

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Suplementação alimentar em cordeiros: influência
sobre a imunidade do hospedeiro, biologia e
patogenia de *Haemonchus contortus* e
Trichostrongylus colubriformis

NADINO CARVALHO

Botucatu – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Suplementação alimentar em cordeiros: influência
sobre a imunidade do hospedeiro, biologia e
patogenia de *Haemonchus contortus* e
Trichostrongylus colubriformis

Nadino Carvalho

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Botucatu – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Nadino.

Suplementação alimentar em cordeiros : influência sobre a imunidade do hospedeiro, biologia e patogenia de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* / Nadino Carvalho. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Capes: 50502042

1. Cordeiro. 2. Ovino - Criação. 3. Helminto - Controle.
4. Suplementos dietéticos. 5. Nutrição - Avaliação.
6. *Haemonchus contortus*. 7. *Trichostrongylus*.

Palavras-chave: Controle de helmintos; Dieta; Ovinocultura.

Nome do Autor: Nadino Carvalho

Título: Suplementação alimentar em cordeiros: influência sobre a imunidade do hospedeiro, biologia e patogenia de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*

COMISSÃO EXAMINADORA

Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Presidente e Orientador
Departamento de Parasitologia
IBB – UNESP - Botucatu

Andre Michel de Castilhos
Membro
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Katia Denise Saraiva Bresciani
Membro
Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal
FMVA – UNESP – Araçatuba

Helder Louvandini
Membro
Laboratório de Nutrição Animal, Centro de Energia Nuclear na Agricultura
USP- Piracicaba

Fabiana Alves de Almeida
Membro
Departamento de Parasitologia
IBB – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 17 de agosto de 2017.

Dedicatória

*A minha mãe, que não teve
medo do cabo da enxada para
ver seus dois filhos formados.*

Agradecimentos

Agradeço a Maria do Socorro Santos e Genádio Miguel Bezerra de Carvalho, pelo incentivo aos estudos e busca pelo conhecimento, a minha esposa, Gabriela de Souza Carvalho, pelo apoio incondicional.

Agradeço a meu orientador, Alessandro F. T. Amarante, por suas inúmeras contribuições e sugestões.

Agradeço aos membros da banca examinadora da qualificação, Jose Carlos de Figueiredo Pantoja, Elizabeth M. dos Santos Schmidt, Regina Kiomi Takahira e Paulo Francisco Domingues, por dedicar atenção na qualificação e pelas muitas contribuições para melhorar o trabalho.

Agradeço aos examinadores desta tese, Andre Michel de Castilhos, Katia Denise Saraiva Bresciani, Helder Louvandini, Fabiana Alves de Almeida, Raimundo Souza Lopes, Raquel Abdallah da Rocha Oliveira e César Cristiano Bassetto, pela dedicação e minuciosa atenção na leitura deste trabalho, e pelas correções, que contribuíram para minha formação científica.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Helminologia Veterinária, Ana Cláudia Albuquerque, Ana Paula Danti Bueno, César Cristiano Bassetto, Fabiana Alves de Almeida, Gabriela Fracasso Caetano, Nayara Capaldi dos Santos, Marina Laís Sabião de Toledo Piza, Michelle Cardoso dos Santos, Renan Costa Starling pelo auxílio durante a execução dos estudos, participando na parte pratica ou debatendo ideias com o intuito de melhorar o trabalho. Ainda do laboratório, agradeço especialmente a Alessandro Amarante, que toda quinta descia para ajudar nas coletas, Caio Santos Pennacchi, bolsista de iniciação científica desse projeto e José Henrique das Neves, que colaborou imensamente durante o desenvolvimento do projeto, ficando responsável pela parte da alimentação dos animais.

Agradeço a Anna Júlia Tavernaro, Catarina Demarchi, Diego dos Santos Marcelino, Diogo Wittingham da Silva, Frederico Ducatti, Letícia Vecchi Toledo, Marcelo Becker, que auxiliaram na execução do projeto.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o doutorado e à FAPESP pelo auxílio à pesquisa (Processo 2015/14751-3).

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Nematódeos gastrointestinais em ovinos.....	11
2.2. Resposta imune ao parasitismo	12
2.3. Nutrição e imunidade.....	15
3. SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR EM CORDEIROS: INFLUÊNCIA SOBRE A IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO, BIOLOGIA E PATOGENIA DE <i>Haemonchus contortus</i> E <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	19
1. Introdução	21
2. Material e métodos	22
3. Resultados.....	27
4. Discussão	36
5. Conclusão	38
4. DESEMPENHO PRODUTIVO DE CORDEIROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE POR <i>Haemonchus contortus</i> E <i>Trichostrongylus colubriformis</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES PLANOS NUTRICIONAIS..	42
1. Introdução	44
2. Material e métodos	45
3. Resultados e Discussão	49
4. Conclusões	55
5. DISCUSSÃO GERAL.....	57
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

Resumo

Na produção animal o planejamento nutricional inadequado desencadeia grandes prejuízos ao sistema produtivo, trazendo consequências adversas aos animais e menores lucros ao criador. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da suplementação alimentar sobre a imunidade dos cordeiros, biologia e patogenia de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. Quarenta e quatro cordeiros machos da raça Dorper com aproximadamente quatro meses e $31,5 \pm 3,24$ kg de peso corporal foram alocados aleatoriamente em quatro dietas à base de feno triturado, *Cynodon dactylon* (cv. Tyfton), acrescido de 0%, 25%, 50% ou 75% de concentrado. Em cada dieta sete animais foram infectados com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias ao longo de 12 semanas. Em cada dieta, quatro animais permaneceram como grupo controle, Não-Infectados. Os grupos experimentais foram: 0%-Infectado, 0%-Não-Infectado, 25%-Infectado, 25%-Não-Infectado, 50%-Infectado, 50%-Não-Infectado, 75%-Infectado e 75%-Não-Infectado. Quanto maior a suplementação, menor a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de *H. contortus* ($P < 0,0001$), porém sem influência sobre contagem de OPG de *T. colubriformis*. O número de fêmeas de *H. contortus* foi maior no grupo 0% infectado que nas demais dietas ($P = 0,0052$). Em nenhuma fase parasitária de *T. colubriformis* houve efeito da Dieta ($P > 0,05$). Animais da dieta 0%-Infectado tiveram menor volume globular (VG) que seu grupo controle 0%-Não-Infectado a partir do dia 49 do início das infecções ($P < 0,05$). Na dieta 25% essa diferença entre animais infectados e não infectados só ocorreu na última aferição de VG, dia 84 após o início das infecções. Nas demais dietas não houve diferença significativa. Não houve efeito da dieta sobre os parâmetros imunológicos avaliados ($P > 0,05$). Houve redução no consumo de matéria seca, ganho em peso diário e rendimento de carcaça fria de animais infectados ($P < 0,05$). Dieta com 10,18% de proteína metabolizável e 2418 Kcal/kg de energia metabolizável (dieta com 50% de concentrado) confere resistência a infecções por *H. contortus*, pois reduz a contagem de OPG e a quantidade de fêmeas adultas recuperadas do abomaso, bem como resiliência, pois minimiza o aparecimento de anemia e hipoproteinemia.

Palavras-chave: Ovinocultura, dieta, controle de helmintos.

Abstract

In animal production inadequate nutritional planning triggers great damage to the productive system, bringing adverse consequences to the animals and lower profits to the breeder. The objective of this work was to evaluate the influence of dietary supplementation on lamb immunity, biology and pathogenesis of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. Forty-four male Dorper lambs with approximately four months and 31.5 ± 3.24 kg body weight were randomly assigned to four diets based on crushed hay, *Cynodon dactylon* (cv Tyfton), supplemented with 0%, 25 %, 50% or 75% concentrate. In each diet seven animals were infected with 1000 infective larvae (L3) of *H. contortus* and 1000 L3 of *T. colubriformis* every three days for 12 weeks. In each diet, four animals remained as a control group, Non-Infected. The experimental groups were: 0%-Infected, 0%-Non-Infected, 25%-Infected, 25%-Non-Infected, 50%-Infected, 50%-Non-Infected, 75%-Infected e 75%-Non-Infected. The higher the supplementation, the lower the egg count per gram feces (OPG) *H. contortus* ($P < 0.0001$), but no effects on OPG count *T. colubriformis*. The number of females of *H. contortus* was higher in the 0% infected group than in the other diets ($P = 0.0052$). In any parasitic phase *T. colubriformis* was no effect of diet ($P > 0.05$). Animals of the 0% -Infected diet had lower globular volume (GV) than their control group 0% -Non-Infected from day 49 of the onset of infections ($P < 0.05$). In the diet 25%, this difference between infected and uninfected animals only occurred at the last GV measurement, day 84 after the onset of infections. In the other diets there was no significant difference. There was no effect of the diet on the immunological parameters evaluated ($P > 0.05$). There was a reduction in dry matter intake, daily weight gain and cold carcass yield of infected animals ($P < 0.05$). Diet with 10.18% of metabolizable protein and 2418 Kcal/kg of metabolizable energy (diet with 50% concentrate) confers resistance to *H. contortus* infections because it reduces the OPG count and the amount of adult females recovered from the abomasum, As well as resilience, as it minimizes the onset of anemia and hypoproteinemia.

Key words: Sheep breeding, diet, worm control.

1. INTRODUÇÃO

Nos sistemas de criações de ovinos, as helmintoses são o principal entrave para uma boa produtividade, pois reduzem em muito o desempenho produtivo dos animais. O controle destas parasitoses em pequenos ruminantes é uma prática complexa pois muitos dos fármacos utilizados no controle têm apresentado redução na eficácia, o que torna insustentável a profilaxia baseada exclusivamente na utilização de anti-helmínticos (AMARANTE, 2013). No estado de São Paulo foi constatado que na maioria das propriedades produtoras de ovinos havia resistência múltipla aos vermífugos avaliados (VERÍSSIMO et al., 2012). Isto vem exigindo novas estratégias de controle das infecções por nematódeos gastrointestinais, visando minimizar o uso de fármacos e reduzir a pressão de seleção para resistência (TAYLOR, 2013).

Os nematódeos que mais causam prejuízos na ovinocultura brasileira são *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, pois são de elevada prevalência, usualmente presentes em grandes quantidades, causando anemia e má absorção de nutrientes, respectivamente, como consequência a eficiência produtiva dos animais é diminuída e muitas vezes cursa com óbito (AMARANTE et al., 2004; ROCHA et al., 2008; MACIEL et al., 2014). Normalmente os ovinos são parasitados por mais de uma espécie de helminto e os efeitos patogênicos da infecção são cumulativos (ALMEIDA et al., 2010; AMARANTE, 2013).

Em questão de produtividade, pode haver redução de até 30% no ganho em peso pela presença dos parasitas, pois estes causam danos à mucosa, com prejuízo à absorção de nutrientes, espoliação sanguínea e desvio de nutrientes para reparação dos tecidos lesados, aquisição e manutenção de resposta imune contra esses parasitas (GREER et al., 2008; CARDIA et al., 2011).

Manejos nutricionais que visem atender as demandas fisiológicas para crescimento e manutenção podem atuar de forma alternativa no controle das parasitoses gastrointestinais (KHAN; SAHOO; KARIM, 2017). Estudos demonstram que a suplementação com alimentos concentrados favorecem a resistência e/ou resiliência em infecções por nematódeos gastrointestinais, reduzindo o efeito patogênico dos parasitas e/ou levam a eliminação deste, ao maximizar a resposta imune (BRICARELLO et al., 2005; CARVALHO et al., 2015). Apesar dos avanços nos conhecimentos sobre o impacto da nutrição no controle das parasitoses em ruminantes, essa medida ainda é pouco explorada, pois

informações sobre as quantidades efetivas de suplementação para auxílio no controle de helmintos ainda são controversas (MOLLE et al., 2008).

Práticas de manejo que visem sistemas de produção ecologicamente sustentáveis para a produção de alimentos com baixa quantidade de resíduos químicos passaram a ser exigências primordiais do mercado consumidor (FITZPATRICK, 2013).

A suplementação com concentrado é uma alternativa prática e com resultados bastante expressivos sobre a parasitose e produtividade animal ao permitir formação de resposta imune contra os parasitas e pode indiretamente reduzir a necessidade de medicamentos alopáticos para controle das parasitoses (LOUVANDINI et al., 2006; KHAN; SAHOO; KARIM, 2017), e pode ser adotada facilmente pelos pecuaristas. No entanto, os custos com alimentação em uma propriedade rural são os que mais oneram o sistema de produção, devido a isso é necessário identificar os níveis adequados da suplementação para o controle da haemonchose e trichostrongylose a fim de reduzir as perdas produtivas ocasionadas pelo parasitismo, além de reduzir a utilização de produtos químicos e aumentar a margem de lucro do produtor.

Tendo em vista a importância da nutrição no controle dos parasitas gastrointestinais em pequenos ruminantes, este estudo teve por objetivo avaliar a influência da suplementação alimentar sobre a imunidade dos cordeiros, biologia e patogenia de *H. contortus* e *T. colubriformis*.

2. Revisão de literatura

As helmintíases causam elevados prejuízos a produção de ovinos. As perdas ocorrem em função da redução do ganho em peso em animais em crescimento, mortalidade e custos com medicamentos. O principal nematódeo é *H. contortus*, parasita hematófago responsável por elevada mortalidade. Usualmente ocorre em infecção simultânea por *T. colubriformis*, que vive em tuneis na mucosa do intestino delgado e se alimenta de tecidos, como consequência deste helminto, há redução na absorção de nutrientes e redução na produtividade (ROCHA et al., 2005; Sahoo et al., 2012).

A intensa utilização de anti-helmínticos como único método terapêutico e profilático em rebanhos de ovinos tem levado ao aparecimento de resistência múltipla em algumas espécies de nematódeos gastrointestinais mais prevalentes

na produção de ovinos (ALMEIDA et al., 2010). Em estudo realizado em 30 criatórios de ovinos do estado de São Paulo, detectou-se resistência ao albendazol e ivermectina em 100% das propriedades, a moxidectina em 96,6%, ao closantel em 92,2% e ao levamisol em 53,3%. Nesse estudo, mais da metade das propriedades analisadas apresentaram resistência a todos os produtos testados (VERÍSSIMO et al., 2012).

Desta forma, a melhora na nutrição dos animais surge como uma alternativa importante na profilaxia de nematódeos gastrointestinais, diminuindo a utilização de anti-helmínticos, além de influenciar positivamente no desempenho produtivo dos animais (NEVES et al., 2014).

2.1. Nematódeos gastrointestinais em ovinos

A presença de parasitas gastrointestinais no rebanho de ovinos causa grandes perdas econômicas para o produtor devido a redução da produtividade e mortalidade dos animais, além de grandes gastos com anti-helmínticos e mão de obra, sendo um dos maiores entraves na ovinocultura (GETACHEW; DORCHIES; JACQUIET, 2007).

H. contortus pode chegar a 3 cm de comprimento, portanto, é um grande parasita da superfamília Trichostrongyloidea. Os parasitas adultos vivem na luz abomaso, são hematófagos, podendo consumir 0,05 mL de sangue por dia (ALMEIDA, 1935).

A afecção pode ser aguda ou crônica. Na forma aguda os animais apresentam mucosas extremamente pálidas, sendo comum que venham a óbito sem apresentar sinal prévio da doença, esta forma ocorre quando grandes quantidades de L₃ são ingeridas em curto espaço de tempo. Nos casos crônicos os animais apresentam-se letárgicos, com fraqueza muscular, palidez das mucosas e com edema sob a mandíbula e região ventral do abdômen. Durante a necropsia é possível observar edema, gelatinização dos depósitos de gordura, grande quantidade de helmintos no interior do abomaso, parede do abomaso hiperêmica, com ulcerações e coágulos sanguíneos (RADOSTITS et al., 2010).

É um parasita altamente prolífico, cada fêmea elimina em torno de 7000 ovos por dia, o que representa alto potencial de infecção e reinfecção em animais criados a pasto (ROWE et al., 1988; COYNE; SMITH; JOHNSTONE, 1991). Além

disso, é a espécie que mais apresenta resistência aos anti-helmínticos (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004; ALMEIDA et al., 2010).

T. colubriformis é um parasita pequeno, em torno de 1 cm, que vive em tuneis nas vilosidades do intestino delgado, pode causar várias alterações intestinais como enterite grave, atrofia das vilosidades, erosão do epitélio, infiltração de leucócitos, exsudação de proteínas séricas para o lúmen intestinal, com consequente redução na eficiência de absorção de nutrientes (VAN HOUTERT; SYKES, 1996). Os animais parasitados por esta espécie podem apresentar fezes diarreicas, apatia, fraqueza e desconforto. O impacto negativo da infecção pelo *T. colubriformis* sobre o desempenho produtivo dos animais é alto e pode comprometer a rentabilidade e viabilidade econômica da criação de ovinos em fazendas brasileiras, onde a profilaxia dessa espécie é negligenciada (CARDIA et al., 2011).

Esses helmintos possuem um ciclo de vida direto. No trato gastrointestinal os parasitas adultos produzem ovos que são excretados através das fezes sobre a pastagem (contaminação), havendo temperatura e umidade adequadas, desses ovos eclodem larva de primeiro estágio (L₁), que no ambiente se desenvolvem até larvas de terceiro estágio (L₃). A L₃ é a forma infectante, que por movimentos serpentinosos saem do bolo fecal e findam por alcançar as folhas das forragens. A forragem contaminada é ingerida e a L₃ penetra na mucosa do órgão onde vivem e de lá emerge como parasita adulto (HOUDIJK et al., 2012; AMARANTE, 2014).

2.2. Resposta imune ao parasitismo

A imunidade do hospedeiro pode causar uma variedade de alterações nos nematódeos gastrointestinais, podendo ser comportamental, funcional, morfológica e bioquímica. As manifestações mais benéficas para o animal são a expulsão dos helmintos adultos e o impedimento do estabelecimento de novas larvas (ROTHWELL, 1989).

Os nematódeos de importância na criação de ovinos são da ordem strongilida, e grande parte pertencem à superfamília Trichostrongyloidea. Apesar da proximidade filogenética e muitas semelhanças morfológicas entre espécies, há diferenças distintas nos ciclos de vida dos parasitas que afetam a imunidade ou a imunopatologia induzida por cada espécie. Porém, uma

característica comum é que em todas as espécies dessa família a larva infectante (L₃) precisa invadir o tecido do hospedeiro para continuar seu desenvolvimento, portanto, a magnitude de uma resposta tecidual local pode determinar a sobrevivência do nematódeo em seu hospedeiro. No entanto, ao mesmo tempo que o sistema imune evoluiu em busca de debelar a presença dos hospedes indesejáveis, os parasitas desenvolveram estratégias de sobrevivência, e as larvas podem formar barreiras temporárias para evadir-se da resposta imune (hipobiose). Estas larvas podem retomar seu desenvolvimento em momento oportuno ou mesmo serem eliminadas caso haja uma hiper-estimulação do sistema imune (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000).

Por serem parasitas de grande tamanho, os helmintos não podem ser fagocitados por macrófagos ou outros fagócitos do sistema imune. Para uma resposta efetiva, os mecanismos adaptativos desenvolvidos para combater helmintos envolvem principalmente a mobilização e ativação de linfócitos T e B, mastócitos e eosinófilos. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2002).

Embora haja resposta imune inata aos produtos derivados de helmintos por macrófagos e células NK, a visão atual é que a resposta contra o helminto seja predominante resposta imune adaptativa (JOHNSTON; MACDONALD; MCKAY, 2009). Assim, após o processamento e a apresentação do antígeno, há uma resposta estereotípica das células T, que é caracterizada pelo desenvolvimento de células T auxiliares CD4 + do tipo 2 (Th-2) que produzem interleucina (IL) -4, -5, -13 e outros. Esses sinais químicos mobilizam outras células como mastócitos, leucócitos globulares, eosinófilos, além de induzir a troca de isotipo dos linfócitos B, para produzir imunoglobulina de alta afinidade (Ig) G, E e A (AMARANTE; AMARANTE, 2003; GALLI; GRIMBALDESTON; TSAI, 2008; JOHNSTON; MACDONALD; MCKAY, 2009).

Células T CD4+ auxiliares são ativadas por células apresentadoras de antígeno, que se diferenciam em células T_H2, e passam a produzir IL4 e IL13. Estas interleucinas possuem importante papel, pois estimula a diferenciação de linfócitos B e ativação dos eosinófilos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2002).

Os mastócitos são produzidos na medula óssea e encontram-se espalhados por diferentes tecidos. São células que quando ativas, produzem histamina, prostaglandinas, proteases, IL-4, IL-5 e IL-13 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2002). Possuem receptores com alta afinidade a IgE, e necessitam

dessas Ig para sua ativação. Mastócitos se ligam a superfície do parasita (antígeno) e são ativados. Mastócitos ativados secretam diversos mediadores químicos como IL-4 e IL13, que além de *feedback* positivo para produção de mais IgE, estimula a secreção de muco na superfície da mucosa; os mastócitos liberam também histamina, levando a aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa do trato gastrointestinal. Esses mecanismos são importantes na expulsão do invasor. Além disso, os mastócitos produzem fatores quimiotáticos de eosinófilos e neutrófilos e IL-5, com importante papel na ativação dos eosinófilos (MEEUSEN, 1999; BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000; MILLER; HOROHOV, 2006).

Estudos indicam que o mastócito no epitélio intestinal, submetidos a desafio antigênico prolongado, passa por algumas alterações morfológicas e fusão parcial de seus grânulos. Esta célula surgida a partir do mastócito ativado é conhecida como leucócito globular (LG) (HUNTLEY; NEWLANDS; MILLER, 1984). Linhagens de ovinos selecionadas para resistência à nematódeos gastrointestinais apresentam elevado número de LG, no entanto, ainda há dúvidas entre as funções desempenhadas por mastócitos e LG na superfície mucosa (MILLER; HOROHOV, 2006).

Quando ocorre desafio contínuo, em caso de reinfecções sucessiva com larvas de nematódeos, os LG são apontados como os efetores da “exclusão imune” ou “rejeição rápida” através de um processo dependente de IgE semelhante aos de ativação do mastócito, que levam a exclusão por aumento no peristaltismo, impedindo que as larvas se estabeleçam. Uma vantagem adicional da expulsão rápida mediada por leucócitos globulares, é que nenhuma resposta inflamatória é gerada nos tecidos de animais infectados (MEEUSEN; BALIC; BOWLES, 2005). Esse processo de hipersensibilidade já foi descrito em infecções por *H. contortus* e *T. colubriformis*, após período prolongado de reinfecção parasitária, quando ocorreu uma nova infecção houve rápida rejeição das L₃ (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000).

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea e são liberados na corrente sanguínea, de onde podem migrar rapidamente para desempenhar seu papel quando ocorre uma infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2002). No local da infecção, essas células são atraídas pelas quimiocinas liberadas na degranulação de mastócitos e ativadas por citocinas das células Th2,

principalmente IL-5 (TIZARD, 2014). Após sua ativação, próximo ao local de infecção, usualmente em volta de larvas invasoras, os eosinófilos degranulam e liberam uma variedade de mediadores solúveis, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e lipídios bioativos (ROTHENBERG; HOGAN, 2006; TEREFE et al., 2009). Os eosinófilos têm um papel crucial na destruição dos helmintos, pois diferente dos outros leucócitos, sua proteína sérica principal é mais tóxica para os helmintos que as enzimas e espécies reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2002).

2.3. Nutrição e imunidade

Animais naturalmente resistentes a infecções por nematódeos gastrointestinais trazem em seu DNA, genes que permitem a formação de boa resposta imune. No entanto, a quantidade e a qualidade nutricional é fator crucial para que ocorra expressão adequada desses genes (SADDIQI et al., 2011).

Como todos os sistemas biológicos de um animal, o sistema imune demanda de nutrientes para a multiplicação e diferenciação de suas células, bem como, para síntese e excreção de moléculas efetoras. Por possuir elevada especificidade aos invasores, o sistema imune passa por constantes desafios ao longo da vida do animal. A quantidade de nutrientes que será desviada para a formação de resposta imune irá depender da prioridade biológica do organismo no momento do desafio, pois os nutrientes podem estar sendo desviados para manutenção, ganho em peso, aquisição da imunidade, reprodução, expressão da imunidade e reserva corporal (COOP; KYRIAZAKIS, 1999; BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2000). Portanto, a expressão de resposta imunológica em alguns momentos é priorizada e, em outros, penalizada devido o particionamento de nutriente.

De maneira geral, após os custos nutricionais de manutenção do organismo terem sido atendidos, os nutrientes remanescentes podem ser alocados para funções corporais associadas ao crescimento, reprodução e imunidade aos parasitas. Espera-se que o animal em crescimento que encontra os parasitas pela primeira vez, priorize a escassa alocação de recursos para a aquisição da imunidade em detrimento ao crescimento, pois este pode sucumbir às consequências adversas do parasitismo antes de atingir a maturidade reprodutiva. No entanto, uma vez que a imunidade foi adquirida, o crescimento

e a reprodução seriam priorizados sobre a expressão da imunidade aos parasitas, uma vez que estas funções corporais garantem a preservação do material genético do hospedeiro (KYRIAZAKIS; HOUDIJK, 2006).

O déficit energético na alimentação de ruminantes não afeta fortemente a formação da resposta imune, no entanto, a déficit proteico pode trazer grandes prejuízos no desenvolvimento de resposta imunológica. Nesses casos, a suplementação com dietas ricas em proteína pode resultar na expressão da imunidade, levando a menor estabelecimento, diminuição da fecundidade de parasitas e/ou redução da carga parasitária (HOUDIJK et al., 2012).

Animais criados somente a pasto, de modo geral, apresentam déficit nutricional. Esse déficit pode ser agravado pela sazonalidade das gramíneas nas diferentes épocas do ano, pois no período seco há redução na quantidade e a qualidade do alimento disponível (ALENCAR et al., 2010). Mesmo que um animal tenha alto potencial genético para produtividade e imunidade, estas características podem não ser expressas plenamente em função da deficiência nutricional, favorecendo a ocorrência de infecções pesadas e aumento na dificuldade no controle das parasitoses (MHOMGA et al., 2012). Por ocasião da infecção, também ocorre perda de vários nutrientes, o que leva a um ciclo vicioso de subnutrição e comprometimento da função imune.

Vários estudos já mostraram que a infecção por nematódeos gastrointestinais tem um impacto negativo na produtividade dos ruminantes (GETACHEW; DORCHIES; JACQUIET, 2007; GREER et al., 2008). No entanto, o fornecimento de dietas em quantidade e qualidade nutricional adequadas influenciam positivamente na produtividade e na formação de resposta imune aos parasitas (LOUVANDINI et al., 2006; CARDIA et al., 2011; CARVALHO et al., 2015).

Louvandini *et al.* (2006) demonstraram que ao suplementar animais a pasto com 500 gramas de concentrado por dia, contendo 19% de proteína bruta (PB), é possível minimizar os efeitos patogênicos das infecções, com maior resiliência aos parasitas, e menor necessidade de tratamento com anti-helmínticos. Os benefícios da adição de concentrado na dieta são mais evidentes no período seco, época em que a qualidade nutricional da forragem diminui.

Em um estudo com cordeiros infectados uma única vez com 4000 L₃ de *H. contortus*, verificou-se que o fornecimento de alimento concentrado, com 17%

de PB fornecido em quantidade relativa a 3% do peso vivo, propiciou maior produção de IgG sérica anti-L₃ de *H. contortus*, bem como, maior número de mastócitos e eosinófilos na mucosa do abomaso em comparação com animais alimentados apenas com feno. Os animais suplementados apresentaram maior ganho em peso, parasitas de menor tamanho e menores contagens de OPG, de forma que animais que não receberam suplementação expressaram baixa resposta imunológica e não foram capazes de manter os padrões hematológicos dentro da normalidade, sofrendo ainda mais os efeitos adversos da parasitose (CARVALHO et al., 2015).

Da mesma forma, em um experimento em que cordeiros foram suplementados com concentrado contendo 10, 13, 16, 19 ou 22 % PB, ocorreram reduções nos pesos de cordeiros infectados com 750 L₃ de *H. contortus* três vezes por semana e que receberam alimentação com concentrado de até 16 % PB, já os cordeiros que receberam concentrado contendo 19 ou 22 % PB ganharam peso, tiveram menores contagens de OPG, maiores valores de volume globular e maior produção de anticorpos que os cordeiros dos demais grupos, demonstrando que a estratégia de fornecer suplementação é benéfica nesse tipo de infecção (DATTA et al., 1998).

Ovelhas suplementadas com 100 g de farinha de peixe por dia, e que foram infectadas com 1000 L₃ de *T. colubriformis* três vezes por semana tiveram redução na carga parasitária de 44 e 99% nos dias 105 e 140 após o início das infecções, respectivamente. Porém, nem a contagem de ovos por grama de fezes, nem a carga parasitária tiveram qualquer influência em animais eutanasiados com 35 e 70 dias após o início das infecções. Essa suplementação resultou em maior concentração de eosinófilos circulantes, mastócitos na mucosa e anticorpos circulantes, especialmente nos dias 105 e 140, fase de expressão da imunidade, mas o mesmo não ocorreu nos dias 35 e 70, fase de aquisição da imunidade (VAN HOUTERT et al., 1995).

Portanto, ovinos que recebem alimento de boa qualidade nutricional, são mais resistentes aos nematódeos gastrintestinais (WALLACE et al., 1996; COOP; KYRIAZAKIS, 2001), considerando uma produção de ovinos a pasto, especialmente nos de baixa qualidade nutricional, a suplementação tem o potencial de reduzir a contaminação de pastagens através da expressão da imunidade e redução na eliminação de ovos (HOUDIJK et al., 2012).

A adição do concentrado na alimentação dos ovinos é uma pratica que deve ser considerada pelos produtores por aumentar o ganho em peso dos animais, melhorar a conversão alimentar, elevar os parâmetros hematológicos como volume globular e proteína plasmática e favorecer expressão de resposta imune à nematódeos gastrointestinais (BRICARELLO et al., 2005; CARDIA et al., 2011; MHOMGA et al., 2012), tornando-os resistentes e/ou resilientes as infecções por *H. contortus* (BRICARELLO et al., 2005; CARVALHO et al., 2015) e *T. colubriformis* (MHOMGA et al., 2012).

3. Suplementação alimentar em cordeiros: influência sobre a imunidade do hospedeiro, biologia e patogenicidade de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*

Nas páginas a seguir encontra-se o manuscrito a ser encaminhado a revista Veterinary Parasitology, no formato Original research papers (Regular Papers). Após as considerações da banca o artigo será corrigido e finalizado, quando então será traduzido para inglês e encaminhado a revista.

Resumo das normas da revista

1 . Os manuscritos devem ser escritos em Inglês.

2 Manuscritos devem ser organizados na seguinte ordem: título, nome dos autores, endereço postal completo de filiações, telefone, e-mail, endereço, resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, referências, tabelas, figuras.

3 . Títulos e subtítulos não devem ser digitados dentro do texto, devem ser digitados em uma linha separada, sem recuo. Em letras minúsculas.

4. Usar unidades do Sistema Internacional.

Link para acesso as normas da revista.

<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology/0304-4017/guide-for-authors>

Suplementação alimentar em cordeiros: influência sobre a imunidade do hospedeiro, biologia e patogenia de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* Nadino Carvalho^{1*}, José Henrique da Neves¹, Caio Santos Pennacchi¹, Andre Michel de Castilhos¹, Alessandro Francisco Talamini do Amarante^{2*}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, Brazil.

² Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Caixa Postal 510, CEP: 18618-000, Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author: Alessandro F. T. Amarante. Tel.: +55 14 3880 0523; E-mail address: amarante@ibb.unesp.br.

Resumo

Infecções por nematódeos gastrointestinais provocam elevados prejuízos na ovinocultura, as principais espécies que acometem ovinos são *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, que causam anemia e má absorção de nutrientes, respectivamente. O controle com a utilização de anti-helmíntico tem apresentado baixa eficiência por surgimento de cepas resistentes aos fármacos disponíveis para tratamento, sendo assim, medidas alternativas se fazem necessárias. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da suplementação alimentar sobre a imunidade dos cordeiros, biologia e patogenia de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. Quarenta e quatro cordeiros machos da raça Dorper com aproximadamente quatro meses e $31,5 \pm 3,24$ kg de peso corporal foram alocados aleatoriamente em quatro dietas à base de feno triturado, *Cynodon dactylon* (cv. Tyfton), acrescido de 0%, 25%, 50% ou 75% de concentrado. Em cada dieta sete animais foram infectados com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias ao longo de 12 semanas. Em cada dieta, quatro animais permaneceram como grupo controle, Não-Infectados. Os grupos experimentais foram: 0%-Infectado, 0%-Não-Infectado, 25%-Infectado, 25%-Não-Infectado, 50%-Infectado, 50%-Não-Infectado, 75%-Infectado e 75%-Não-Infectado. Quanto maior a suplementação, menor a contagem de OPG de *H. contortus* ($P < 0,0001$), porém sem influência sobre contagem de OPG de *T. colubriformis*. O número de fêmeas de *H. contortus* foi maior no grupo 0% infectado que nas demais dietas ($P = 0,0052$). Em nenhuma fase parasitária de *T. colubriformis* houve efeito da Dieta ($P > 0,05$). Animais da dieta 0%-Infectado tiveram menor volume globular (VG) que seu grupo controle 0%-Não-Infectado a partir do dia 49 do início das infecções

($P < 0,05$), na dieta 25% essa diferença entre animais infectado e não infectado só ocorreu na última aferição de VG, dia 84 após o início das infecções, nas demais dietas não houve diferença significativa. Não houve efeito da dieta sobre os parâmetros imunológicos avaliados ($P > 0,05$). Dieta com 10,18% de proteína metabolizável e 2418 Kcal/kg de energia metabolizável (dieta com 50% de concentrado) confere resistência a infecções por *H. contortus* pois reduz a contagem de OPG e a quantidade de fêmeas adultas recuperada do abomaso e resiliência, pois minimiza o aparecimento de anemia e hipoproteïnemia.

Palavras chaves: Helmintose, dieta, ovinos, imunidade.

1. INTRODUÇÃO

Infecções por nematódeos gastrointestinais em ovinos são recorrentes e causam elevados prejuízos em função da redução no desempenho, mortalidade dos animais, e aumento dos custos com medicamentos. No Brasil, *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* são os principais nematódeos gastrointestinais que acometem ovinos e apresentam elevada prevalência e patogenicidade (AMARANTE, 2013; MACIEL et al., 2014).

Cordeiros criados em pasto com gramíneas tropicais, no geral, apresentam déficit nutricional, pois a qualidade das gramíneas é insuficiente para atender suas demandas. No período seco, o déficit é agravado pela sazonalidade das gramíneas, pois ocorre redução na quantidade e qualidade do alimento disponível (ALENCAR et al., 2010). Animais selecionados para resistência a nematódeos gastrointestinais, se não nutridos adequadamente, podem não expressar plenamente a resistência, favorecendo a ocorrência de infecções helmínticas graves (MHOMGA et al., 2012). Por ocasião da infecção, também ocorre perda de vários nutrientes, o que agrava a subnutrição, com comprometimento da função imune.

Dada à importância dos nematódeos gastrointestinais, muitas medidas de controle vêm sendo estudadas e almejam um modelo de produção econômico e ambientalmente sustentável. A suplementação alimentar apresenta grandes vantagens como medida de controle, pois fornece nutrientes que permitem a reparação dos tecidos lesados pelos helmintos, conferindo-lhes resiliência, e favorece a formação de resposta imune mais adequada, o que pode levar a menor produção de ovos, redução no

desenvolvimento do parasita e até mesmo completa eliminação destes (BOUKHARI et al., 2016; SAHOO e KHAN, 2016).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar em cordeiros a influência da suplementação alimentar sobre a imunidade do hospedeiro, biologia e patogenia de *H. contortus* e *T. colubriformis*.

71

72 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu; protocolo nº78/2014-CEUA.

76 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Os 44 cordeiros, recém desmamados, foram adquiridos de uma fazenda comercial onde foram criados confinados desde o nascimento. Na chegada, os animais não apresentavam ovos por grama de fezes (OPG) de strongilídeos (Ueno e Gonçalves, 1998) e dois animais tiveram 50 OPG de *Strongyloides papillosus*. Pela técnica qualitativa de flutuação de Willis (Ueno e Gonçalves, 1998), 11 animais estavam infectados por strongilídeos e 42 por *S. papillosus* e todos apresentavam oocistos de *Eimeria* spp.. Na cultura de fezes, foi constatada infecção por *Haemonchus* (82%) e *Trichostrongylus* (18%).

Os animais foram everminados por via oral com monepantel (2,5 mg/kg, Zolvix®, Novartis), em dose única, mais albendazol (10 mg/kg, Valbazen®, Pfizer) e levamisole (10 mg/kg, Ripercol®, Dodge Fort) por 4 dias consecutivos. Receberam em dose única o coccidicida toltrazuril, (20 mg/kg, Baycox®, Pfizer). Todos os animais foram vacinados contra clostridioses (Sintoxan® Polivalente, Merial) conforme as recomendações do fabricante.

Foram utilizados 44 cordeiros machos da raça Dorper com quatro meses de idade e $31,5 \pm 3,24$ kg de peso corporal. O delineamento experimental foi fatorial 4X2 (Fig. 1), quatro dietas com proporções volumoso:concentrado de 100:0 = 0%, 75:25 = 25%, 50:50 = 50% e 25:75 = 75% e dois estados parasitários, sendo eles, infectado ou não infectado. Os oito grupos experimentais, foram: 0%-Infectado, 0%-Não-Infectado, 25%-Infectado, 25%-Não-Infectado, 50%-Infectado, 50%-Não-Infectado, 75%-Infectado e 75%-Não-Infectado. Os animais foram mantidos em baias individuais, providas de comedouro e

bebedouro, e as instalações passaram por limpeza diária, a fim de evitar infecções indesejadas.

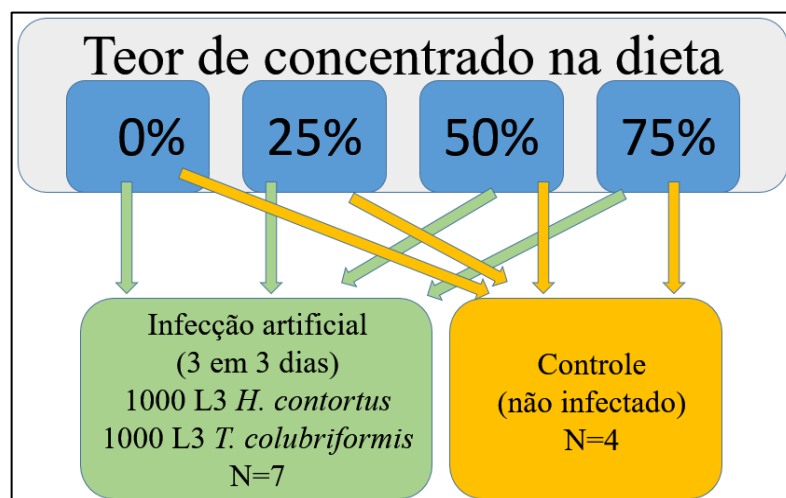


Figura 1: Delineamento experimental: cordeiros foram alimentados com dieta total, feno mais concentrado, nas proporções de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado. Em cada dieta os animais foram infectados artificialmente com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias (Infectado) ou permaneceram livres de infecção durante todo o estudo (Não-Infectado). Os animais foram eutanasiados aos 84 dias após o início das infecções.

DIETAS

As dietas foram formuladas, segundo o NRC (2007), de forma a atender as exigências de cordeiros em crescimento (maturidade de 0,3) e ganhos diários estimados de 67, 130, 213 ou 302 g/dia para as dietas 0%, 25%, 50% e 75%, respectivamente. O programa computacional Small Ruminant Nutrition System (SRNS), com base na estrutura do Cornell Net Carbohydrate and Protein System (2000), foi utilizado para a elaboração das dietas. Na tabela 1 estão descritos os ingredientes da dieta e a composição nutricional que se baseia em simulação ruminal. Foi utilizado feno triturado, oriundo de propriedade rural onde não havia criação de ruminantes, para evitar infecção indesejável por nematódeos gastrointestinais.

Tabela 1 - Formulação e composição nutricional das dietas.

Ingrediente (% MS)	Inclusão de concentrado na dieta (MS)			
	0%	25%	50%	75%
Feno <i>Cynodon dactylon</i>	97,76	73,49	49,10	24,60
Milho moído	0,00	20,84	41,78	62,78
Farelo de soja	0,00	3,09	6,19	9,30
Calcário calcítico	0,00	0,38	0,76	1,15
Ureia	0,00	0,19	0,37	0,56
Mineral ¹	1,57	1,41	1,25	1,13
Cloreto de amônio	0,67	0,61	0,53	0,48

Composição nutricional

Matéria seca (%)	88,32	88,39	88,34	88,31
Proteína bruta (%)	8,50	10,40	12,30	14,20
Proteína degradável no rúmen (% PB)	58,10	59,90	61,10	63,20
Proteína metabolizável (%)	7,41	8,79	10,18	11,53
Energia metabolizável (Kcal/kg) ²	1861	2133	2418	2726
FDN efetivo (%)	74,04	57,07	40,36	23,46
Extrato etéreo	1,50	2,10	2,70	3,40
Cálcio (%) ²	0,67	0,70	0,71	0,73
Fósforo (%) ²	0,30	0,31	0,35	0,40

1: Composição do Mineral (kg do produto) 200g Ca, 75g P, 50g Mg, 10mg S, 24mg Se, 3.060mg Zn, 1.000mg Mn, 2.500mg I, 20mg Co; Monensina sódica. 2 Valores calculados pelo programa CNCPS – Ovinos.

O fornecimento de alimento foi realizado duas vezes ao dia, às 8 h e às 16 h, com acesso *ad libitum* às dietas e à água. O consumo voluntário de cada animal foi aferido diariamente através da diferença entre o peso da dieta ofertada e peso das sobras recolhidas na manhã seguinte. A quantidade de alimento oferecido foi ajustada diariamente durante o experimento, permitindo sobras de até 20% do total ofertado para a dieta 0% e sobras entre 5 e 10% para as demais dietas.

PRODUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES

Quatro cordeiros jovens, machos, livres de infecção por nematódeos gastrointestinais, foram infectados com isolados de larvas de terceiro estágio (L₃) mantidas em nitrogênio líquido, descritos por Almeida et al. (2010). Dois desses animais foram infectados com *H. contortus* e dois com *T. colubriformis* e a partir do início do período patente da infecção, serviram como animais doadores de ovos nas fezes, para a produção de larvas infectantes. As fezes foram coletadas através de bolsas, acopladas a região pélvica dos animais, que permitia a defecação diretamente dentro da bolsa. As fezes foram recolhidas duas vezes ao dia e após a colheita, estas foram acondicionadas em estufa a 27°C para garantir o desenvolvimento dos ovos até o estágio de larva infectante em coprocultura (UENO e GONÇALVES, 1998).

PERÍODO EXPERIMENTAL

INFECÇÃO ARTIFICIAL

Cada animal do grupo infectado recebeu a cada três dias 1.000 L₃ de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis*, totalizando 28.000 larvas infectantes de cada espécie ao longo das 12 semanas de estudo.

142 EXAMES PARASITOLÓGICOS

143 Amostras de fezes (aproximadamente sete gramas) foram coletadas
144 semanalmente após o início das infecções. A coleta foi realizada diretamente da ampola
145 retal dos cordeiros, acondicionadas em sacos de polietileno e resfriadas a 4 °C até o
146 processamento. A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada segundo a
147 técnica de Gordon e Whitlock (1939), descrita em Ueno e Gonçalves (1998) (1 ovo = 100
148 OPG). A cada coleta, foram realizadas coproculturas (*pool* por grupo), que foram
149 mantidas em estufa a 27 °C durante 7 dias. Após esse período, os percentuais de L₃ de
150 cada espécie em cada coprocultura foi determinado por meio da identificação de 100 L₃
151 (UENO e GONÇALVES, 1998). Com base na contagem de OPG e nos percentuais de L₃
152 de cada espécie nas diferentes coletas, estimou-se a contagem de OPG por espécie para
153 cada grupo experimental.

154 CONTAGEM DE PARASITAS

155 Os animais foram eutanasiados 84 dias após o início do experimento para
156 colheita e contagem dos helmintos. O abomaso e intestino delgado foram vedados através
157 de amarração com fios de nylon, o que impediu o extravasamento de conteúdo para outros
158 compartimentos, e então, removidos. Esses órgãos foram abertos e seu conteúdo
159 despejado em um balde, foi realizada a lavagem do órgão em água corrente, de maneira
160 a permitir que todo o conteúdo caísse no balde. Os conteúdos gastrointestinais foram
161 lavados sequencialmente em peneiras de 250 µm, 106 µm e 53 µm que permitiu a
162 passagem de parte do conteúdo indesejável sem perda de helmintos (UENO e
163 GONÇALVES, 1998). A carga parasitária de helmintos adultos foi estimada através da
164 contagem de 10% do conteúdo em cada compartimento gastrointestinal e as formas
165 imaturas, que ficaram retidas na peneira de 53 µm, foram quantificadas em 1% do
166 conteúdo gastrointestinal.

167 EXAMES LABORATORIAIS

168 Amostras de sangue foram coletadas semanalmente por venopunção da jugular
169 em tubos contendo Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) com a finalidade de
170 determinar o volume globular (VG) através do teste do micro-hematócrito e a
171 concentração total de proteína plasmática (PP) através do refratômetro. Os eosinófilos
172 sanguíneos foram quantificados através da diluição de 20 µL de sangue em 180 µL de
173 solução de Carpentier, 10 µL dessa diluição foi adicionada em cada lado da câmara de

Neubauer e quantificado em microscópio ótico de luz (DAWKINS et al., 1989). Amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 RPM por 15 minutos e o plasma aliquoteado e armazenado a -20 °C para realização de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Amostras de tecidos foram coletadas da região fúndica do abomaso e intestino delgado (recolhida a 10 cm do piloro) para a quantificação de mastócitos, eosinófilos e leucócitos globulares. Os tecidos foram fixados em formalina 4% durante 48 horas. Posteriormente foram desidratadas em álcool 70%, acondicionadas em cassetes para cortes histológicos e então embebidas em cera de parafina. Seções de 4 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina a 1% ou hematoxilina e eosina (SILVA et al., 2012). Os mastócitos e eosinófilos foram quantificados em microscópio óptico convencional e os leucócitos globulares em microscópio de fluorescência de luz ultravioleta, usando objetiva de 10x e ocular de 100x, com área de visualização de 0,0314 mm². As células foram quantificadas em 30 áreas de visualização aleatórias, e os resultados expressos em número de células/mm². Os mastócitos foram quantificados nos cortes corados em azul de toluidina e os eosinófilos e leucócitos globulares em cortes corados com hematoxilina e eosina.

Para realização do ELISA os antígenos foram extraídos das L₃ de *H. contortus* ou *T. colubriformis*, a partir de culturas dos animais doadores (ver produção de larvas infectantes), conforme metodologia descrita por Amarante et al. (2009).

O protocolo para mensurar os níveis plasmáticos de IgG anti-L₃ de *H. contortus* ou anti-L₃ de *T. colubriformis* foi realizado conforme descrito por Silva et al. (2012) com as seguintes modificações: cada poço das placas foi revestido com 0,25 µg de antígeno de L₃ de *H. contortus* ou de *T. colubriformis*; as placas foram lavadas três vezes, giradas 180° e lavadas por mais três vezes; o conjugado de coelho com peroxidase anti-IgG de ovinos foi diluído a 1: 40.000; como controle padrão negativo, foi usado soro de um animal descrito por Santos et al. (2014); por fim, no controle padrão positivo, foi usado soro de um animal deste estudo, pertencente ao grupo 0%-Infectado e coletado no dia 84 após o início das infecções, pois apresentou elevada densidade óptica (OD) na fase de padronização do ELISA. Os resultados foram expressos em percentual da OD do soro padrão positivo através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ OD} = [(\text{média da OD do soro testado} - \text{média da OD controle branco}) / (\text{média da OD do soro padrão positivo} - \text{media da OD controle branco})] \times 100$$
 (KANOBANA et al., 2001).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a teste de normalidade e, quando necessário, transformados ($\log_{10}(x+1)$), sendo esse o caso dos dados de OPG, helmintos imaturos e eosinófilos sanguíneos. Nas figuras são apresentadas as médias $\pm$ erro padrão de valores não transformados. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Análises com medidas repetidas foram utilizadas para determinar o efeito do tempo na contagem de OPG, VG, PP, eosinófilos sanguíneos e níveis de IgG.

3. RESULTADOS

Não houve óbito de animais ao longo do experimento. No entanto, um animal do grupo 75%-Infectado não se adaptou a dieta e apresentou sinais clínicos de acidose ruminal, por esse motivo foi excluído do experimento.

EXAME PARASITOLÓGICOS

No decorrer do estudo nenhum animal dos grupos Não-Infectado apresentou ovos nos exames de fezes. Na contagem de OPG de *H. contortus* houve interação Tempo*Dieta ($P < 0,0001$). Todos os grupos apresentaram OPG crescente de *H. contortus* até o dia 49 após início das infecções, seguido por tendência de redução nas coletas posteriores, com exceção dos animais do grupo 0%-Infectado, que manteve médias elevadas de OPG de *H. contortus* ao longo de todo o período de estudo. De maneira geral, quanto maior a quantidade de concentrado na dieta menor foi a contagem de OPG de *H. contortus* (Figura 2).

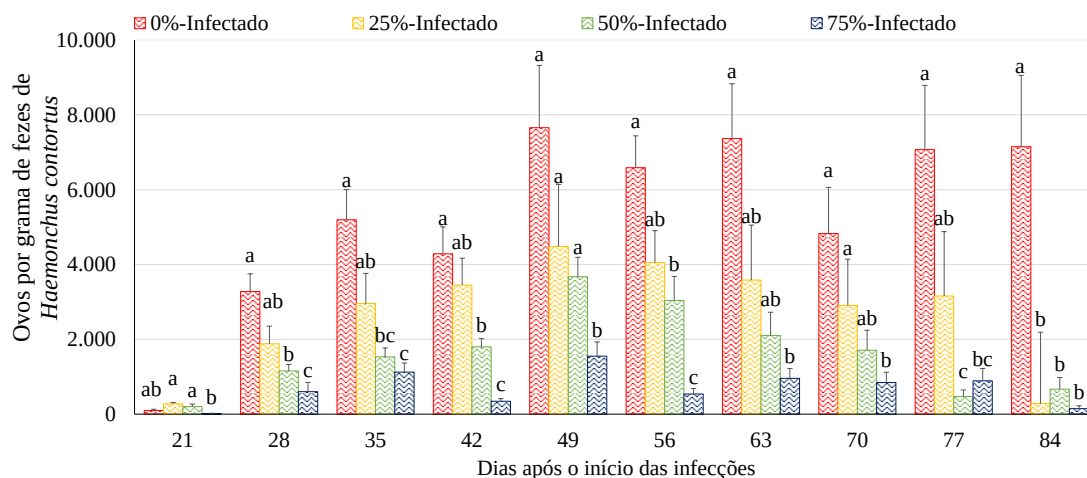


Figura 2: Ovos por grama de fezes de *Haemonchus contortus* de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado. Os animais foram infectados,

com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias. Foram realizadas coproculturas das fezes dos cordeiros (*pool* por dieta) e a contagens de OPG de cada indivíduo, multiplicado pelo percentual de larvas de *H. contortus* na coprocultura. Letras distintas indicam diferença significativa (P<0,05) em cada coleta. Barras = erro padrão.

As médias de contagem de OPG de *T. colubriformis* foram inferiores as de *H. contortus*, e houve interação Tempo*Dieta (P = 0,0001). De maneira geral em todas as dietas houve elevação na contagem de OPG de *T. colubriformis* do dia 21 ao 42 após o início das infecções, seguido por redução e posterior elevação em diferentes momentos para cada dieta (Figura 3).

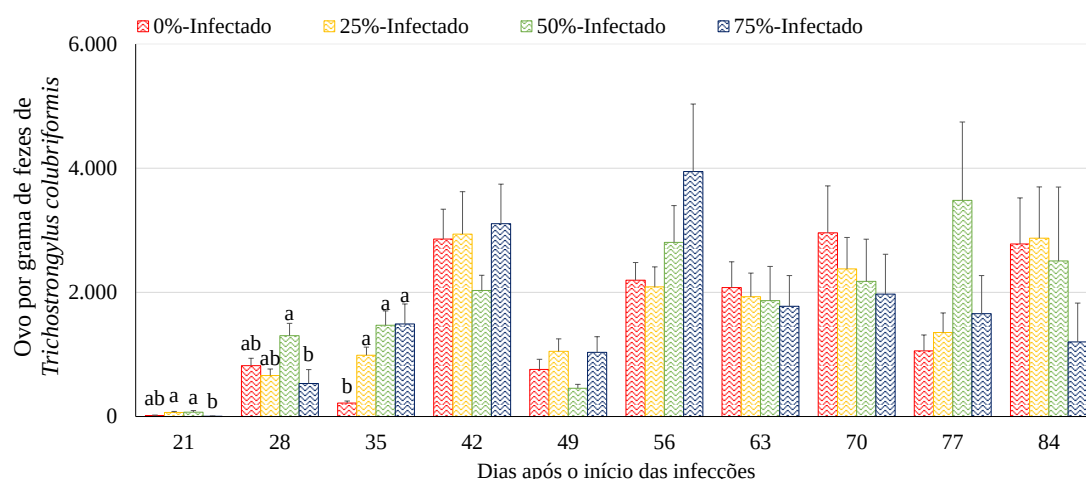


Figura 3: Ovos por grama de fezes de *Trichostrongylus colubriformis* de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado. Os animais foram infectados, com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias. Foram realizadas coproculturas das fezes dos cordeiros (*pool* por dieta) e a contagens de OPG de cada indivíduo, multiplicado pelo percentual de larvas de *T. colubriformis* na coprocultura. Letras distintas indicam diferença significativa (P<0,05) em cada coleta. Barras = erro padrão.

Não houve efeito da dieta sobre a contagem total *H. contortus* (P = 0,2735) e *T. colubriformis* (P = 0,5501) (Figura 5). No entanto, quando avaliou-se os estágios de desenvolvimento dos parasitas, observou-se que *T. colubriformis* apresentou maior quantidade de parasitas adultos, e, *H. contortus* foi mais prevalente na fase de larva de quarto estágio inicial (L_{4i}). Houve efeito da Dieta sobre o número de larvas de quarto estágio final macho (L_{4♂}) (P = 0,0205) e larvas de quinto estágio macho (L_{5♂}) (P = 0,0270) de *H. contortus*, que tiveram médias menores no grupo 75%-Infestado. As fêmeas adultas (♀) de *H. contortus* também apresentaram efeito da dieta (P = 0,0052), com média mais elevada no grupo 0%-Infestado que nos demais grupos (Figura 5A). A dieta não influenciou em nenhuma das fases parasitárias de *T. colubriformis* (Figura 5B).

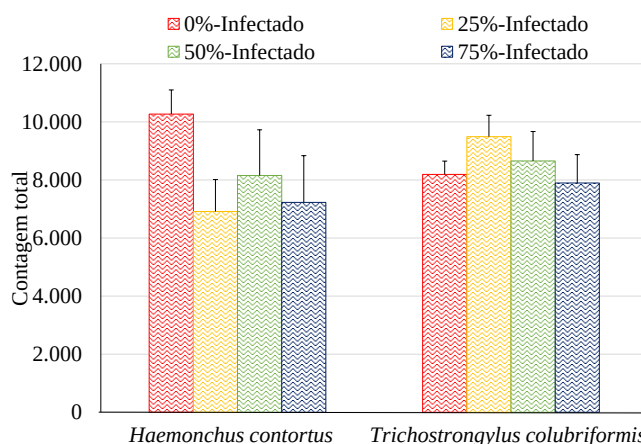


Figura 4: Médias de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* recuperados de cordeiros que foram alimentados com dietas de feno acrescido de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado; receberam 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias e foram eutanasiados aos 84 dias após o início das infecções. Não houve diferença significativa entre as médias ($P>0,05$). Barras = erro padrão.

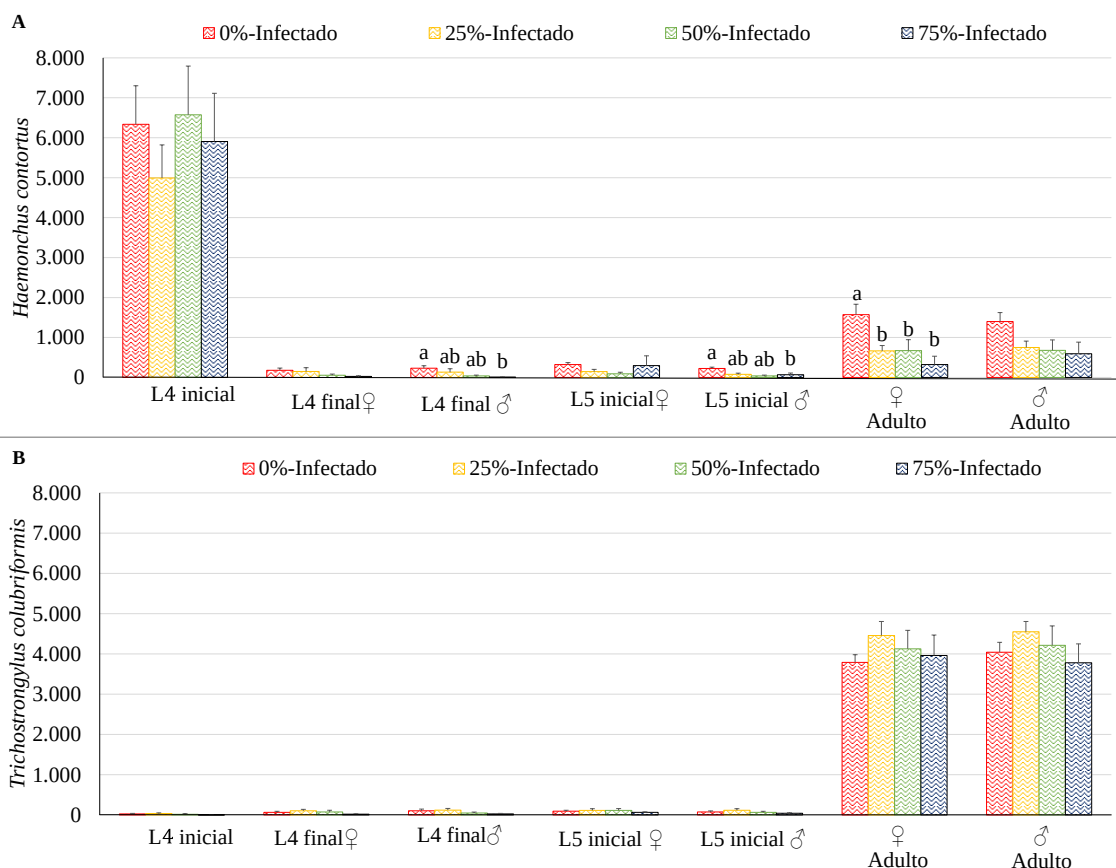


Figura 5: Média da contagem das fases parasitárias de *H. contortus* (5A) e *T. colubriformis* (5B) recuperados de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado. Os animais foram infectados com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias e eutanasiados aos 84 dias após o início das infecções. Letras distintas indicam diferença significativa ($P<0,05$) na fase parasitária. Barras = erro padrão.

EXAMES HEMATOLÓGICOS

Em relação ao VG, houve interação Tempo*Dieta*Infecção ($P < 0,0001$). As médias de VG apresentaram maior redução no grupo 0%-Infectado, com médias abaixo de 24% do dia 49 ao final do estudo (Figura 6A). Neste período, houve diferença ($P < 0,05$) entre os grupos 0%-Infectado e 0%-Não-Infectado. É importante destacar que, dois animais do grupo 0%-Infectado apresentaram VG de 11% na última coleta (dia 84). Nos animais que receberam dieta de 25% de concentrado, também houve redução no VG, porém menos acentuada, com diferença nas médias entre Infectados e Não-Infectados apenas na última coleta (Figura 6B). Não houve efeito da infecção ($P > 0,05$), sobre o VG dos animais que receberam dieta com 50 ou 75% de concentrado (Figura 6C e 4D).

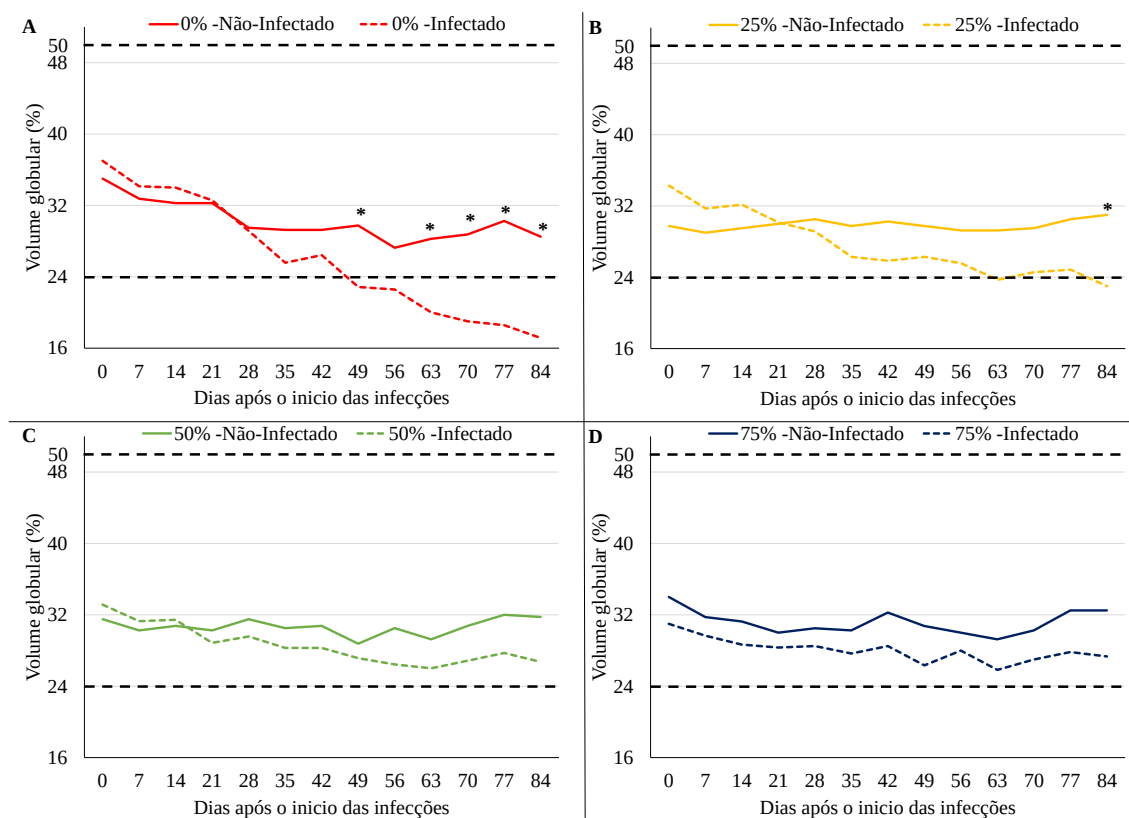


Figura 6: Média do volume globular (%) de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0 (A), 25 (B), 50 (C) ou 75% (D) de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L_3) de *H. contortus* e 1.000 L_3 de *T. colubriformis* a cada três dias. --- indicam os limites superiores e inferiores normais do VG de ovinos (Schalm et al., 1986). * indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais infectados e não infectados de mesma dieta.

Houve interação Tempo*Dieta*Infecção ($P = 0.0005$) na concentração de PP. As concentrações das PP estiveram mais alteradas no grupo 0%-Infectado, que apresentou diminuição acentuada, com médias inferiores aos valores de referência para a espécie (6 g/dL) do dia 42 ao final do experimento (Figura 7A). As médias do grupo 0%-Infectado

diferiram do grupo 0%-Não-Infectado do dia 49 ao final do estudo, com médias mais baixas no grupo 0%-Infectado. Nos animais de dieta 25% também ocorreu diminuição nas concentrações das PP, porém de maneira mais sutil, sem diferença significativa em nenhum momento entre os grupos 25%-Infectado e 25%-Não-Infectado (Fig. 7B). Nos demais grupos também houve redução nas concentrações das PP em função da infecção, as médias oscilaram, hora a baixo, hora a cima dos valores de referência para ovinos, porém sem diferir significativamente ($P > 0,05$) entre grupos infectados e controles (Fig. 7C e 7D).

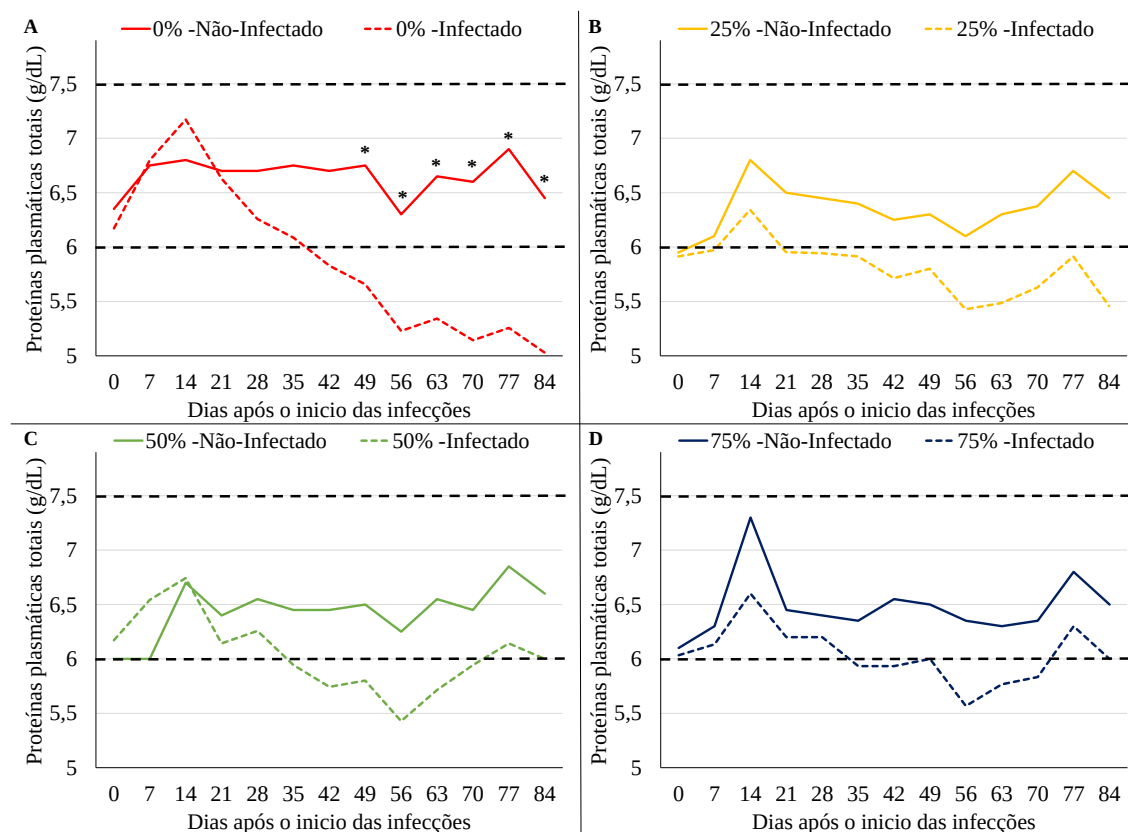


Figura 7: Médias das concentrações de proteínas plasmáticas (PP) de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0 (A), 25 (B), 50 (C) ou 75% (D) de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L_3) de *H. contortus* e 1.000 L_3 de *T. colubriformis* a cada três dias. --- indicam os limites superiores e inferiores de PP normais em ovinos (Schalm et al., 1986). * indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais infectados e não infectados da mesma dieta.

Na contagem de eosinófilos, houve interação Tempo*Dieta ($P = 0.0204$). As médias dos quatro grupos não infectados mantiveram-se abaixo de 350 eosinófilos/ μ L de sangue, no entanto, os animais infectados de todas as dietas, apresentaram valores crescentes no decorrer do estudo (Fig. 8A a 8D). Embora tenha ocorrido elevação das médias de eosinófilo/ μ L de sangue nos grupos infectados, diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos ocorreram em poucos momentos ao longo do estudo.

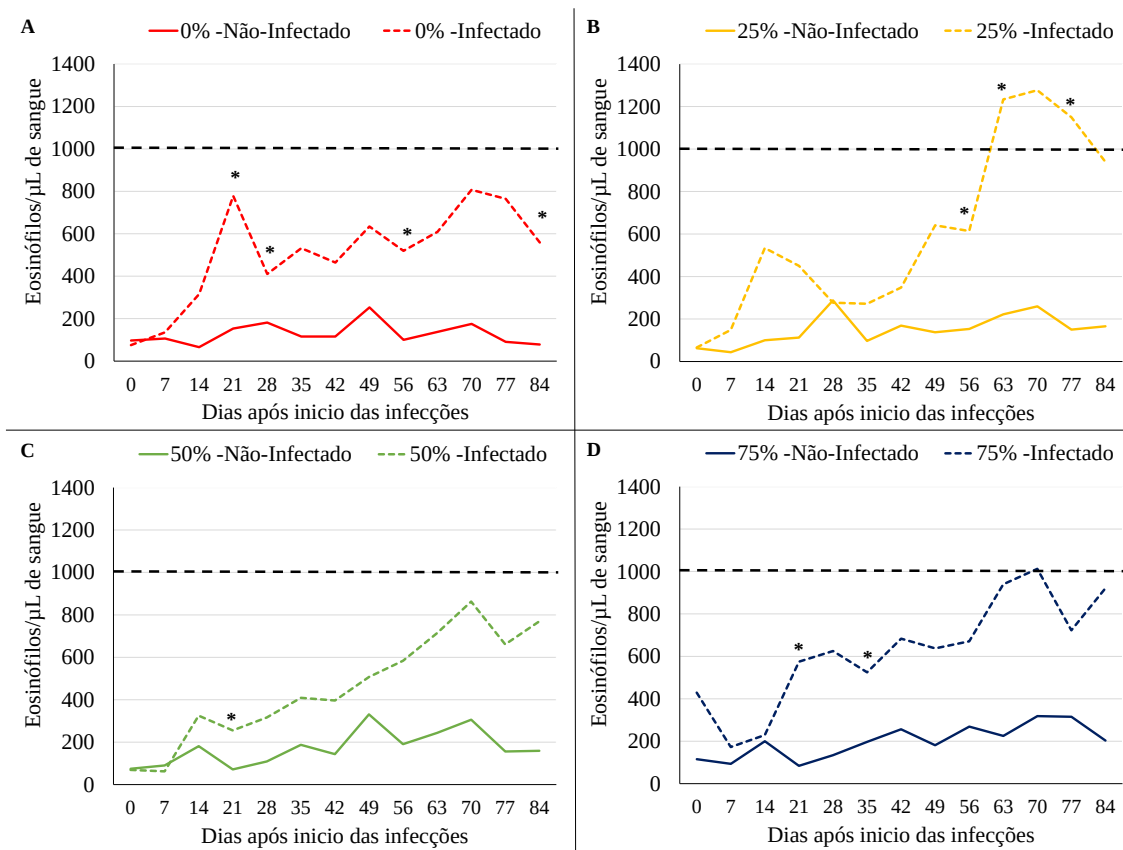


Figura 8: Médias de eosinófilos sanguíneos de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0 (A), 25 (B), 50 (C) ou 75% (D) de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias. Valores acima do --- indicam eosinofilia (Schalm et al., 1986). * indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais infectados e não infectados de mesma dieta.

Em relação a IgG anti-L₃ de *H. contortus* (Figura 9) e anti-L₃ de *T. colubriformis* (Figura 10), houve interação Tempo*Infecção ($P < 0,0001$). Os níveis de IgG para ambas as espécies tiveram valores crescentes a partir do dia 28 após o início das infecções, sendo que, da coleta do dia 42 ao dia 56 houve grande elevação nos níveis de IgG dos animais infectados (Figura 11).

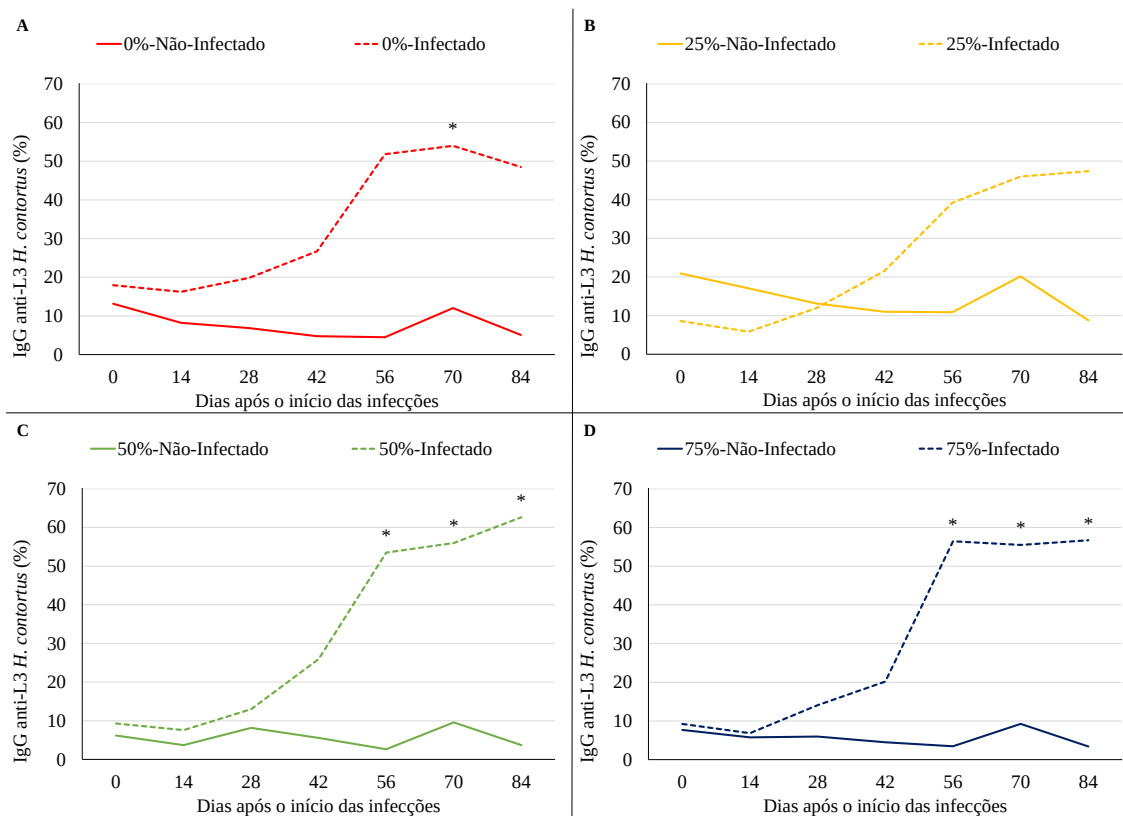


Figura 9: Médias de IgG anti-L₃ de *H. contortus* de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0 (A), 25 (B), 50 (C) ou 75% (D) de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias. * indicam diferença significativa (P<0,05) entre os animais infectados e não infectados de mesma dieta.

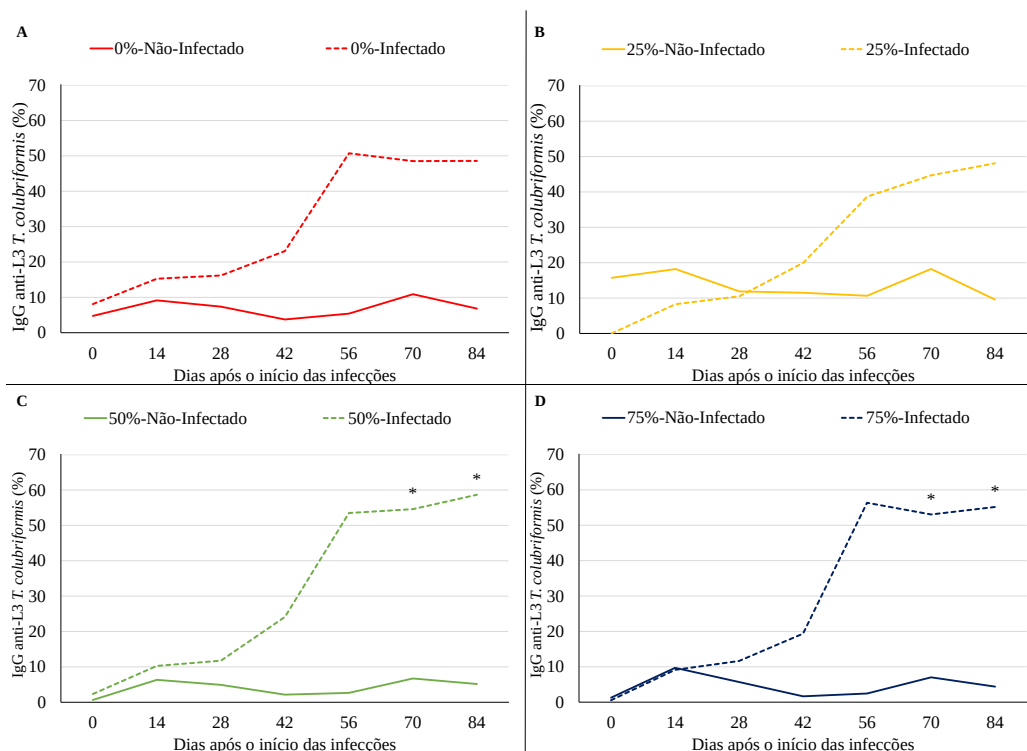


Figura 10: Média de IgG anti-L3 de *T. colubriformis* de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0 (A), 25 (B), 50 (C) ou 75% (D) de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* e 1.000 L3 de *T. colubriformis* a cada três dias. * indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais infectados e não infectados de mesma dieta.

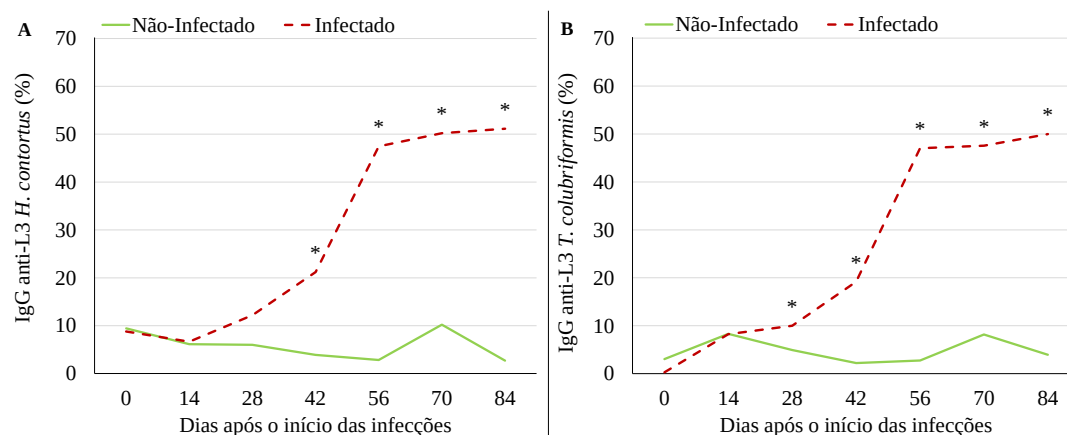


Figura 11: Média de IgG anti-L3 de *H. contortus* (A) e anti-L3 *T. colubriformis* (B) de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* e 1.000 L3 de *T. colubriformis* a cada três dias. * indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais infectados e não infectados.

Não houve interação Dieta*Infecção ou efeito da Dieta sobre as contagens de mastócitos, eosinófilos ou leucócitos globulares na mucosa do abomaso ou intestino delgado. Houve efeito da Infecção sobre os mastócitos e eosinófilos na mucosa do abomaso e eosinófilos e leucócitos globulares na mucosa do intestino delgado, com maiores valores dessas células em animais infectados (Tabela 2).

Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão de mastócitos, eosinófilos e leucócitos globulares por mm² na mucosa do abomaso e do intestino delgado de cordeiros que foram alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias. São apresentados os valores de *P*.

Dieta	Infecção	Abomaso			Intestino Delgado		
		Mastócito	Eosinófilo	Leucócito globular	Mastócito	Eosinófilo	Leucócito globular
0%	Infectado	35 $\pm$ 8	18 $\pm$ 4	585 $\pm$ 135	25 $\pm$ 9	27 $\pm$ 8	7 $\pm$ 3
	Não-Infectado	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	943 $\pm$ 67	31 $\pm$ 7	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2
25%	Infectado	53 $\pm$ 13	30 $\pm$ 14	552 $\pm$ 130	50 $\pm$ 12	22 $\pm$ 3	31 $\pm$ 12
	Não-Infectado	7 $\pm$ 6	1 $\pm$ 1	824 $\pm$ 251	23 $\pm$ 8	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 4
50%	Infectado	40 $\pm$ 10	54 $\pm$ 16	423 $\pm$ 127	32 $\pm$ 13	34 $\pm$ 8	11 $\pm$ 3
	Não-Infectado	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	519 $\pm$ 212	13 $\pm$ 4	10 $\pm$ 4	43 $\pm$ 42
75%	Infectado	42 $\pm$ 12	31 $\pm$ 15	432 $\pm$ 137	31 $\pm$ 9	32 $\pm$ 9	31 $\pm$ 12
	Não-Infectado	5 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	634 $\pm$ 118	32 $\pm$ 21	11 $\pm$ 1	7 $\pm$ 5
<i>P</i>	Dieta	0,9641	0,0887	0,2001	0,6110	0,4120	0,3501
	Infecção	<0,0001	<0,0001	0,0806	0,5501	<0,0001	0,0170
	Dieta*Infecção	0,9139	0,5263	0,7866	0,4831	0,9122	0,5949

382 No consumo de matéria seca total não houve interação Dieta*Infecção, porém
 383 houve efeito da Dieta ($P < 0,001$) e da Infecção ($P = 0,0334$). A dieta com 0% de
 384 concentrado foi a de menor consumo 0,914 kg/dia. A dieta com 25% de concentrado
 385 resultou em consumo de 1,215 kg/dia, enquanto que nas dietas 50 e 75% observaram-se
 386 os maiores consumos, 1,410 e 1,402 kg/dia, respectivamente (Figura 12). Quanto à
 387 infecção, o consumo de matéria seca de animais Infectados foi em média 13,5% menor
 388 que nos animais Não-Infectados.

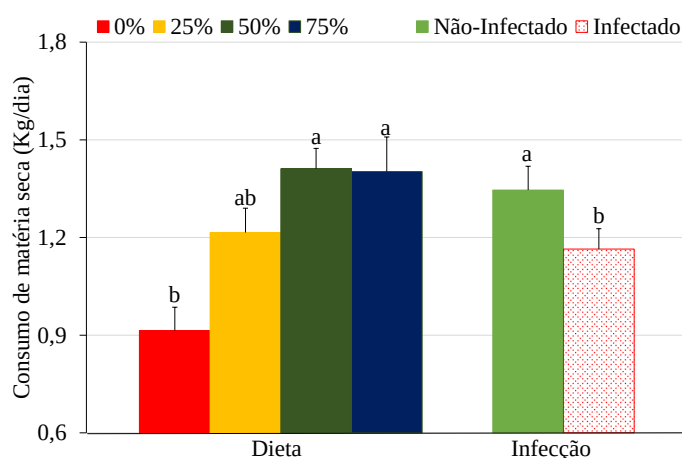


Figura 12: Média de consumo de matéria seca total de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado (Dieta). Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias (Infecção). Letras distintas indicam diferença ($P < 0,05$) entre Dieta ou entre Infecção. Barras = erro padrão.

4. DISCUSSÃO

396 A suplementação com concentrado levou a redução na contagem de OPG de *H.*
 397 *contortus*. A dieta com 75% de concentrado foi a mais efetiva na redução das contagens
 398 de OPG de *H. contortus*, ao passo que, animais não suplementados apresentaram médias
 399 de contagens de OPG mais elevadas, acima de 4000 OPG durante maior parte do estudo.
 400 Do ponto de vista epidemiológico, estes animais constituem importante fonte de
 401 contaminação ambiental devido à elevada disseminação de ovos no ambiente. A adição
 402 de 25% de concentrado a dieta promoveu redução muito discreta na contagem de OPG,
 403 apenas na última coleta, enquanto que na dieta 50%, a redução no número de OPG foi
 404 mais expressiva, com valores similares a dieta 75% a partir do dia 63 até o final do estudo.
 405 Maior resistência e redução de OPG foi descrita em animais suplementados que
 406 receberam dietas com maior aporte proteico nas infecções por *H. contortus* (Khan et al.,
 407 2017), o mesmo não ocorrendo no caso de infecção por *T. colubriformis* (Kyriazakis et
 408 al., 1996).

Como os animais suplementados com as dietas 50 e 75% apresentaram maior consumo de matéria seca, podem ter produzido maior quantidade de fezes que os animais alimentados com as demais dietas, o que em parte, contribui para a redução no OPG por efeito de diluição dos ovos em maior quantidade de massa fecal.

No presente estudo, cordeiros que receberam alguma suplementação com concentrado, apresentaram menor quantidade de fêmeas adultas de *H. contortus*, essa redução, favoreceu o grupo 75%-Infectado, com menores valores de OPG. Carvalho et al. (2015) também constataram redução da contagem de OPG de cordeiros mantidos sob infecção artificial por *H. contortus* e suplementados com concentrado contendo 17% de PB a 3% do peso vivo, e não encontraram efeito da dieta sobre o número de fêmeas adultas, porém, constataram que os animais suplementados, apresentavam parasitas machos e fêmeas de tamanho inferior e menor número de ovos no interior das fêmeas no grupo não suplementado.

Na espécie *T. colubriformis* não houve influência da Dieta sobre a contagem de OPG ou fases do parasita. Porém, a maior parte da população de *T. colubriformis* era constituída de parasitas adultos, enquanto que *H. contortus* estava presente predominantemente como L₄ inicial. Quando ocorre formação de resposta imune, pode ocorrer eliminação do parasita, ou, um processo de inibição das larvas, que ficam latentes em hipobiose. As larvas em hipopiose podem retomar seu desenvolvimento, normalmente, quando há redução na quantidade de parasitas adultos ou depressão da resposta imunológica. Já a resposta contra os parasitas adultos, pode ser de natureza específica contra o estágio adulto afetando seu desenvolvimento, sobrevivência e produção de ovos. A imunidade contra as formas imaturas, a medida que se desenvolveram em L₄ e L₅, tem impacto semelhante no desenvolvimento e resulta em adultos de menor tamanho e com menor tempo de sobrevivência e produção de ovos (Balic et al., 2000).

No presente estudo ficou demonstrado que a resposta imune contra *H. contortus* foi suficiente para induzir hipobiose das L₄ em fase inicial de desenvolvimento, independentemente da dieta. Ao mesmo tempo, a baixa quantidade de larvas e elevada quantidade de *T. colubriformis* demonstram que a imunidade desenvolvida não foi suficiente para minimizar a infecção contra esse parasita em nenhuma das dietas.

Apesar do impacto positivo da dieta com 75% de concentrado, que reduziu o número de L₄ final macho, L₅ inicial macho, fêmeas adulta e OPG de *H. contortus* e também, da dieta 50% e 25% que levou a redução na quantidade de fêmeas adultas e

redução do OPG desse parasita em alguns momentos, as dietas não influenciaram em nenhum dos parâmetros imunológicos avaliados (eosinófilos sanguíneos, IgG ou células da mucosa do abomaso e intestino delgado). De maneira geral, a resposta imune foi similar em todas as dietas, o que pode ter induzido o mesmo grau de hipobiose em todos os grupos.

Quanto mais elevada a suplementação com concentrado menor foi a redução nos valores de VG e concentrações de PP frente a infecção. O desenvolvimento de anemia foi mais elevado em animais que receberam dieta de baixa proteína (0%-Infectado). O efeito sinérgico da espoliação sanguínea de *H. contortus* e das lesões na mucosa da parede do intestino delgado causadas por *T. colubriformis*, levaram a redução da concentração de PP em todas as dietas, porém, de maneira mais exacerbada nos animais não suplementados. No caso dos animais suplementados, as dietas tornaram os animais mais resilientes. Segundo Knox et al. (2006), a síntese de proteínas, para compensar as perdas sanguíneas e reparação tecidual, são dependentes de proteína metabolizável absorvida através da dieta, e, em caso de escassez de alimento (quantidade ou qualidade), as infecções por nematódeos gastrintestinais são mais prejudiciais. Porém, a reposição de sangue e tecidos lesionados é sempre prioridade para o organismo, pois busca manter a homeostase, essencial para a sobrevivência do indivíduo, vindo em seguida, a produção de resposta imune e posteriormente o crescimento (Hoste et al., 2016).

A redução no consumo de matéria seca nos animais infectados, somaram-se a espoliação sanguínea causada por *H. contortus* e as lesões na mucosa do intestino delgado causadas por *T. colubriformis*. Quando ocorre infecção parasitária, a redução na ingestão de alimento é um dos fatores mais importantes para a redução no desempenho animal (Sykes, 2010) e está associada com a alocação de nutrientes para formação da resposta imunológica em detrimento do desenvolvimento corporal em animais jovens (Greer et al., 2005).

5. CONCLUSÃO

Dieta com 10,18% de proteína metabolizável e 2418 Kcal/kg de energia metabolizável (dieta com 50% de concentrado) confere resistência a infecções por *H. contortus*, pois causa redução na contagem de OPG e na quantidade de fêmeas adultas. Tal suplementação confere ainda resiliência aos cordeiros, tornando-os mais tolerantes as infecções por *H. contortus* e *T. colubriformis* e minimizando o aparecimento de anemia e hipoproteinemia, decorrentes da infecção por esses parasitas.

476 **AGRADECIMENTOS**

477 Os autores agradecem a assistência técnica de César C. Bassetto. Nadino Carvalho e José
 478 Henrique das Neves receberam apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de
 479 Pessoal de Nível Superior (CAPES), Caio Santos Pennacchi e Alessandro F. T. Amarante
 480 receberam apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
 481 e Tecnológico).

482 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 483 Alencar, C.A.B., Oliveira, R.A. de, Cóser, A.C., Martins, C.E., Cunha, F.F., Figueiredo,
 484 J.L. de A., Cecon, P.R., Leal, B.G., 2010. Valor nutritivo de gramíneas forrageiras
 485 tropicais irrigadas em diferentes épocas do ano. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 40, 20–27.
- 486 Almeida, F.A., Garcia, K.C.O.D., Torgerson, P.R., Amarante, A.F.T. do, 2010. Multiple
 487 resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*
 488 in sheep in Brazil. *Parasitol. Int.* 59, 622–625.
- 489 Amarante, A.F.T. do, Craig, T.M., Ramsey, W.S., El-Sayed, N.M., Desouki, A.Y., Bazer,
 490 F.W., 1999. Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida native,
 491 Rambouillet and crossbreed ewes. *Vet. Parasitol.* 85, 61–9.
- 492 Amarante, A.F.T. do, Padovani, C., Barbosa, M., 1996. Contaminação da pastagem por
 493 larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de bovinos e ovinos em
 494 Botucatu-SP. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 5, 65–73.
- 495 Amarante, A.F.T. do, Susin, I., Rocha, R.A., Silva, M.B., Mendes, C.Q., Pires, A.V.,
 496 2009. Resistance of Santa Ines and crossbred ewes to naturally acquired gastrointestinal
 497 nematode infections. *Vet. Parasitol.* 165, 273–80.
- 498 Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N., 2000. The immunobiology of gastrointestinal
 499 nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45, 181–241.
- 500 Boukhari, M.I., Elfadil, A.A.M., Omer, F.A., Shuaib, Y.A., 2016. Prevalence and Risk
 501 Factors of *Haemonchus contortus* in Sheep in Khartoum State , the Sudan. *J. Agric. Vet.*
 502 *Sci.* 9, 77–83.
- 503 Carvalho, N., Neves, J.H. Das, Nazato, C., Louvandini, H., Amarante, A.F.T. do, 2015.
 504 The effects of Diet and corticosteroid-induced immune suppression during infection by
 505 *Haemonchus contortus* in lambs. *Vet. Parasitol.* 214, 289–294.
- 506 Dawkins, H.J., Windon, R.G., Eagleson, G.K., 1989. Eosinophil responses in sheep
 507 selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J.*
 508 *Parasitol.* 19, 199–205.

- 509 Greer, A.W., Stankiewicz, M., Jay, N.P., McAnulty, R.W., Sykes, A.R., 2005. The effect
510 of concurrent corticosteroid induced immuno-suppression and infection with the
511 intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis* on food intake and utilization in both
512 immunologically naïve and competent sheep. Anim. Sci. 80, 89–99.
- 513 Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Quijada, J., Chan-Perez, I., Dakheel, M.M., Kommuru,
514 D.S., Mueller-Harvey, I., Terrill, T.H., 2016. Interactions between nutrition and
515 infections with *haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small
516 ruminants, in: Advances in Parasitology. p. 239–351.
- 517 Kanobana, K., Vervelde, L., Van Der Veer, M., Eysker, M., Ploeger, H.W., 2001.
518 Characterization of host responder types after a single *Cooperia oncophora* infection:
519 kinetics of the systemic immune response. Parasite Immunol. 23, 641–53.
- 520 Khan, F.A., Sahoo, A., Karim, S.A., 2017. Moderate and high levels of dietary protein on
521 clinico-biochemical and production responses of lambs to repeated *Haemonchus*
522 *contortus* infection. Small Rumin. Res. 150, 52–59.
- 523 Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, a J., 2006. Exploiting the effect of
524 dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against
525 gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 139, 385–93.
- 526 Kyriazakis, I., Anderson, D.H., Oldham, J.D., Coop, R.L., Jackson, F., 1996. Long-term
527 subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet
528 selection and performance of growing lambs. Vet. Parasitol. 61, 297–313.
- 529 Mhomga, L.I., Nnadi, P.A., Chiejina, S.N., IDIKA, I.K., NGONGEH, L.A., 2012. Effects
530 of dietary protein supplementation on the performance of West African dwarf (WAD)
531 goats infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. Turkish
532 J. Vet. Anim. Sci. 36, 668–675. doi:103906/vet-1106-21
- 533 NRC, N.R.C., [s.d.]. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids,
534 and New World Camelids, National Academy Press. 2007, Washington, D.C.
- 535 Sahoo, A., Khan, F.A., 2016. Nutritional and Biological Control Synergism against
536 Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. J. Vet. Sci. Anim. Husb. 4, 1–13.
- 537 Santos, M.C., Xavier, J.K., Amarante, Mô.R. V, Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T. do,
538 2014. Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and
539 its role on parasite specificity. Vet. Parasitol. 203, 127–138.
- 540 Schalm, O.W., Jain, C.N., Carroll, J.E., 1986. Veterinary Hematology, 4^o ed. Lea &
541 Febiger, Philadelphia.
- 542 Silva, B.F., Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T. do, 2012. Immune responses in sheep

- 543 naturally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) and gastrointestinal nematodes.
544 Vet. Parasitol. 190, 120–126.
- 545 Sykes, a. R., 2010. Parasitism and production in farm animals. Anim. Prod. 59, 155–172.
- 546 Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminante,
547 4º ed. Japan International Cooperation Agency.

4. Desempenho produtivo de cordeiros infectados artificialmente por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* submetidos a diferentes planos nutricionais

Nas páginas a seguir encontra-se o manuscrito encaminhado a revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) na forma de artigo científico.

Link para acesso as normas da revista:

<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/about/submissions#authorGuidelines>

Desempenho produtivo de cordeiros infectados artificialmente por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* e submetidos a diferentes planos nutricionais

Nadino Carvalho^{1*}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, Brasil.

*Corresponding author: Nadino Carvalho. Tel.: +55 14 3880 0546; E-mail: nadinocarvalho@yahoo.com.br.

Resumo

O manejo nutricional inadequado afeta o desenvolvimento de um rebanho de ovinos e quando há infecções por nematódeos gastrointestinais as consequências podem ser severas. Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho produtivo de cordeiros infectados artificialmente por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* submetidos a diferentes planos nutricionais. Quarenta e quatro cordeiros machos da raça Dorper com aproximadamente quatro meses e $31,5 \pm 3,24$ kg de peso corporal foram alocados aleatoriamente em quatro dietas à base de feno triturado, *Cynodon dactylon* (cv. Tyfton), acrescido de 0%, 25%, 50% ou 75% de concentrado. Em cada dieta sete animais foram infectados com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias ao longo de 12 semanas. Em cada dieta, quatro animais permaneceram como grupo controle, Não-Infectados. Os grupos experimentais foram: 0%-Infectado, 0%-Não-Infectado, 25%-Infectado, 25%-Não-Infectado, 50%-Infectado, 50%-Não-Infectado, 75%-Infectado e 75%-Não-Infectado. Ocorreu redução no consumo de matéria seca ($P = 0,0224$), ganho em peso diário ($P = 0,0112$), e rendimento de carcaça fria ($P = 0,0112$) de animais infectados, porém, não influenciou na conversão alimentar

(P = 0,2879). A suplementação com 75% de concentrado confere maior GPD que as demais dietas, porém a dieta com 50% apresenta conversão alimentar e rendimento de carcaça semelhantes a suplementação com 75%. Ocorre redução no GPD de cordeiros infectados que recebem dieta com 75% de concentrado, enquanto que nas dietas com 50% de concentrado ou menos, o GPD não é afetado pela infecção.

31

32 Termos para indexação: Helmintose, dieta, ovinos, desempenho produtivo.

33

34

1. Introdução

35

O sistema de produção de ovinos no Brasil apresenta baixa eficiência produtiva.

36

Por ser majoritariamente extensivo e com pastagens de baixa qualidade nutricional, os

37

animais levam mais tempo para atingir o peso de abate, contribuindo para os baixos

38

índices zootécnicos nacionais (Nunes et al., 2007).

39

Somado a esses fatores, as infecções helmínticas oneram a produção ao reduzir

40

o ganho em peso dos animais e elevar a mortalidade. Os principais nematódeos de ovinos

41

são *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. O controle de nematódeos

42

em ovinos, majoritariamente, é realizado através de anti-helmínticos. Seu uso

43

indiscriminado, com sucessivas administrações de medicamentos em momentos em que

44

a medicação não era recomendada, elevou a pressão de seleção de helmintos resistentes.

45

Atualmente, as bases farmacológicas disponíveis no mercado, não funcionam

46

adequadamente, tornando o controle alopático muitas vezes impraticável (Almeida et al.,

47

2010; Mederos et al., 2014).

48

Ao buscarmos estratégias para fomentar o fortalecimento dos sistemas de

49

criações em pastagens, é importante lembrar que há outro agravante. Os nematódeos

50

gastrointestinais *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, são as

51 principais espécies que acometem os ovinos e levam a redução no desempenho, elevam
52 os custos com medicamentos e mortalidade dos animais (Amarante et al., 2013).

53 Estudos têm demonstrado que animais infectados por *H. contortus* e *T.*
54 *colubriiformis* que recebem suplementação proteica apresentam melhores índices
55 zootécnicos, e são mais tolerantes a infecção parasitária (Carvalho et al., 2015; Rocha et
56 al., 2011). Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o desempenho produtivo
57 de cordeiros infectados artificialmente por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus*
58 *colubriiformis* submetidos a diferentes planos nutricionais.

59 2. Material e métodos

60 Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA),
61 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista
62 “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu; protocolo nº78/2014-CEUA.

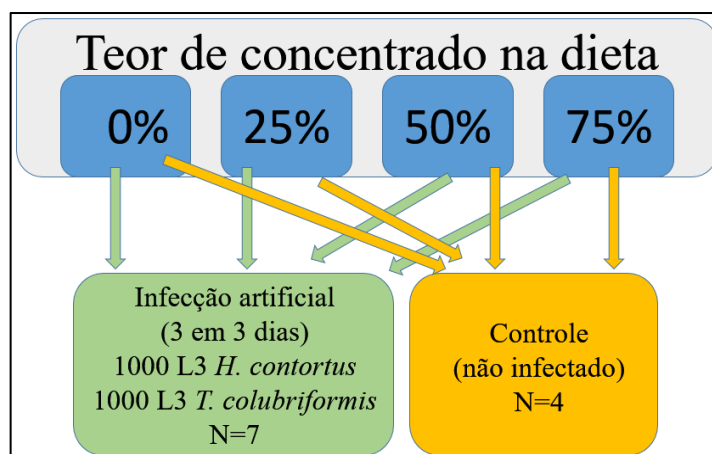
63 Animais e instalações

64 Todos os cordeiros, recém desmamados, foram adquiridos em uma fazenda
65 comercial onde foram criados confinados desde o nascimento. Na chegada, os animais
66 não apresentaram ovos por grama de fezes (OPG) de estrongilídeos e dois animais tiveram
67 50 ovos por grama de fezes (OPG) de *Strongyloides papillosus*. Na técnica qualitativa de
68 flutuação de Willis (Ueno e Gonçalves, 1998) 11 animais estavam infectados por
69 estrongilídeos e 42 infectados por *S. papillosus* e todos apresentavam oocistos de *Eimeria*
70 spp.. Na cultura de fezes, foi constatada infecção por *Haemonchus* (82%) e
71 *Trichostrongylus* (18%).

72 Os animais foram desverminados com monepantel (2,5 mg/kg, Zolvix®,
73 Novartis) em dose única, albendazol (10 mg / kg, Valbazen®, Pfizer) e levamisol (10 mg
74 / kg, Ripercol®, Dodge Fort) por 4 dias consecutivos e receberam em dose única o
75 coccidicida toltrazuril, (20 mg/kg, Baycox®, Pfizer). Todos os animais foram vacinados

76 contra clostridioses (Sintoxan® Polivalente, Merial) conforme as recomendações do
77 fabricante.

78 Foram utilizados 44 cordeiros machos da raça Dorper com idade inicial de quatro
79 meses e peso de $31,5 \pm 3,24$ kg. O delineamento experimental foi fatorial 4X2 (Figura 1),
80 quatro dietas com proporções volumoso:concentrado de 100:0 = 0%, 75:25= 25%, 50:50=
81 50% e 25:75 = 75% e dois estados parasitários, sendo eles, infectado ou não infectado.
82 Os oito grupos experimentais, foram: 0%-Infectado, 0%-Não-Infectado, 25%-Infectado,
83 25%-Não-Infectado, 50%-Infectado, 50%-Não-Infectado, 75%-Infectado e 75%-Não-
84 Infectado. Os animais foram mantidos em baias individuais, providas de comedouro e
85 bebedouro, e as instalações passaram por limpeza diária, afim de evitar infecções
86 indesejadas.



87
88 Figura 13: Delineamento experimental: cordeiros foram alimentados com dieta
89 total, feno mais concentrado, nas proporções de 0, 25, 50 ou 75% de
90 concentrado. Em cada dieta os animais foram infectados artificialmente com
91 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a
92 cada três dias (Infectado) ou permaneceram livres de infecção durante todo o
93 estudo (Não-Infectado). Os animais foram eutanasiados aos 84 dias após o
94 início das infecções

95

96 Dietas

97 As dietas foram formuladas, segundo o NRC (2007), de forma a atender as
98 exigências de cordeiros em crescimento (maturidade de 0,3) e ganhos diários estimados

de 67, 130, 213 ou 302 g/dia para as dietas 0%, 25%, 50% e 75%, respectivamente. O programa computacional Small Ruminant Nutrition System (SRNS) com base na estrutura do Cornell Net Carbohydrate and Protein System (2000) foi utilizado para a elaboração das dietas. Na tabela 1 estão descritos os ingredientes da dieta e a composição nutricional que se baseia em simulação ruminal. Foi utilizado feno triturado, oriundo de propriedade rural onde não havia criação de ruminantes, para evitar infecção indesejável por nematódeos gastrointestinais.

Tabela 1 - Formulação e composição nutricional das dietas.

	Inclusão de concentrado na dieta (MS)			
	0%	25%	50%	75%
Ingrediente (% MS)				
Feno <i>Cynodon dactylon</i>	97,76	73,49	49,10	24,60
Milho moído	0,00	20,84	41,78	62,78
Farelo de soja	0,00	3,09	6,19	9,30
Calcário calcítico	0,00	0,38	0,76	1,15
Ureia	0,00	0,19	0,37	0,56
Mineral ¹	1,57	1,41	1,25	1,13
Cloreto de amônio	0,67	0,61	0,53	0,48
Composição nutricional				
Matéria seca (%)	88,32	88,39	88,34	88,31
Proteína bruta (%)	8,50	10,40	12,30	14,20
Proteína degradável no rúmen (% PB)	58,10	59,90	61,10	63,20
Proteína metabolizável (%)	7,41	8,79	10,18	11,53
Energia metabolizável (Kcal/kg) ²	1861	2133	2418	2726
FDN efetivo (%)	74,04	57,07	40,36	23,46
Extrato etéreo	1,50	2,10	2,70	3,40
Cálcio (%) ²	0,67	0,70	0,71	0,73
Fósforo (%) ²	0,30	0,31	0,35	0,40

1: Composição do Mineral (kg do produto) 200g Ca, 75g P, 50g Mg, 10mg S, 24mg Se, 3.060mg Zn, 1.000mg Mn, 2.500mg I, 20mg Co; Monensina sódica. 2 Valores calculados pelo programa CNCPS – Ovinos.

O fornecimento de alimento foi realizado duas vezes ao dia, às 8h e às 16h, com acesso *ad libitum* às dietas e à água.

Consumo e desempenho

O consumo voluntário de cada animal foi aferido diariamente por meio da diferença entre o peso da dieta ofertada e peso das sobras recolhidas na manhã seguinte. A quantidade de alimento oferecido foi ajustada diariamente durante o experimento, permitindo sobras de até 20% do total ofertado para a dieta 0% e 10% de sobras para as demais dietas. Os animais foram pesados semanalmente para determinar a evolução do ganho em peso.

Os animais foram eutanasiados 84 dias após o início das infecções. Para isso, passaram por jejum de sólidos por 14 horas e foram pesados momentos antes do abate. Após o abate, as carcaças foram mantidas resfriadas em câmara frigorífica por 24 horas e pesadas para determinação do peso da carcaça fria.

Para a determinação do rendimento de carcaça fria, consumo e conversão alimentar foram usadas as equações:

Rendimento de carcaça quente = $(\text{peso de carcaça quente} / \text{peso vivo ao abate}) \times 100$.

Rendimento de carcaça fria = $(\text{peso de carcaça fria} / \text{peso vivo ao abate}) \times 100$.

Consumo diário semanal = $(\sum \text{Peso do alimento ofertado diariamente na semana} - \sum \text{peso das sobras de alimento recolhidos diariamente na semana}) / 7$.

Conversão alimentar = $(\sum \text{peso do alimento ofertado diariamente} - \sum \text{peso das sobras de alimento recolhidos diariamente}) / (\text{peso final dos animais} - \text{peso inicial dos animais})$.

133

134 **Produção de larvas infectantes**

Quatro cordeiros jovens, machos, livres de infecção por nematódeos gastrointestinais, foram infectados com isolados de larvas de terceiro estágio (L₃) mantidas em nitrogênio líquido, descritos por Almeida et al. (2010). Dois desses animais foram infectados com *H. contortus* e dois com *T. colubriformis* e a partir do início do período patente da infecção, serviram como animais doadores de ovos nas fezes, para a

produção de larvas infectantes. As fezes foram coletadas através de bolsas, acopladas a região pélvica dos animais, que permitia a defecação diretamente dentro da bolsa. As fezes foram recolhidas duas vezes ao dia e após a colheita, estas foram acondicionadas em estufa a 27°C para garantir o desenvolvimento dos ovos e até o estágio de larva infectante em coprocultura (UENO e GONÇALVES, 1998).

Infecção artificial

Cada animal do grupo infectado recebeu a cada três dias 1.000 L₃ de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis*, totalizando 28.000 larvas infectantes de cada espécie ao longo das 12 semanas de estudo.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância e quando diferiram, comparados pelo método de Tukey. Nas figuras são apresentadas as médias $\pm$ erro padrão de valores não transformados. Análise com medidas repetidas foi utilizada para determinar efeito do tempo no consumo de matéria seca.

3. Resultados e Discussão

Não houve óbito de animais ao longo do experimento. No entanto, um animal do grupo 75%-Infectado não se adaptou a dieta e apresentou sinais clínicos de acidose ruminal, por esse motivo foi excluído do experimento.

Na ingestão semanal de matéria seca não houve interação Tempo*Dieta*Infecção, porém houve interação Tempo*Dieta ($P < 0,001$) e Tempo*Infecção ($P = 0,0145$). A dieta com 0% de concentrado teve menor consumo durante todo o estudo. As dietas 25% e 50% tiveram consumo crescente até a sexta semana, seguido de redução na ingestão de matéria seca após esse período. A redução no consumo de MS foi mais drástica na dieta 25%. A

165 dieta com 75% de concentrado teve seu consumo crescente no decorrer do estudo (Figura
 166 12). Animais infectados tiveram menor consumo ao longo do estudo, porém essa
 167 diferença só foi significativa ($P < 0,05$) nas semanas quatro, cinco e seis após o início das
 168 infecções, quando a redução média no consumo foi de 242, 290 e 365 g/dia,
 169 respectivamente, e voltou a diferir na semana 10, 240g/dia e semana 12, 136 g/dia. O
 170 incremento no consumo ocorreu principalmente pela menor quantidade de fibra em
 171 detergente neutro (FDN) nas dietas, devido a adição do concentrado. Após a semana 6
 172 houve breve redução no consumo de matéria seca em todas as dietas, no entanto, na dieta
 173 25% a redução persistiu até o final do estudo. Quando ocorre uma infecção parasitária a
 174 redução na ingestão de alimento é um dos fatores mais importantes para a redução no
 175 desempenho animal (Sykes, 2010) e está associada a desvio de nutriente para a nutrição
 176 do parasita, reparação tecidual e formação da resposta imunológica (Greer et al., 2005;
 177 Houdijk, 2012).

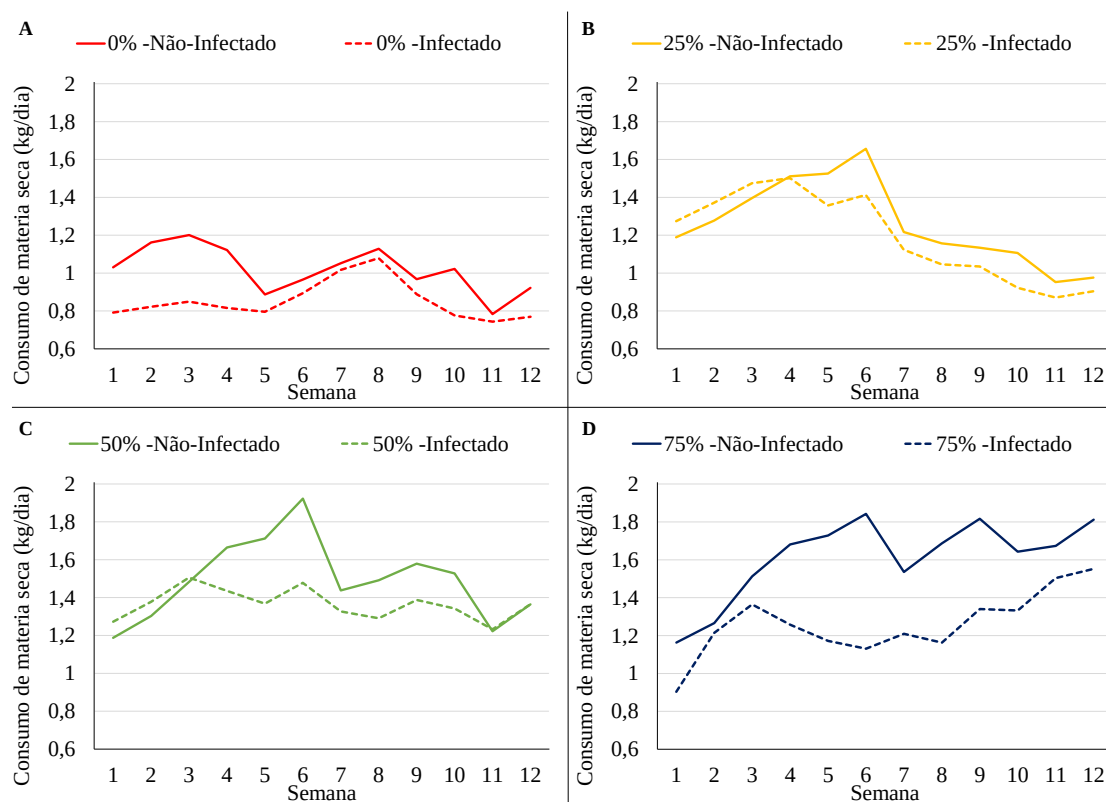


Figura 2: Consumo de matéria seca semanal (média) de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0 (A), 25 (B), 50 (C) ou 75% (D) de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* e 1.000 L₃ de *T. colubriformis* a cada três dias. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre animais Infectados e Não-Infectado de mesma dieta.

Na tabela 2 são apresentados o peso inicial dos animais, peso final e rendimento de carcaça fria. Não houve interação significativa Dieta*Infecção sobre o GPD ($P = 0,059$), no entanto, é importante destacar que a única dieta em que ocorreu diferença em função da infecção foi a 75%, quando os animais Infectados apresentaram menor GPD que os Não-Infectados (Figura A). Houve efeito da Dieta ($P < 0,0001$), bem como, da Infecção ($P = 0,0112$) sobre GPD. As Dieta 0% e 25% apresentaram GPD semelhantes ($P < 0,05$) foram semelhantes, já na dieta 50% o GPD foi de 189 g/dia, enquanto que a dieta com maior GPD foi a 75%, com 254 g/dia. No geral, animais do grupo Infectado deixaram de ganhar 33g/dia, em comparação com o grupo Não-Infectado (Figura 3 B). Maior digestibilidade da dieta ocorre quando há diminuição no FDN da dieta, podendo elevar o consumo de MS, somado ao maior aporte de PB da dieta, propicia maior ganho em peso nos animais (Alencar et al., 2010), no entanto, quando há infecção parasitária, parte dos nutrientes são utilizados pelos parasitas ou desviados para a reparação tecidual e formação de resposta imune contra o parasita (Greer et al., 2005).

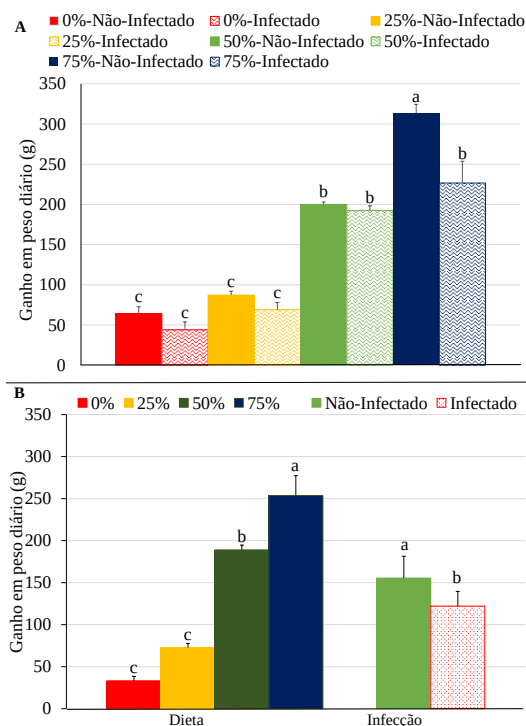


Figura 3: Ganho em peso (média) de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado (Dieta). Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L_3) de *H. contortus* e 1.000 L_3 de *T. colubriformis* a cada três dias (Infecção). Letras distintas indicam diferença ($P < 0,05$) entre Dieta ou entre Infecção. Barras = erro padrão.

Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão de peso inicial, peso final de cordeiros que foram alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado. Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L_3) de *H. contortus* e 1.000 L_3 de *T. colubriformis* a cada três dias. São apresentados os valores de P.

Dieta	Infecção	Peso inicial (Kg)	Peso final (Kg)	Rendimento de carcaça fria (%)
0%	Infestado	32,72 $\pm$ 2,46	38,78 $\pm$ 2,63	40,97 $\pm$ 1,82
	Não-Infestado	30,45 $\pm$ 1,26	32,53 $\pm$ 1,29	37,73 $\pm$ 1,03
25%	Infestado	31,40 $\pm$ 1,17	38,30 $\pm$ 1,39	45,70 $\pm$ 0,51
	Não-Infestado	32,84 $\pm$ 1,41	38,50 $\pm$ 1,25	46,28 $\pm$ 0,77
50%	Infestado	32,67 $\pm$ 2,10	48,50 $\pm$ 2,19	48,88 $\pm$ 1,58
	Não-Infestado	31,37 $\pm$ 1,59	47,29 $\pm$ 1,66	46,35 $\pm$ 0,62
75%	Infestado	31,05 $\pm$ 0,35	56,50 $\pm$ 0,96	50,45 $\pm$ 0,68
	Não-Infestado	31,75 $\pm$ 1,20	50,30 $\pm$ 3,48	48,59 $\pm$ 0,96
Dieta		0,964	<0,0001	<0,0001
Infecção		0,753	0,064	0,022
Dieta*Infecção		0,626	0,441	0,296

Houve efeito da Dieta sobre a conversão alimentar ($P < 0,05$). Cordeiros na dieta 0% consumiram 49,8 kg de MS para ganhar 1 kg de peso, ao passo que, animais das dietas 25, 50 e 75% necessitaram de, 17,6, 7,5 e 5,7 kg de MS, respectivamente (Figura 4). No presente estudo a infecção não causou alteração na conversão, e embora não tenha havido interação Dieta*infecção, cordeiros da dieta 0%-Não-Infectado tiveram conversão de 22,3 enquanto que em seu grupo controle, 0%-Infectado, a conversão foi de 65,4. *T. colubriformis* causa lesão na mucosa do intestino delgado e com isso, causa redução na absorção de nutrientes e em consequência, elevação da conversão alimentar (Cardia et al., 2011).

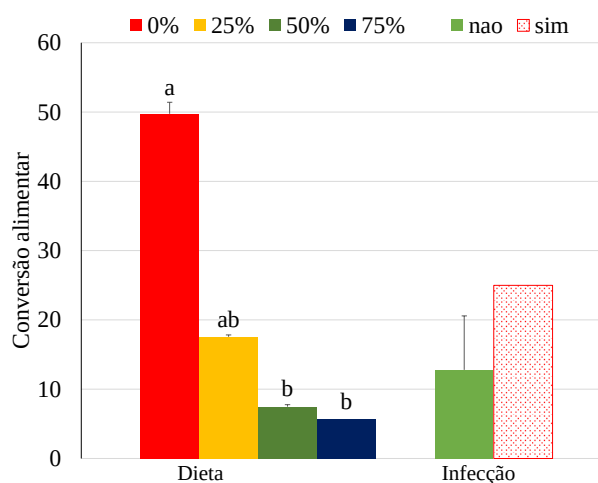


Figura 4: Conversão alimentar (média) de cordeiros alimentados com dietas de feno, acrescida de 0, 25, 50 ou 75% de concentrado (Dieta). Os animais foram infectados, ou não, com 1.000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* e 1.000 L3 de *T. colubriformis* a cada três dias (Infecção). Letras distintas indicam diferença ($P < 0,05$) entre Dieta ou entre Infecção. Barras = erro padrão.

Não houve interação Dieta*Infecção sobre o rendimento de carcaça fria, porém, houve efeito da Infecção ($P = 0,0224$) e da Dieta ($P < 0,001$). Animais de dieta 0% tiveram menor rendimento de carcaça, 38,9% e a média mais elevada foi na dieta 75%, com 49,33% de rendimento de carcaça fria (Tabela 2). Animais dos grupos Não-Infectado

232 apresentaram média de rendimento de carcaça fria de 46,51% e os Infectados tiveram
233 média de 44,78% ($P = 0,0224$).

234 Ficou claramente demonstrada as diferenças entre as dietas desenhadas para o
235 presente estudo, e quanto mais concentrado nas dietas, melhor o desempenho dos
236 cordeiros com incremento em consumo de matéria seca, melhor conversão alimentar,
237 maior GPD e rendimento de carcaça. No ganho em peso diário, a suplementação com
238 25% de concentrado não mostrou incremento no ganho em relação a dieta 0%, mas no
239 rendimento de carcaça já houve diferença. A infecção levou a redução no GPD onde
240 animais infectados deixaram de ganhar 33 gramas dia, em comparação com os não
241 infectados, e também no rendimento de carcaça pois animais que receberam alguma
242 suplementação tiveram rendimento superior a 45%. Estudos mostram que essas perdas
243 são advindas da espoliação sanguínea causada por *H. contortus*, redução no consumo de
244 matéria seca e absorção dificultada de nutrientes (Greer et al., 2005). O impacto negativo
245 da infecção leva a grandes perdas para o produtor rural que além de perder peso animal
246 no pasto, perde também no frigorífico com carcaças de baixa qualidade.

247 O presente estudo demonstrou que para se obter alto desempenho em cordeiros,
248 o controle da verminose é fundamental, pois animais recebendo dietas com 75% de
249 concentrado e que estavam infectados tiveram redução de 27,74% em seu ganho em peso
250 em relação aos não infectados de mesma dieta.

251 Ocorre redução no ganho em peso de cordeiros infectados por *H. contortus* e *T.*
252 *colubriformis* que recebem dieta com 75% de concentrado, enquanto que nas dietas com
253 50% de concentrado ou menos, o GPD não é afetado pela infecção. A suplementação com
254 75% de concentrado confere maior GPD que as demais dietas, porém a dieta com 50%
255 apresenta conversão alimentar e rendimento de carcaça semelhantes a suplementação com
256 75%.

257

4. Conclusões

258

259

260

Dieta com 10,18% de proteína metabolizável e 2418 Kcal/kg de energia metabolizável (dieta com 50% de concentrado) promove elevados índices de ganho em peso e rendimento de carcaça.

261

Agradecimentos

262

263

264

265

266

Os autores agradecem a assistência técnica de César C. Bassetto, Nadino Carvalho e José Henrique das Neves receberam apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Caio Santos Pennacchi e Alessandro F. T. Amarante receberam apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

267

Referências

268

269

270

271

ALENCAR, C. A. B.; OLIVEIRA, R. A. de; CÓSER, A. C.; MARTINS, C. E.; CUNHA, F. F.; FIGUEIREDO, J. L. de A.; CECON, P. R.; LEAL, B. G. 2010. Valor nutritivo de gramíneas forrageiras tropicais irrigadas em diferentes épocas do ano. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 40, n. 1, p. 20–27.

272

273

274

Almeida, F.A., Garcia, K.C.O.D., Torgerson, P.R., Amarante, A.F.T. do, 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. Parasitol. Int. 59, 622–625.

275

276

277

Amarante, A.F.T. do, Padovani, C., Barbosa, M., 1996. Contaminação da pastagem por larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de bovinos e ovinos em Botucatu-SP. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 5, 65–73.

278

279

AMARANTE, A. F. T., 2013. Sustainable worm control practices in South America. Small Ruminant Research.

280

281

282

Cardia, D.F.F., Rocha-Oliveira, R.A., Tsunemi, M.H., Amarante, A.F.T. do, 2011. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. Vet. Parasitol. 182, 248–58.

- 283 Carvalho, N., Neves, J.H. Das, Nazato, C., Louvandini, H., Amarante, A.F.T. do, 2015.
 284 The effects of Diet and corticosteroid-induced immune suppression during infection by
 285 *Haemonchus contortus* in lambs. Vet. Parasitol. 214, 289–294.
- 286 Greer, A.W., Stankiewicz, M., Jay, N.P., McAnulty, R.W., Sykes, A.R., 2005. The effect
 287 of concurrent corticosteroid induced immuno-suppression and infection with the
 288 intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis* on food intake and utilization in both
 289 immunologically naïve and competent sheep. Anim. Sci. 80, 89–99.
- 290 Houdijk, J. G. M., 2012. Differential effects of protein and energy scarcity on resistance
 291 to nematode parasites. Small Ruminant Research. 103, 41-49.
- 292 Mederos, A.E., Ramos, Z., Banchero, G.E., 2014. First report of monepantel *Haemonchus*
 293 *contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. Parasit. Vectors 7, 598.
- 294 NRC, N.R.C., [s.d.]. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids,
 295 and New World Camelids, National Academy Press. 2007, Washington, D.C.
- 296 NUNES, H.; ZANINE, A. de M.; MACHADO, T.M.M.; CARVALHO, F.C. de.
 297 Alimentos alternativos na dieta dos ovinos: uma revisão. Archivos Latinoamericanos de
 298 Producción Animal, v.15, p.141-158, 2007.
- 299 Rocha, R. a, Bricarello, P.A., Silva, M.B., Houdijk, J.G.M., Almeida, F.A., Cardia,
 300 D.F.F., Amarante, A.F.T. do, 2011. Influence of protein supplementation during late
 301 pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to
 302 *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 181, 229–38.
- 303 Sykes, a. R., 2010. Parasitism and production in farm animals. Anim. Prod. 59, 155–172.
- 304 Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminante,
 305 4º ed. Japan International Cooperation Agency.

5. Discussão Geral

A suplementação com concentrado foi benéfica, pois conferiu maior resiliência aos cordeiros, demonstrada pela maior capacidade de produzir hemácias e proteínas plasmáticas, levando a valores de VG dentro dos padrões de normalidade, conferiu ainda resistência contra os parasitas, ao afetar a quantidade de fêmeas adultas de *H. contortus* e a contagem de OPG. Propiciou maior consumo, ganho em peso, rendimento de carcaça o que acelera o tempo de terminação de cordeiros, que podem ser comercializados mais cedo, ao atingir o peso preconizado para o abate.

Quando ocorre uma infecção parasitária, a redução na ingestão de alimento é um dos fatores mais importantes para a redução no desempenho animal (Sykes, 2010) e está associada a desvio de nutrientes para formação de tecidos e células envolvidos na resposta imunológica (Greer et al., 2005). Nossos dados corroboram com tais assertivas, pois a infecção cursou com redução no consumo de matéria seca nos animais infectados, somado a espoliação sanguínea causada por *H. contortus* e lesões na mucosa do intestino delgado causada por *T. colubriformis*. Em consequência houve grande redução no GPD dos animais infectados, que no geral, deixaram de ganhar 33 g por dia.

6. Conclusões Gerais

Houve aquisição da imunidade contra *H. contortus* e *T. colubriformis*, porém a formação de resposta imune não diferiu em função das dietas.

H. contortus foi mais afetado pela expressão da imunidade, especialmente as fêmeas, detectadas em menor número na luz do abomaso de animais suplementados, além de uma possível redução na fecundidade, o que levou a redução nas contagens de OPG.

Dieta com 10,18% de proteína metabolizável e 2418 Kcal/kg de energia metabolizável (dieta com 50% de concentrado) favorece a resiliência e a resistência em ovinos contra *H. contortus* e *T. colubriformis* e promove elevados índices de ganho em peso e rendimento de carcaça.

7. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2002.
- ALENCAR, C. A. B.; OLIVEIRA, R. A. de; CÓSER, A. C.; MARTINS, C. E.; CUNHA, F. F.; FIGUEIREDO, J. L. de A.; CECON, P. R.; LEAL, B. G. Valor nutritivo de gramíneas forrageiras tropicais irrigadas em diferentes épocas do ano. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 1, p. 20–27, 28 dez. 2010.
- ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSO, P. R.; AMARANTE, A. F. T. do. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 622–625, dez. 2010.
- ALMEIDA, J. L. de. Revisão do genero *Haemonchus* Cobb, 1898: (Nematoda: Trichostrongylidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 30, n. 1, p. 57–114, jun. 1935.
- AMARANTE, A. F. T. do. Sustainable worm control practices in South America. **Small Ruminant Research**, dez. 2013.
- AMARANTE, A. F. T. do. **Os parasitas de ovinos**. Editora UNESP Digital. 2015.
- AMARANTE, A. F. T. do; AMARANTE, M. R. V. Breeding sheep for resistance to nematode infections. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 2, n. 3, p. 147–161, 2003.
- AMARANTE, A. F. T. do; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. a; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1–2, p. 91–106, 26 fev. 2004.
- BALIC, A.; BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. **Advances in parasitology**, v. 45, n. 6, p. 181–241, jan. 2000.
- BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T. do; ROCHA, R. a; CABRAL FILHO, S. L.; HUNTLEY, J. F.; HOUDIJK, J. G. M.; ABDALLA, A. L.; GENNARI, S. M. 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, 25 nov. 2005.
- CARDIA, D. F. F.; ROCHA-OLIVEIRA, R. A.; TSUNEMI, M. H.; AMARANTE, A. F. T. do. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to

- artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 248–58, 15 dez. 2011.
- CARVALHO, N.; NEVES, J. H. Das; NAZATO, C.; LOUVANDINI, H.; AMARANTE, A. F. T. do. The effects of Diet and corticosteroid-induced immune suppression during infection by *Haemonchus contortus* in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 214, n. 3–4, p. 289–294, dez. 2015.
- COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition – parasite interaction. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 187–204, 1999.
- COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 7, p. 325–330, jul. 2001.
- COYNE, M. J.; SMITH, G.; JOHNSTONE, C. A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. **International Journal for Parasitology**, v. 21, n. 7, p. 847–53, nov. 1991.
- DATTA, F. U.; NOLAN, J. V.; ROWE, J. B.; GRAY, G. D. Protein supplementation improves the performance of parasitised sheep fed a straw-based diet. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 1269–1278, ago. 1998.
- FITZPATRICK, J. L. Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 3–4, p. 233–48, 1 ago. 2013.
- GALLI, S. J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 6, p. 478–86, jun. 2008.
- GETACHEW, T.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. **Parasite**, v. 14, n. 1, p. 3–14, 15 mar. 2007.
- GREER, A. W.; HUNTLEY, J. F.; MACKELLAR, A.; MCANULTY, R. W.; JAY, N. P.; GREEN, R. S.; STANKIEWICZ, M.; SYKES, A. R. The effect of corticosteroid treatment on local immune responses, intake and performance in lambs infected with *Teladorsagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 14, p. 1717–28, dez. 2008.
- HOUDIJK, J. G. M.; KYRIAZAKIS, I.; KIDANE, A.; ATHANASIADOU, S. Manipulating small ruminant parasite epidemiology through the combination of nutritional strategies. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1–2, p. 38–50, 4 maio 2012.

- HUNTLEY, J. F.; NEWLANDS, G.; MILLER, H. R. P. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. **Parasite Immunology**, v. 6, n. 4, p. 371–390, 1984.
- JOHNSTON, M. J. G.; MACDONALD, J. a; MCKAY, D. M. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. **Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 125–47, 2009.
- KHAN, F. A.; SAHOO, A.; KARIM, S. A. Moderate and high levels of dietary protein on clinico-biochemical and production responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Small Ruminant Research**, v. 150, p. 52–59, maio 2017.
- KYRIAZAKIS, I.; HOUDIJK, J. Immunonutrition: Nutritional control of parasites. **Small Ruminant Research**, v. 62, n. 1–2, p. 79–82, mar. 2006.
- LOUVANDINI, H.; VELOSO, C. F. M.; PALUDO, G. R.; DELL'PORTO, A.; GENNARI, S. M.; MCMANUS, C. M. Influence of protein supplementation on the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry seasons. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 103–111, 15 abr. 2006.
- MACIEL, W. G.; FELIPPELLI, G.; LOPES, W. D. Z.; TEIXEIRA, W. F. P.; CRUZ, B. C.; SANTOS, T. R.; BUZZULINI, C.; FAVERO, F.; GOMES, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J.; MATOS, L. V. S. Fauna helmintológica de ovinos provenientes da microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 492–497, mar. 2014.
- MEEUSEN, E. N. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3–4, p. 259–73, 1 ago. 1999.
- MEEUSEN, E. N. T.; BALIC, A.; BOWLES, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 108, n. 1–2, p. 121–5, 18 out. 2005.
- MHOMGA, L. I.; NNADI, P. A.; CHIEJINA, S. N.; IDIKA, I. K.; NGONGEH, L. A. Effects of dietary protein supplementation on the performance of West African dwarf (WAD) goats infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 36, n. 6, p. 668–675, 2012.

- MILLER, J. E.; HOROHOV, D. W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. **Journal of animal science**, v. 84 Suppl, p. E124-32, abr. 2006.
- MOLLE, G.; DECANDIA, M.; CABIDDU, a.; LANDAU, S. Y.; CANNAS, a. An update on the nutrition of dairy sheep grazing Mediterranean pastures. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2–3, p. 93–112, jul. 2008.
- NEVES, J. H. Das; CARVALHO, N.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G.; AMARANTE, A. F. T. do. Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: A comparison of different methodologies. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3–4, p. 216–226, 2014.
- ROCHA, R.; AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A. Resistance of Santa Inês and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 14, n. 1, p. 17–20, 2005.
- ROCHA, R. a.; BRESCIANI, K. D. S.; BARROS, T. F. M.; FERNANDES, L. H.; SILVA, M. B.; AMARANTE, A. F. T.. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2–3, p. 135–143, mar. 2008.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. the Eosinophil. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 147–174, 2006.
- ROTHWELL, T. L. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. **International journal for parasitology**, v. 19, n. 2, p. 139–168, 1989.
- ROWE, J. B.; NOLAN, J. V; DE CHANEET, G.; TELENI, E.; HOLMES, P. H. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. **The British journal of nutrition**, v. 59, n. 1, p. 125–39, jan. 1988.
- SADDIQI, H. A.; JABBAR, A.; SARWAR, M.; IQBAL, Z.; MUHAMMAD, G.; NISA, M.; SHAHZAD, A. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. **Parasitology research**, v. 109, n. 6, p. 1483–500, dez. 2011.
- SAHOO, A.; SONAWANE, G. G.; KARIM, S. A.; DHAKAD, S.; PAREEK, A. K. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Livestock Science**, v. 150, n. 1-3, p. 143-151, Dez. 2012.
- TAYLOR, M. A. Parasite control in sheep: A risky business. **Small Ruminant Research**, v. 110, n. 2–3, p. 88–92, mar. 2013.
- TEREFE, G.; LACROUX, C.; PRÉVOT, F.; GRISEZ, C.; BERGEAUD, J. P.; BLEUART, C.; DORCHIES, P.; FOUCRAS, G.; JACQUIET, P. Eosinophils in

Haemonchus contortus-infected resistant and susceptible breeds of sheep: abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 161–4, 28 out. 2009.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; SILVA, M. do C. P. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 41–47, 2004.

VAN HOUTERT, M. F. J.; BARGER, I. a; STEEL, J. W.; WINDON, R. G.; EMERY, D. L. Effects of dietary protein intake on responses of young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 56, n. 1–3, p. 163–80, 1995.

VAN HOUTERT, M. F.; SYKES, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International journal for parasitology**, v. 26, n. 11, p. 1151–67, nov. 1996.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; DA SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHO, L. F. F.; DA COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1–2, p. 209–216, 8 jun. 2012.

WALLACE, D. S.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; FISHWICK, G.; GILL, M.; HOLMES, P. H.; MCKELLAR, Q. a; MURRAY, M.; PARKINS, J. J.; STEAR, M. Influence of soyabean meal supplementation on the resistance of Scottish blackface lambs to haemonchosis. **Research in Veterinary Science**, v. 60, n. 2, p. 138–43, mar. 1996.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M.; **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Nona edição, Guanabara Koogan, 2010.