda linha de defesa antioxidante é composta por duas enzimas, a GPx e CAT que exercem função de convertem H_2O_2 em oxigênio (O_2) e água (H_2O ; Figura 4), consequentemente, evitam também a formação do OH^- (ROSENFELDT et al., 2013; VILLANUEVA; KROSS, 2012)

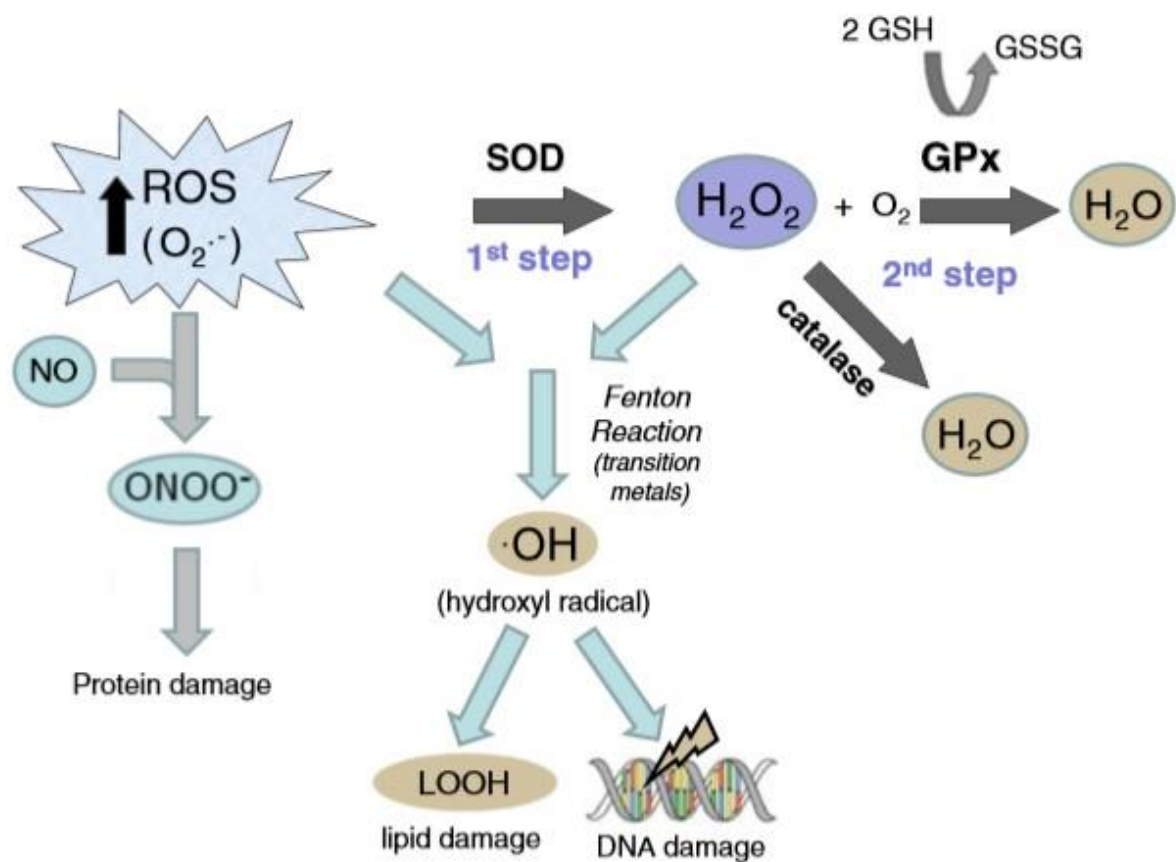


Figura 4 - Mecanismo de defesa antioxidante

Fonte: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.03.010>

Para avaliar o dano oxidativo em componentes celulares vários métodos são descritos. A avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma técnica muito utilizada. Esta avalia indiretamente a presença de malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico e forma um

cromógeno de cor rosa fluorescente, com intensidade conforme a presença de MDA (VASCONCELOS et al., 2007). Mais recentemente outros marcadores foram padronizados, e no plasma os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), como pentosidinas, carbonilos e proteínas com ligação cruzada por dityrosine, podem quantificar o grau de oxidação proteica no organismo com uma boa acurácia. O princípio dessa técnica é que as células fagocitárias aumentam a liberação de mieloperoxidase e essa leva a aumento de AOPP, sendo está quantificada em absorbância de 340 nm, utilizando como reagente o ácido cítrico (HANASAND et al., 2012). No soro, o status de oxidação total foi padronizado por EREL (2005) e é uma técnica colorimétrica, onde os oxidantes presentes na amostra oxidam o complexo íon ferroso-o-dianisidina em íon férrico. Esse íon férrico formado, em meio ácido libera um complexo com cor laranja do xilenol e a intensidade da cor é mensurada por espectrofotômetro e remete a quantidade total de moléculas oxidantes presentes na amostra.

O perfil antioxidante do organismo pode ser analisado por mensuração da atividade de enzimas antioxidantes, como a GPx e a CAT (ESMAEILNEJAD et al., 2014) além da SOD que é analisada indiretamente pela adição na amostra de uma fonte de O_2^- e um composto que seja reduzido pelo O_2^- , essas duas substancias adicionadas na amostra reagem dando origem a um cromógeno que é detectado em espectrofotômetro. Com a atividade dessa enzima sendo proporcional a inibição da formação desse cromógeno (GAETA et al., 2002). No plasma a força antioxidante pode ser mensurada pelo FRAP (*Ferric-Reducing Ability of Plasma*) o qual mensura a capacidade da amostra de reduzir Fe^{3+} em Fe^{2+} , partindo do princípio que antioxidantes tem a capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , como a vitamina C e o ácido úrico (BENZIE; STRAIN, 1996). No soro a capacidade antioxidante total (TAC) pode ser mensurada por técnica colorimétrica, onde através da reação de fenton é produzido o OH^- , o qual na presença de *o*-dianisidina reage oxidando-o, liberando coloração marrom-amarelada intensa. Esta reação quando em contato com a amostra de soro é reduzida proporcionalmente a presença de antioxidante na amostra, reduzindo a intensidade da coloração (EREL, 2004).

O estresse oxidativo causado pela infecção por *H. contortus* vem sendo estudado por nosso grupo de pesquisa, que observou aumento da peroxidação lipídica de cordeiros infectados pelo *H. contortus* em relação ao infectados e tratados com selênio (LEAL et al., 2010; LEAL et al., 2014), bem como detectou aumento na atividade da GPx em animais infectados e tratados com selênio em relação aos infectados e não tratados (LEAL et al., 2014). Além de relatar que os valores de FRAP são aumentados em cordeiros infectados em relação aos não infectados 75 dias pós-infecção e comprovar que o estresse oxidativo causa dano na mucosa do abomaso (MACHADO et al., 2014). No entanto há uma lacuna em

relação ao perfil de oxidantes e de antioxidantes em cordeiros infectados por *H. contortus* a qual deve ser preenchida, para que possamos identificar quais medidas são eficientes em reduzir os danos causados por esse nematódeo.

3. CAPITULO 2

MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de manuscrito, com sua formatação de acordo com as normas da revista ao qual foi submetido:

Research in Veterinary Science

Oxidative Stress by *Haemonchus contortus* in lambs: Influence of treatment with Zinc Edetate

Felipe Lamberti Pivoto^{a*}, Vanessa Dorneles Torbitz^b, Adelina Rodrigues Aires^a, José Francisco Xavier da Rocha^a, Marcelo Machado Severo^c, Thirssa Heleno Grando^a, Mateus Peiter^a, Rafael Noal Moresco^b, João Batista Teixeira da Rocha^d, Marta Lizandra do Rego Leal^a

^a Laboratório de Endocrinologia e Metabologia Animal (LEMA). Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

^b Departamento de análises clínicas e toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

^c Grupo de Pesquisa e Extensão em Cadeias Produtivas do Pampa (PECPAMPA). Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

^d Laboratório de Bioquímica e Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8815; fax: +55 55 3220 8257

E-mail address: felipe.pivoto@gmail.com (F.L. Pivoto)

Abstract

The aim of the present study was to assess the effects of zinc edetate on the oxidative stress of lambs infected by *Haemonchus contortus*. Twenty-four lambs were allocated into four groups: Group I – uninfected animals; Group II - uninfected animals treated subcutaneously with zinc edetate; Group III – animals infected by *H. contortus* and Group IV - animals infected and treated. The oxidative stress index (OSI) and the eggs per gram of feces (EPG) were assessed after 10, 17, 24, 31 and 38 days post-infection. Based on the EPG and the quantity of adult *H. contortus*, the infection did not differ between groups III and IV. Zinc edetate reduced the OSI in Group IV in relation to Group I after 24 days post-infection, and in relation to group III after 31 days post-infection. Treatment with zinc edetate could help reduce the oxidative stress induced by *H. contortus* in lambs.

Keywords: Oxidative stress index; zinc edetate; *Haemonchus contortus*; sheep

1. Introduction

Haemonchus contortus infection is one of the main obstacles in sheep farming as it causes reductions in weight gain, thereby increasing the cost of production (Miller et al., 2012; Pivoto et al., 2014). In order to control this infection, the animal's body triggers several defense mechanisms, such as the production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages, eosinophils and neutrophils (Kotze, 2003; Woodbury et al., 1984). These

defense mechanisms act against parasites, but may also damage various cells and tissues of the animal's body as a result of the oxidative stress that occurs when the production of ROS exceeds the capacity of neutralization by antioxidants. Indeed, the intense oxidative phenomenon causes various types of damage to the animal's health due to a reduction in its immune capacity (Rosenfeldt et al., 2013).

Several studies about the role of minerals in the protection of the organism against the effects of ROS have been reported. For example, the use of copper has shown antioxidant activity in patients with neurological diseases (Scheiber et al., 2014), and selenium improves the antioxidant response of mice challenged with diazinon and subjected to intense physical activity (El-Demerdash and Nasr, 2014; Prigol et al., 2009). Zinc is an essential component of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (Whittaker, 2010) and it effectively protects the gastrointestinal epithelium from the effects caused by the oral administration of ethanol in rats (Ineu et al., 2013). In addition, it reduces the effects of oxidative stress in diabetic rabbits (Duzguner and Kaya, 2007).

Oxidative stress in small ruminants has been poorly studied. Previous studies have demonstrated that selenium, with or without copper, can reduce the oxidative stress caused by *H. contortus* infection (Leal et al., 2014). Similarly, vitamin E and selenium do not affect the oxidative profile of lambs severely infected by this nematode (Nicolodi et al., 2010). However, until now, there are no reports that describe the effects of zinc edetate on sheep infected by *H. contortus*. In the present study, it was hypothesized that treatment with zinc edetate would enhance antioxidant activity in sheep. Therefore, the aim of the present study was to assess the effects of zinc edetate on the oxidative stress of lambs experimentally infected with *H. contortus*.

2. Material and methods

2.1. *Animals*

Twenty-four five-month-old male lambs (12 Suffolk and 12 Corriedale) were used in the present study. The animals were housed in collective pens (one experimental group per pen), kept in holding pens at the Teaching Veterinary Hospital of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The animals were submitted to an adaptation period of 30 days when receiving anthelmintic treatment (Monepantel, Zolvix® - Novartis Animal Health, 2.5 mg/kg¹).

During the adaptation period and throughout the study, sheep were fed three times per day with a diet based on 40% oat hay (*Avena sativa*) and 60% wheat bran plus soybean, totaling 13% crude protein. The zinc content in the feed given to the animal was determined at the Chemical Analyses Laboratory of the UFSM, and a quantity of 62.31 mg of zinc was provided for each animal every day. All of the lambs exhibited zero eggs per gram of feces (EPG) 20 days after the anthelmintic treatment.

2.2. *Experimental groups*

The animals were divided into four groups based on breed (3 Suffolk and 3 Corriedale lambs in each group) and weight, as follows: Group I - uninfected animals (n = 6); Group II - uninfected animals treated with zinc edetate (n = 6); Group III – animals infected by *H. contortus* (n = 6); and Group IV – animals infected by *H. contortus* and treated with zinc edetate (n = 6).

2.3. *Experimental infection*

The *H. contortus* larvae used in this study were obtained using the O'Sullivan and Roberts technique (Van Wyk et al., 2004). The experimental infection was performed as

described by Rowe et al. (2008), with modifications. Third stage larvae (n = 4,000) were diluted in 5 mL of distilled water and administered orally three times every two days, totaling 12,000 third stage larvae (L3) per animal. The first day of infection was established as day 0 of the experiment (D0).

2.4. *Treatment*

Ten and twenty four days after the first infection (based on the pilot study, unpublished data), the animals in Groups II and IV were treated subcutaneously (SC) with zinc edetate (DBS06730, equivalent) at a dose of 3 mg kg⁻¹ of body weight. At the same moment, animals in Groups I and III received 1 mL of ultra-pure water subcutaneously.

2.5. *Sample collection*

Blood samples were collected by jugular venipuncture using vacutainer (Becton, Dickison and Company, San Jose – CA, USA) on day 10, 17, 24, 31 and 38 (D10, D17, D24, D31 and D38, respectively) after the first infection. The sera samples were centrifugated and stored at - 80 °C until analysis. Simultaneously, fecal samples were collected and analyzed immediately. On D38, three animals from each group were euthanized (Acepromazine 10 mg, Sodium thiopental 1 g and 100 mL of Potassium chloride, intravenously) and the abomasum was collected to quantify adult *H. contortus* (L5).

All procedures performed were previously approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal de Santa Maria (038/2014).

2.6. *Laboratory procedures*

The quantification of eggs per gram of feces (EPG) was performed using the McMaster technique, with a sensitivity of 100 EPG (Coles et al., 2006). The quantification of adult *H. contortus* (L5) was carried out according to the classical technique described by Ueno and Gonçalves (1998).

2.7. Oxidative profile assay

2.7.1. Total oxidant status (TOS)

The total oxidation status of sera were determined according to a previously described technique (Erel, 2005), which is based on the oxidation from ferrous ion to ferric ion. This phase occurs in the presence of oxidative species in acid medium. The measurement of ferric ion is determined by xylenol orange. The results were expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalents/L.

2.7.2. Total antioxidant capacity (TAC)

The total antioxidant capacity of sera was assessed using the method described by Erel (2004), which is based on bleaching and the characteristic color of a more stable 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid - ABTS) radical cation, caused by antioxidants. The results were expressed in $\mu\text{mol Trolox equivalents/L}$.

2.7.3. Oxidative stress index (OSI)

Both of these techniques (TOS and TAC) were performed to obtain the oxidative stress index (OSI) using the formula $[(\text{TOS}, \mu\text{mol/L})/(\text{TAC}, \mu\text{mol Trolox equivalents/L}) \times 100]$ (Aycicek et al., 2005).

2.8. Statistical analysis

Data were initially analyzed through the test of normality (Kolmogorov-Smirnov test). Non-parametric data (EPG and quantification of adult *H. contortus*) were transformed in log ($X + 1.5 \log_{10}$) and subjected to analysis of repeated measures (ANOVA), followed by Tukey's test. The parametric data (OSI) were subjected to analysis of repeated measures (ANOVA), followed by Tukey's test with 10% significance level. The values were expressed as means \pm standard error.

3. Results

3.1. Parasitic parameters

The EPG values were zero in all groups on D10 and continued at zero in Groups I and II until the end of the experiment (D38). On D17, the EPG values in Groups III and IV were 383.3 ± 122.2 and 283.3 ± 144.7 , respectively. On the last day, these values increased to $36,040.0 \pm 4,675.4$ and $42,025.0 \pm 7,194.0$ in Groups III and IV, respectively (Figure 1A). In Groups I and II, adult *H. contortus* were not retrieved, whereas in Groups III and IV the numbers of *H. contortus* adult were $5,782.5 \pm 810.9$ and $6,185.0 \pm 15.0$, respectively (Figure 1B).

3.2. Oxidative profile

The oxidative stress index (OSI) is shown in Figure 2. Seven days after the first treatment (D17), the OSI values were 6.15 ± 1.78 in Group I (uninfected) and 3.90 ± 0.39 in Group II (uninfected and treated with zinc edetate). On D24, the OSI values of Group I (5.91 ± 0.66) were higher ($p = 0.0082$) than those detected in lambs infected by *H. contortus* and

treated with zinc edetate (Group IV; 4.34 ± 0.61). On D31, the OSI values were lower ($p = 0.0611$) in Group IV (3.62 ± 0.39) than in Group III (4.67 ± 0.43), which contained the animals that were untreated and infected by *H. contortus*. At the end of the experiment (D38), Groups I and II exhibited OSI values of 5.99 ± 0.37 and 6.17 ± 0.97 , respectively, and lower OSI values ($p = 0.0492$) were found in Group III (5.69 ± 0.31) than in Group IV (6.45 ± 0.50).

4. Discussion

The data shown in Figure 1 confirm that *H. contortus* infection was established in the animals of Groups III and IV, whereas the lambs of Groups I and II were not challenged by this nematode. These data are relevant, since in this way it is possible to analyze the effects of the increase of ROS production that occurs through the mobilization of defense cells (Silva et al., 2012) in an attempt to control infection by gastrointestinal parasites (Hultqvist et al., 2009). ROS, when produced in high quantity, can injure the animal's body and threaten the animal's health (Sorg, 2004).

The quantity of adult *H. contortus* and EPG did not differ ($p > 0.01$) between Groups III (untreated) and IV (treated with zinc edetate), indicating that the zinc administered subcutaneously did not affect the infection by *H. contortus*. In studies with other minerals, the parenteral use of copper (subcutaneously) associated with selenium (intramuscularly) reduced the quantity of adult *H. contortus* in lambs (Leal et al., 2014). However, in this previous study, the infection was considered smooth, unlike the severe infection used herein. Further, the oral use of copper in capsules of slow absorption has demonstrated an increase in the hematocrit and a reduction of EPG and adult *H. contortus* in sheep and goats that were moderately infected by this nematode (Soli et al., 2010).

On D17 (seven days after treatment with zinc edetate) the OSI values showed difference between non-infected groups (I and II) (Figure 2). This result indicates a reduction

of oxidative stress by zinc, a trace element essential for the synthesis of the metalloenzyme zinc/copper superoxide dismutase, the first antioxidant barrier of the organism, which catalyzes the dismutation of superoxide anion radical in hydrogen peroxide, preventing the formation of a bond between this anion and heavy metals such as iron, which produces hydroxyl radical, the most deleterious of all ROS (Rosenfeldt et al., 2013).

On D24, Group I recorded higher OSI values than Group IV, this finding is extremely important, since it indicates that zinc in infected animals may assist in the reduction of oxidative stress caused by *H. contortus* infection. Although the values found in Group IV did not differ from those in Group III (Figure 2). The phagocytic cells are the main defense mechanism of the organism against *H. contortus*. These cells release ROS by respiratory burst, which can bind to molecules, causing destabilization and the cellular death of the parasite (Ramaiah and Jaeschke, 2007). The action of ROS is primarily directed to antigens. However, if the production is exacerbated, damage occurs in the proteins, lipids and DNA of the host. In order to reduce the damage to the host cells, while simultaneously increasing ROS, occurs a mobilization of non-enzymatic antioxidants, with vitamins and flavonoids (Rosenfeldt et al., 2013), which probably may explain the absence of differences between the OSI values in Groups III and IV.

The role of zinc in reducing the oxidative stress in animals infected by *H. contortus* was also observed on D31 (Figure 2). The OSI values of Group IV were lower than those of Group III ($p = 0.0611$), demonstrating that zinc enhanced the antioxidant action of the organism. Similarly, the reduction of lipid peroxidation in sheep infected by *H. contortus* (Leal et al., 2014) and in mice challenged by diazinon (El-Demerdash and Nasr, 2014) have been previously reported. Moreover, a previous study demonstrated that vitamin E (dose of 0.06 g kg⁻¹ of dry matter) reduced oxidative stress in the liver of lambs infected by *Fasciola hepatica* (Martínez-Pérez et al., 2014).

At the end of the experiment (D38), the groups treated with zinc (II and IV) exhibited higher OSI values than the untreated groups (I and III). A zinc deficiency negatively affects the animal's health, causing immunological and reproductive disorders (Ackland and Michalczyk, 2006). However, it is important to highlight that high concentrations of trace elements are toxic to the animal's organism (Herdt and Hoff, 2011). Considering that the zinc treatment was performed on D10 and D24, high concentrations of this mineral could have been detected on D38. Zinc is associated with the concentration of antioxidants in the organism (Rosenfeldt et al., 2013), which explains the likely pro-oxidant effect of this trace element on D38. Since, higher concentrations of antioxidants in relation to oxidants may induce oxidative stress (Villanueva and Kross, 2012).

Few studies have reported the nutraceutical role of trace minerals in ruminants infected by parasites. The present study demonstrated that zinc edetate could help reduce the oxidative stress caused by *H. contortus* in lambs, although a reduction of the parasite load was not achieved. Further studies are required to determine the dose and frequency of use of zinc in lambs infected by *H. contortus*.

References

- Ackland, M.L., Michalczyk, A., 2006. Zinc deficiency and its inherited disorders -a review. *Genes & Nutrition* 1, 41-49.
- Aycicek, A., Erel, O., Kocyigit, A., 2005. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatrics International* 47, 635-639.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic

- resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136, 167-185.
- Duzguner, V., Kaya, S., 2007. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radical Biology and Medicine* 42, 1481-1486.
- El-Demerdash, F.M., Nasr, H.M., 2014. Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28, 89-93.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry* 37, 112-119.
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry* 38, 1103-1111.
- Herd, T.H., Hoff, B., 2011. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27, 255-283.
- Hultqvist, M., Olsson, L.M., Gelderman, K.A., Holmdahl, R., 2009. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends in Immunology* 30, 201-208.
- Ineu, R.P., Oliveira, C.S., Oliveira, V.A., Moraes-Silva, L., da Luz, S.C.A., Pereira, M.E., 2013. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. *Food and Chemical Toxicology* 58, 522-529.
- Kotze, A.C., 2003. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide in vitro. *International Journal for Parasitology* 33, 393-400.
- Leal, M.L.d.R., Pivoto, F.L., Fausto, G.C., Aires, A.R., Grando, T.H., Roos, D.H., Sudati, J.H., Wagner, C., Costa, M.M., Molento, M.B., Rocha, J.B.T.d., 2014. Copper and

- Selenium: auxiliary measure to control infection by *Haemonchus contortus* in lambs. *Experimental Parasitology* 144, 39-43.
- Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Benavides, J., Morán, L., Andrés, S., Giráldez, F.J., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M., 2014. Effect of Dietary Supplementation With Flaxseed Oil Or Vitamin E on Sheep Experimentally Infected with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 97, 71-79.
- Miller, C.M., Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Candy, P.M., Oliver, A.M.B., Watson, T.G., 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Veterinary Parasitology* 186, 376-381.
- Nicolodi, P.R.S.J., Camargo, E.V.d., Zeni, D., Rocha, R.X.d., Cyrillo, F.C., Souza, F.N.d., Della Libera, A.M.M., Bondan, C., Leal, M.L.d.R., 2010. Perfil proteico e metabolismo oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. *Ciência Rural* 40, 561-567.
- Pivoto, F.L., Machado, F.A., Anezi-Junior, P.A., Weber, A., Cezar, A.S., Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F., 2014. Improving liveweight gain of lambs infected by multidrug-resistant nematodes using a FECRT-based schedule of treatments. *Parasitology Research* 113, 2303-2310.
- Prigol, M., Luchese, C., Nogueira, C.W., 2009. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. *Cell Biochemistry and Function* 27, 216-222.
- Ramaiah, S.K., Jaeschke, H., 2007. Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Acute Inflammatory Liver Injury. *Toxicologic Pathology* 35, 757-766.
- Rosenfeldt, F., Wilson, M., Lee, G., Kure, C., Ou, R., Braun, L., de Haan, J., 2013. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology and therapy. *Experimental gerontology* 48, 45-54.

- Rowe, A., Gondro, C., Emery, D., Sangster, N., 2008. Genomic analyses of *Haemonchus contortus* infection in sheep: Abomasal fistulation and two *Haemonchus* strains do not substantially confound host gene expression in microarrays. *Veterinary Parasitology* 154, 71-81.
- Scheiber, I.F., Mercer, J.F.B., Dringen, R., 2014. Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology* 116, 33-57.
- Silva, B.F., Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T., 2012. Immune responses in sheep naturally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) and gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 190, 120-126.
- Soli, F., Terrill, T.H., Shaik, S.A., Getz, W.R., Miller, J.E., Vanguru, M., Burke, J.M., 2010. Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. *Veterinary Parasitology* 168, 93-96.
- Sorg, O., 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327, 649-662.
- Ueno, H., Gonçalves, P. (Ed.), 1998. Manual for diagnosis of helminthiasis in ruminants. Press Color, Salvador, 143 pp.
- Van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M., 2004. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology* 119, 277-306.
- Villanueva, C., Kross, R.D., 2012. Antioxidant-induced stress. *International journal of molecular sciences* 13, 2091-2109.
- Whittaker, J.W., 2010. Metal uptake by manganese superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 298-307.
- 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.

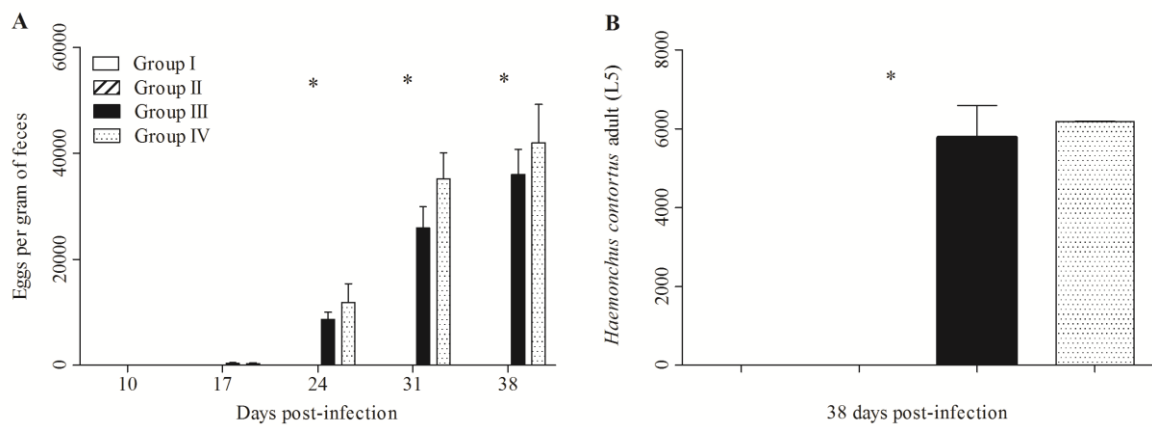


Fig 1. Egg count per gram of feces (A) and number of *Haemonchus contortus* adult (B) in uninfected (Group I), uninfected and treated with zinc edetate (Group II), infected by *H. contortus* (Group III) and infected by *H. contortus* and treated with edetate zinc (Group IV) animals.

* Indicates statistical difference ($p < 0.0001$) between Groups I and II, when compared with Groups III and IV.

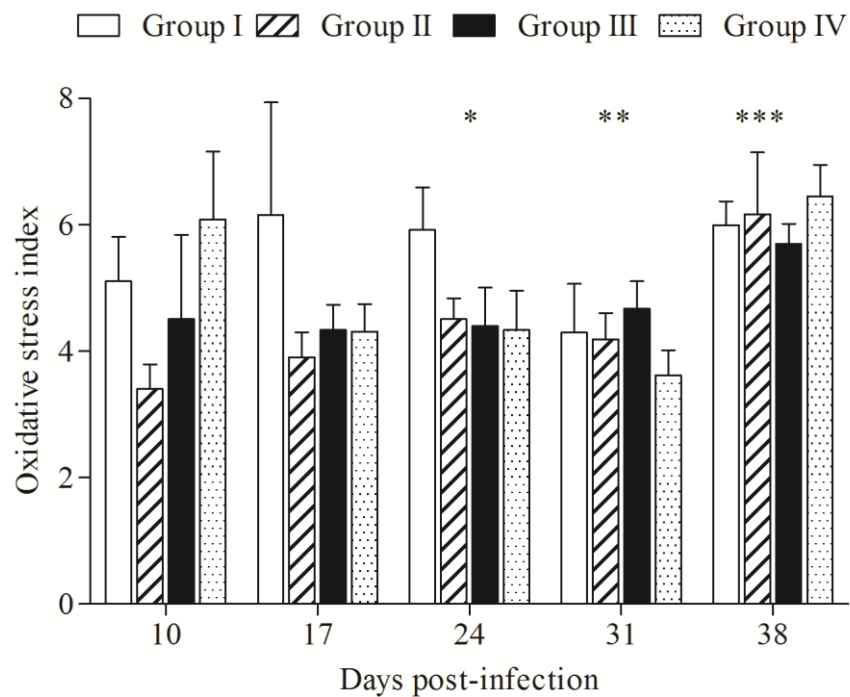


Fig 2. Oxidative stress index (OSI) in uninfected (Group I), uninfected and treated with zinc edetate (Group II), infected by *H. contortus* (Group III) and infected by *H. contortus* and treated with edetate zinc (Group IV) animals.

* Indicates statistical difference between groups I and IV ($p = 0.0082$), ** between groups III and IV ($p = 0.0611$), and *** between groups III and IV ($p = 0.0492$).

4. CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos principais entraves da criação de ovinos é o parasito gastrointestinal *H. contortus* e seu controle deve ser realizado com auxilio de métodos alternativos e com fomento de médicos veterinários capacitados.

O estresse oxidativo é um agravante na infecção por *H. contortus*, lesando células teciduais e de defesa imunológica, sendo essencial a utilização de medidas que previnam o seu desenvolvimento. O zinco é um importante micromineral e pode auxiliar no controle do estresse oxidativo causado pelo *H. contortus*. Porém com a carga parasitária em ovinos não sofrendo interferência do tratamento com edetato de zinco por via subcutânea.

5. REFERENCIAS

ACKLAND, M. L.; MICHALCZYK, A. Zinc deficiency and its inherited disorders -a review. **Genes & Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 41-49, 2006.

ALMEIDA, F. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, n.4, p. 622-625, 2010.

AMARANTE, A. F. T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**, v. 118, n. 1/3, p. 56-62, 2014

ANDREINI, C., BERTINI, I. A bioinformatics view of zinc enzymes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 111, p. 150-156, 2012.

ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 12, p. 975-987, 2007.

AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. **Pediatrics International**, v. 47, n. 6, p. 635-639, 2005.

BAMBOU, J. et al. Effect of dietary supplementation on resistance to experimental infection with *Haemonchus contortus* in Creole kids. **Veterinary Parasitology**, v.178, n. 3/4, p. 279 – 285, 2011.

BARRÈRE, V. et al. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitology International**, v. 62, n.5, p 464-470, 2013.

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. ½, p. 275-279, 2012.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BRICARELLO, P. A. et al. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1/2, p. 99-109, 2005.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012.

CEZAR, A. S. et al. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1/2, p. 157-160, 2010.

CHYLINSKI, C. et al. Exploring the limitations of pathophysiological indicators used for targeted selective treatment in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, In press, 2014. doi. 10.1016/j.vetpar.2014.10.029,

COLES, G. C. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3/4, p. 167-185, 2006.

CORTESE-KROTT, M. M. et al. Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells. **Redox Biology**, v. 2, p. 945-954, 2014.

DA COSTA, C. M. B. Zinc and pregnancy: Marked changes on the immune response following zinc therapy for pregnant females challenged with *Trypanosoma cruzi*. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 4, p. 592-598, 2013.

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.

DE WOLF, B. M. The effect of vitamin E supplementation on an experimental *Haemonchus contortus* infection in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1/2, p. 140-149, 2014.

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.

DUZGUNER, V.; KAYA, S. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 10, p. 1481-1486, 2007.

EL-DEMERDASH, F. M., NASR, H. M. Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 1, p. 89-93, 2014.

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 112-119, 2004.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical biochemistry**, v. 38, n.12, p. 1103-1111, 2005.

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, n. 1/2, p. 38-45, 2014.

EVANS, P., HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **The British journal of nutrition**, 85 Suppl 2, S67-74, 2001.

FADAYIFAR, A. Improvement in lamb performance on barley based diet supplemented with zinc. **Livestock Science**, v. 144, n. 3, p. 285–289, 2012.

FALZON, L. C. et al. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1/3, p. 150-162, 2013.

FAUSTO, G. Protein profile of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with selenium and copper. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 355-341, 2014.

FUKUNAKA, A., KAMBE, T. Mechanism of zinc transport by zinc transporters, ZnT and ZIP. Seikagaku. **The Journal of Japanese Biochemical Society**, v. 82, n. 1, p. 30-34, 2010.

GAETA, L. M. et al. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. **Clinica Chimica Acta**, v. 322, n. 1/2, p. 117-120, 2002.

GALINDO-BARBOZA, A. J. et al. Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2/3, p. 201-207, 2011.

GARG, A. K.; MUDGAL, V.; DASS, R. S. Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n.1/2, p. 82-96, 2008.

GEURDEN, T. et al. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastrointestinal nematodes in France, Greece and Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1/2, p. 59-66, 2014.

GROSZ, D. D. et al. Overwintering strategies of a population of anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* within a sheep flock from the United States Northern Great Plains. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n.1/2, p. 143-152, 2013.

HANASAND, M. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica chimica acta**, v. 413, n. 9/10, p. 901-906, 2012.

HERDT, T. H.; HOFF, B. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 2, p. 255-283, 2011.

HUDSON, A. L.; SOTIRCHOS, I. M.; DAVEY, M. W. The activity and hydrogen peroxide sensitivity of the peroxiredoxins from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 176, n.1, p. 17-24, 2011.

Hultqvist, M., Olsson, L.M., Gelderman, K.A., Holmdahl, R., 2009. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends in Immunology* 30, 201-208.

INEU, R. P. et al. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 522-529, 2013.

JABBAR, A. et al. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. **Life Sciences**, v. 79, n. 26, p. 2413-2431, 2006.

JURASEK, M. E. et al. Modification and further evaluation of a fluorescein-labeled peanut agglutinin test for identification of *Haemonchus contortus* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1/2, p. 209-213, 2010.

KENDALL, N. R.; MACKENZIE, A. M.; TELFER, S. B. The trace element and humoral immune response of lambs administered a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus. **Livestock Science**, v. 148, n. 1/2, p. 81-86, 2012.

KESSLER, J. et al. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass, meat and claw quality in fattening bulls. **Livestock Production Science**, v. 81, n. 2/3, p. 161-171, 2003.

KHAN, F. A. et al. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Livestock Science**, v. 150, n. 1/3, p. 143-151, 2012.

KOTZE, A. C. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide in vitro. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 393-400, 2003.

LEAL, M. L. d. R. Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Research Communication**, v. 34, n. 6, p. 549-555, 2010.

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

LI, X. et al. Evaluation of a recombinant excretory secretory *Haemonchus contortus* protein for use in a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 242-246, 2007.

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. doi: 10.1016/j.prp.2014.09.006

MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M. et al. Effect of Dietary Supplementation With Flaxseed Oil Or Vitamin E on Sheep Experimentally Infected with *Fasciola hepatica*. **Research in Veterinary Science**, In press, 2014. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.05.009

MARTÍNEZ-VALLADARES, M. et al. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1/2, p. 177-181, 2013.

MELVILLE, L. et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Haemonchus contortus* eggs in ovine faecal samples. **Veterinary Parasitology**, In press, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.10.022

MILLER, C. M. et al. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3/4, p. 376-381, 2012.

MITCHELL, E. S. E. et al. Anthelmintic resistance on sheep farms in Wales. **Veterinary Record**, v. 166, n. 21, p. 650-652, 2010.

MOLENTO, M. B. et al. Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA method compared with preventive control in ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 3/4, p. 314-319, 2009.

NICIURA, S. C. M. et al. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n.3/4, p. 608-612, 2012.

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, p. 561-567, 2010.

NNADI, P.; KAMALU, T.; ONAH, D. The effect of dietary protein supplementation on the pathophysiology of *Haemonchus contortus* infection in West African Dwarf goats. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3/4, p. 256-261, 2007.

PEÑA-ESPINOZA, M. et al. Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. **Veterinary Parasitology**, In press, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.10.017

PIVOTO, F. L. et al. Improving liveweight gain of lambs infected by multidrug-resistant nematodes using a FECRT-based schedule of treatments. **Parasitology Research**, v. 113, n. 6, p. 2303-2310, 2014.

PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 4, p. 216-222, 2009.

PUCHALA, R.; SAHLU, T.; DAVIS, J.J. Effects of zinc-methionine on performance of Angora goats. **Small Ruminant Research**, v. 33, n. 1, p. 1-8, 1999.

RAMAIAH, S. K.; JAESCHKE, H. Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Acute Inflammatory Liver Injury. **Toxicologic Pathology**, v.35, n. 6, p. 757-766, 2007.

REJAS LÓPEZ, J. et al. Failure of oral zinc supplementation to control ovine foot rot. **Small Ruminant Research**, v. 31, n. 3, p. 273-276, 1999.

RIALCH, A.; VATSYA, S.; KUMAR, R.R. Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats of sub-Himalyan region of northern India using different tests. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 3/4, p. 312-318, 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.

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.

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. 1/2, p. 71-81, 2008.

SANDOVAL, M. Estimation of the relative bioavailability of zinc from inorganic zinc sources for sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 66, n.1/4, p. 223-235, 1997.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 1/3, p. 89-109, 2001.

SANTOS, J. M. L. d. et al. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3/4, p. 160-164, 2014.

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

SCHEIBER, I. F.; MERCER, J. F. B.; DRINGEN, R. Metabolism and functions of copper in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 116, p. 33-57, 2014.

SHANKAR, A. H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 2, 447S-463S, 1998.

SILVA, B. F.; BASSETTO, C. C.; AMARANTE, A. F. T. Immune responses in sheep naturally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) and gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1/2, p. 120-126, 2012.

SOLI, F. et al. Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1/2, p. 93-96, 2010.

SORG, O., Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

SUTHERLAND, I. A.; SHAW, J.; SHAW, R. J.; The production costs of anthelmintic resistance in sheep managed within a monthly preventive drench program. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 300-304. 2010.

UENO, H.; GONÇALVES, P. **Manual for diagnosis of helminthiasis in ruminants**. 1998. 143 p.

VADLEJCH, J. et al. The effect of risk factors of sheep flock management practices on the development of anthelmintic resistance in the Czech Republic. **Small Ruminant Research**, v. 117, n. 2/3, p. 183-190, 2014.

VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 4, p. 277-306, 2004.

VAN WYK, J.A. et al. Targeted selective treatment for worm management—How do we sell rational programs to farmers? **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 336-346, 2006.

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.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1/2, p. 209-216, 2012.

VILELA, F. G. et al. Biodisponibilidade de fontes orgânicas e inorgânicas de zinco em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 448-455, 2011.

VILELA, F. G. et al. Supplementation of diets for Santa Ines sheep with organic and inorganic zinc sources. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 2134-2138, 2012.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R. D. Antioxidant-induced stress. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 2, p. 2091-2109, 2012.

WANG, L. F. et al.. Effect of zinc source on the expression of ZIPII transporter genes in Guanzhong dairy goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 195, p. 129-135, 2014.

WHITTAKER, J. W. Metal uptake by manganese superoxide dismutase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 298-307, 2010.

WOODBURY, R. G. et al. Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. **Nature**, v. 312, n. 5993, p. 450-452, 1984.

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.