

**ESTUDO DA INTER-RELAÇÃO PARASITO
HOSPEDEIRO EM BOVINOS INFECTADOS COM
*COOPERIA PUNCTATA***

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO PROTÉICA SOBRE AS
ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS EM BEZERROS COM
INFECÇÃO ÚNICA.**

Ricardo Osorio de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do Título de Mestre em
Parasitologia

São Paulo
2001

Candidato:

Ricardo Osorio de Oliveira

Título da Dissertação:

Estudo da inter-relação parasito
hospedeiro em bovinos infectados com
Cooperia punctata - Efeito da
suplementação protéica sobre as
alterações fisiopatológicas em bezerros
com infecção única.

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da
Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a//,
considerou o candidato:

Aprovado

Reprovado

1) Examinador (a)

2) Examinador (a)

3) Presidente

**ESTUDO DA INTER-RELAÇÃO PARASITO
HOSPEDEIRO EM BOVINOS INFECTADOS COM
*COOPERIA PUNCTATA***

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO PROTÉICA SOBRE AS
ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS EM BEZERROS COM
INFECÇÃO ÚNICA.**

Ricardo Osorio de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do Título de Mestre em
Parasitologia

Área de Concentração
Parasitologia

Orientador
Maria Cecília Reale Vieira Bressan

São Paulo
2001

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Oliveira, Ricardo Osorio de.

Estudo da inter-relação parasita hospedeiro em bovinos infectados com *Cooperia punctata*: efeito da suplementação protéica sobre as alterações fisiopatológicas em bezerros com infecção única / Ricardo Osorio de Oliveira. -- São Paulo, 2000.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Parasitologia.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Linha de pesquisa: Parasitologia veterinária.

Orientador: Vieira Bressan, Maria Cecília Reale.

Versão do título para o inglês: Effect of protein supplementation on the pathophysiology *Cooperia punctata* infection of naive Holstein Friesian calves.

Descritores: 1. *Cooperia punctata* 2. Parasitologia veterinária 3. Nutrição 4. Nematóides 5. Suplementação protéica 6. Bezerros

ICB/SBIB162/2000

“Omni est dubitandum” – Terêncio

De tudo pode-se duvidar.

“Faça com que sua língua adquira o hábito de dizer “eu não sei”, senão serás levado a trilhar caminhos enganosos.” – Talmud

“Si nous ne trouvons pas des choses agréables, nous trouverons du moins des choses nouvelles.” – Voltaire

Se não achamos nada agradável, devemos então tratar de achar coisas novas.

“Nothing is too wonderful to be true, if it be consistent with the laws of nature, and in such things as these, experiment is the best test of such consistence.” – Michael

Faraday

**À D. Maria do Céu Antunes de Freitas, com
muito amor e saudade daquele riso tão
fácil...**

**À meu pai, por ter desde cedo me ensinado a
buscar a sabedoria**

**À minha mãe, por viver todo e cada
ensinamento**

**À Deus por ter dado a todos os que se
dedicam a ciência uma garantia de uma
ocupação interminável.**

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Cecília Reale Vieira Bressan pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Adibe A. Abdalla pelo auxílio nos cálculos do trítio e balanço hídrico

Ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani pelo auxílio nas análises bromatológicas dos alimentos

Ao Prof. Dr. José Luiz Guerra, pelo auxílio na realização dos exames histopatológicos.

Ao Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes pelo auxílio na dosagens bioquímicas

Ao Prof. Dr. Mário Mariano pela leitura dos originais e pelas valiosas sugestões.

A todos do Departamento de Nutrição Animal da ESALQ –USP, em especial ao Prof. Dr. José Simas pela rica discussão e troca de idéias durante nossa convivência. A todo o pessoal que “sofreu o massacre” do curso de Nutrição de Ruminantes comigo, e que também sobreviveram, valeu a companhia e a diversão e as amizades que ficaram...

Ao Lécio, Regina e todos mais do CENA por me receberem, me ensinarem e me ajudarem durante as análises do material contaminado com o trítio.

Ao Lúcio, Vlândia e Bibi, por abrirem sua casa por 3 maravilhosas semanas, me mostrando tudo que Piracicaba tem de bom (viva o Chopp do Paulinho's)!

Ao Daniel (Bodão), pelo trato cuidadoso com os animais

Ao Márcio e Antônio, obrigado pela força!

A Patrícia e Mariana pela valerosíssima ajuda nas toneladas de exames de fezes realizados.

A Médica Veterinária Maria da Conceição, do Instituto Biológico de Pindamonhangaba, por todo o apoio logístico, indispensável para a realização deste trabalho.

A todos da Fazenda Santa Helena, pela calorosa acolhida.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, obrigado por terem sido simplesmente únicos:

Zé, valeu a mão sempre pronta pra ajudar, e o maior desprendimento que eu já vi em colocar seus recursos, sejam eles quais forem, a disposição do grupo todo.

Marcelo e Fernando, dois mafiosos da mais fina estirpe e que conquistaram lugar definitivo no meu coração

Ana, apesar de nossas diferenças, obrigado por tudo, especialmente por essa sinceridade que sempre te acompanha e que nos faz tão bem.

Laudo, presença que sempre levanta todo e qualquer astral!

Adriano, valeu pelo companheirismo forte e sincero, desenvolvido durante o trabalho. Virou amizade das mais profundas. Meu primeiro "orientado": Ensinando, aprendi mais que nunca!

Arnaldo, muito obrigado pela disposição em contar leucócitos as duas da manhã!

A FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado que possibilitou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	5
2.1. <i>Cooperia punctata</i>	6
2.2. Fisiopatologia da infecção por <i>C. punctata</i>	8
2.3. A Interação Parasitismo x Nutrição	9
3. Material e Métodos	14
3.1. Animais	15
3.2. Delineamento Experimental	15
3.3. Galpão Experimental	18
3.4. Infecção	18
3.5. Dietas Experimentais	19
3.6. Técnicas Parasitológicas	21
3.7. Técnicas Histopatológicas	21
3.8. Hematologia	22
3.9. Balanço de Nitrogênio e Estudos com a Água Tritiada	23
3.9.1. Colheita e amostragens de fezes e urina	23
3.9.2. Colheita e amostragem do alimento	24
3.9.3. Análises bromatológicas	24
3.10. Determinação do turnover da Água e da Composição Corporal através do uso de água tritiada	24
3.11. Dosagem de Cálcio e Fósforo séricos	25
3.12. Dosagem de Sódio e Potássio na Saliva	26
3.13. Determinação da Composição da Carcaça dos Animais	26
3.14. Pesagens	28
3.15. Análise Estatística	28
4. Resultados	29
4.1. Sinais Clínicos	28
4.2. Pesagens	34
4.2.1. Peso Vivo	34
4.2.2. Rendimento de Carcaça	38
4.3. Dosagens Bioquímicas	38
4.3.1. Proteínas Séricas Totais	38
4.3.2. Albumina	40
4.3.3. Globulinas Séricas	41
4.3.4. Relação Albumina / Globulina	42

4.4. Cálcio Sérico Total	44
4.5. Cálcio Ósseo	46
4.6. Fósforo Inorgânico	47
4.7. Fósforo Ósseo	48
4.8. Razão Sódio / Potássio Salivar	49
4.9. Hemograma	49
4.9.1. Eritrograma	50
4.9.1.1. Hematócrito	50
4.9.1.2. Hemácias	52
4.9.1.3. Hemoglobina	53
4.9.2. Leucograma	54
4.9.2.1. Leucócitos Totais	54
4.9.2.2. Neutrófilos	55
4.9.2.3. Linfócitos	57
4.9.2.4. Eosinófilos	58
4.9.2.5. Monócitos	60
4.10. Composição Corporal dos Animais Obtida Através do Princípio de Diluição - Estudos com a Água Tritiada	61
4.11. Balanço Hídrico	63
4.12. Análise Bromatológica da Carcaça	64
4.13. Aspectos Nutricionais	66
4.13.1. Digestibilidade da Matéria Seca	66
4.13.2. Balanço de Nitrogênio	67
4.14. Dados Parasitológicos	69
4.14.1. Carga Parasitária	69
4.14.2. Proporção Machos / Fêmeas	70
4.14.3. Comprimento dos Parasitas	71
4.14.4. Contagens de Ovos por Grama de Fezes	72
4.15. Resultados dos Exames Histopatológicos	74
5. Discussão	80
5.1. Sinais Clínicos	81
5.2. Pesagens e Performance	82
5.2.1. Ganho de Peso	82
5.2.2. Rendimento de Carcaça	84
5.2.3. Análises Bromatológicas da Carcaça	86
5.3. Dosagens Bioquímicas	88
5.3.1. Proteínas Séricas	88
5.3.2. Macroelementos	91
5.4. Hemograma	93

5.4.1. Eritrograma	93
5.4.2. Leucograma	94
5.5. Composição Corporal - Estudos com a Água Tritiada	98
5.6. Aspectos Nutricionais	100
5.6.1. Digestibilidade da Matéria Seca	100
5.6.2. Digestibilidade da Proteína Bruta e Balanço de Nitrogênio	102
5.7. Dados Parasitológicos	105
5.7.1. Carga Parasitária	105
5.7.2. Proporção Machos / Fêmeas	107
5.7.3. Comprimento dos Parasitas	108
5.7.4. Contagens de Ovos por Grama de Fezes	108
5.8. Resultados dos Exames Histopatológicos	109
6. Conclusões	112
7. Referências Bibliográficas	116
ABSTRACT	

RESUMO

O estudo dos teores protéicos oferecidos aos animais possui crucial importância, pois estes exercem influência determinante no desenvolvimento da infecção parasitária. Investigou-se o efeito da utilização de dois diferentes teores protéicos (18,5% e 8,6% de PB na MS) sobre as alterações fisiopatológicas desenvolvidas por bezerros primo infectados com o nematóide intestinal *Cooperia punctata*. Objetivando determinar se a suplementação possibilitaria aos animais infectados responderem mais prontamente ao desafio parasitário, realizaram-se estudos de composição corporal, retenção de compostos nitrogenados, acompanhamento clínico completo, avaliação de peso e carcaça, avaliação quantitativa e qualitativa da carga parasitária e exames histopatológicos. Os animais que receberam suplementação apresentaram um quadro clínico menos severo, perderam menos peso, tiveram um maior rendimento de carcaça, apresentaram lesões teciduais mais exuberantes, maiores taxas de excreção urinária de nitrogênio, expulsaram os parasitos para porções distais do trato gastrointestinal e demonstraram uma eficiência de retenção de nitrogênio 3,6 vezes maior que os animais mantidos na dieta basal. Demonstrou-se que a suplementação protéica resultou em efeitos positivos para os animais infectados.

ABSTRACT

The study of protein levels offered to cattle is very important when one aims at nematode control, since they can effectively affect the development of parasitic infection. The effect of two different levels - 18.5% and 8.6% CP on DM basis – on the pathophysiology of *Cooperia punctata* infection on naive calves was examined. Aiming at determine if protein supplementation allow animals to better withstand parasitic challenge, several parameters were evaluated: body composition, nitrogen retention, clinical evolution, weight gain, carcass yield, quantitative and qualitative assessment of parasitic burden and histopathology. Supplemented animal presented a milder clinical signs, lost less weight, had higher carcass yield, greater tecidual lesions, higher urinary nitrogen excretion, expelled parasites to distal parts of gastrointestinal tract and showed a 3.6 greater efficiency for nitrogen retention than animal kept on basal diet. It became clear that protein supplementation resulted in benefits to infected animals.

Introdução

1. Introdução

Dentre os fatores determinantes de prejuízos para a atividade pecuária, as infecções por nematóides gastrointestinais merecem uma posição de destaque. Somente no Brasil, gasta-se com antiparasitários US\$ 180 milhões anuais.

Recentemente, devido à problemas como os da resistência aos agentes anti-helmínticos e a crescente preocupação com resíduos químicos em produtos de origem animal e no ambiente, tem se procurado estratégias de controle baseadas em métodos alternativos.

Tais métodos englobam vacinação, seleção de linhagens resistentes, controle biológico, entre outros. Para o sucesso de diversas destas abordagens, o tratamento nutricional fornecido aos animais apresenta-se como um sério fator limitante. Dentro deste contexto, diversos esforços tem sido dirigidos, no sentido de uma melhor compreensão da interação nutrição x parasitismo, objetivando em última análise, dar suporte a medidas alternativas de controle.

Existe hoje na literatura um consenso quanto ao papel fundamental que os teores protéicos da dieta exercem sobre a capacidade do indivíduo responder mais prontamente as alterações fisiopatológicas determinadas pelo desafio parasitário. Foi demonstrado que teores protéicos elevados não previnem o estabelecimento de uma população de nematóides, mas possibilitam ao hospedeiro a manutenção de um nível de produção relativamente inalterado durante a infecção parasitária. Desta constatação surgiu a diferenciação entre os conceitos de resistência e tolerância (do inglês “resilience”) - a primeira sendo a capacidade de evitar o estabelecimento de uma dada infecção e a última sendo definida como a

maior capacidade do hospedeiro em suportar os efeitos deletérios do parasitismo (VAN HOUTERT & SYKES, 1996; COOP & HOLMES, 1996).

Se levarmos esta informação para a realidade da grande maioria dos rebanhos brasileiros, ou seja se a colocarmos no sistema de produção do Brasil Central, encontraremos uma situação crítica. Neste sistema de criação extensiva, com animais criados em pastos de *Brachiaria* sp., ocorre uma marcante diminuição dos teores protéicos disponíveis durante os meses de maio a setembro, isto é, na estação seca. Enquanto o pasto durante a estação chuvosa apresentaria idealmente cerca de 9-11% de proteína, chegamos a encontrar menos de 5% no auge da seca. É justamente este período que coincide com a época de desmama dos bezerros e o início do pastejo destes animais, e também portanto, com o seu primeiro desafio parasitário.

A questão da utilização de uma suplementação protéica merece atenção especial, quando das infecções por nematóides intestinais, uma vez que estes parasitos danificam o local de absorção das proteínas fornecidas pelo alimento. Efeitos sinérgicos tem sido descritos em infecções concomitantes por nematóides abomasais e intestinais, onde as lesões produzidas por estes últimos provocariam um aumento na severidade do quadro parasitário ao dificultar a reabsorção das proteínas plasmáticas extravasadas em porções anteriores do trato gastrointestinal (TGI) (ARMOUR *et al.*, 1987; PARKINS *et al.*, 1990; VIEIRA-BRESSAN *et al.*, 1995).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se o fornecimento de maiores teores nutricionais de proteína, é capaz de influenciar positivamente o desenvolvimento das alterações fisiopatológicas determinadas em uma primo-infecção por *Cooperia punctata*, uma vez que este parasito determina lesões que, potencialmente, diminuem a absorção e retenção de compostos nitrogenados.

Foram enfocados a gravidade das alterações fisiopatológicas determinadas pelo parasitismo, correlacionando-as com a carga parasitária encontrada e com seus efeitos sobre a ingestão de alimentos, sobre o metabolismo protéico e na composição corporal dos animais. Pretendeu-se estabelecer a validade da utilização ou não da suplementação protéica como medida de auxílio no controle das infecções por helmintos.

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1. *Cooperia punctata*

Diversos autores apontam a *Cooperia punctata* como a espécie de nematóide gastrointestinal de maior prevalência em todo o Brasil, estando presente em 70 a 90% do rebanho nacional (GUIMARÃES *et al.* 1975; BIANCHINI *et al.*, 1990; HONER & VIEIRA-BRESSAN, 1992; LIMA, 1998). Esta posição de destaque deve-se sobretudo a alta resistência apresentada por sua larva de terceiro estágio (L₃) às condições ambientais adversas, aliada ao curto ciclo evolutivo que esta espécie possui.

Os parasitos pertencentes a este gênero localizam-se no intestino delgado de ruminantes, predominantemente no duodeno. A infecção por *Cooperia oncophora*, a espécie de maior prevalência no continente europeu, determina uma enterite catarral, com atrofia e fusão das microvilosidades intestinais, extravasamento de proteínas plasmáticas e diminuição na retenção de nitrogênio pelo animal (ARMOUR *et al.*, 1987). Os sintomas descritos nas infecções por *Cooperia* sp. são: fezes amolecidas e diarreicas, anorexia (ALICATA & LIND, 1961 e BAILEY, 1949); perda de peso e apatia (ALICATA & LIND, 1961); desidratação, inflamação catarral da parede intestinal, emaciação e morte (BAILEY, 1949).

Pouco se sabe sobre a dinâmica do desenvolvimento de *C. punctata*. Cita-se na literatura apenas o local preferencial da infecção como sendo o duodeno, e descrevem-se as lesões características: um exsudato fibrino-necrótico, espessamento da parede intestinal e uma hemorragia petequeal da mucosa local (BAILEY, 1949). VIEIRA-BRESSAN *et al.*(1996) observaram

anorexia, alterações na composição corporal, e redução na retenção de nitrogênio.

Trabalhos iniciais focaram sua atenção em primeiro lugar, na patogenicidade deste parasita, e depois no binômio dose infectante - severidade da sintomatologia clínica. Os sinais classicamente descritos são fezes amolecidas e diarreicas, anorexia (ALICATA & LIND, 1961 e BAILEY, 1949); perda de peso e apatia (ALICATA & LIND, 1961); desidratação, inflamação catarral da parede intestinal, emaciação e morte (BAILEY, 1949).

Seguiram-se então trabalhos com infecções experimentais com *C. pectinata* e *C. oncophora* (KEITH, 1967;HERLICH,1967). Como conclusão os autores colocam que o potencial patogênico dos parasitos pertencentes ao gênero *Cooperia* sp. está diretamente relacionado ao grau de infecção e ao esquema de inoculação.

Estudos posteriores, realizados com a espécie mais prevalente em climas temperado, a *C. oncophora*, comprovam que o estabelecimento, a sintomatologia e distribuição dos parasitos ao longo do TGI são influenciados pelo número de larvas infectantes à que o animal é exposto (COOP *et al.*, 1979) Um número elevado de larvas de uma só vez pode induzir a migração dos parasitos para partes mais distantes do intestino delgado, possivelmente devido ao “efeito crowding” (SATRIJA & NANSEN, 1992).

2.2. Fisiopatologia da infecção por *Cooperia punctata*

Os principais efeitos do parasitismo incluem reduções no ganho de peso, na deposição de tecidos, no desenvolvimento do esqueleto e na produção de um modo geral (SYKES *et al.* 1977; SYKES *et al.* 1979 HOLMES. 1987; PARKINS & HOLMES. 1989; POPPI *et al.* 1990).

Recentemente, o interesse pelos aspectos da fisiopatologia das infecções por nematóides do gênero *Cooperia* sp. vem crescendo, pois até então este era visto como um parasito pouco patogênico, sendo constantemente subestimado em sua importância, o mesmo ocorrendo com as perdas econômicas a ele atribuídas.

ARMOUR *et al.* (1987), em um estudo com bezerros infectados com *Cooperia oncophora*, descreveram em detalhes as alterações patológicas determinadas pela infecção, correlacionando-as com as mudanças no metabolismo do Nitrogênio, no metabolismo protéico, e na performance do animal. Segundo estes autores, os animais parasitados apresentaram perdas de produtividade, sendo que os níveis de infecção utilizados procuraram simular aqueles encontrados naturalmente à campo. Uma significativa redução no peso vivo foi constatada nos grupo infectado, juntamente com reduções na retenção de nitrogênio, ainda que os coeficientes de digestibilidade gerais não tenham sido afetados.

VIEIRA-BRESSAN *et al.* (1996) em estudo inicial, demonstraram alterações no metabolismo da água durante a infecção por *C. punctata*, com significativas diminuições na água corpórea total. Observou-se também alterações no metabolismo do nitrogênio, representada por uma redução na retenção deste elemento pelos animais parasitados. Estes apresentaram ainda um redução no consumo voluntário de alimentos na terceira semana após a infecção. Aqui novamente, a digestibilidade geral da matéria seca

não foi alterada, tendo havido no entanto a já citada redução na retenção de compostos nitrogenados.

Especial atenção vem sendo dada ao papel da *Cooperia* sp. em infecções mistas com nematóides abomasais (como *Haemonchus* sp. e *Ostertagia* sp.), onde foi descrita a ocorrência de um efeito sinérgico. A presença da infecção intestinal faz com que as perdas protéicas determinadas pelas lesões no abomaso sejam ainda mais severas, devido a ineficiência nos mecanismos de reabsorção das proteínas plasmáticas que sofreram extravasamento para a luz do TGI.

VIEIRA-BRESSAN *et al.* (1995) trabalhando com infecção mista por *H. placei* e *C. punctata*, encontraram uma redução nas concentrações de albumina plasmática, que pôde ser classificada como hipoalbuminemia. GENNARI *et al.* (1991) não foram capazes de encontrar semelhante resultado em infecções monoespecíficas por *H. placei*, o que corrobora a tese do efeito sinérgico encontrada em infecções concomitantes por nematóides abomasais e intestinais.

PARKINS *et al.* (1990) trabalhando com infecções mistas por *Ostertagia ostertagi* e *C. oncophora*, relatam que a presença de deste último parasito ao longo do intestino delgado preveniu qualquer reabsorção compensatória da proteínas plasmática extravasadas no abomaso.

2.3. A interação Parasitismo X Nutrição

COOP & HOLMES (1996) consideram a interação parasitismo-nutrição em dois aspectos interrelacionados: a influência do parasitismo sobre o metabolismo do hospedeiro, e o efeito do “status” nutricional deste

sobre sua capacidade de enfrentar as alterações fisiopatológicas decorrentes da infecção, estando aqui incluídos os efeitos sobre a elaboração de uma resposta imune competente.

Estudos utilizando a técnica de “pair-fed controls” tem sido particularmente úteis para o entendimento da importância de alterações na redução da ingestão de alimentos e na eficiência da utilização dos mesmos, bem como do papel de cada um destes fatores na patogenia desenvolvida. Os animais “pair-fed” são aqueles que são mantidos livres de infecção durante o período experimental, recebendo como alimentação apenas as quantidades ingeridas pelos seus pares infectados. Assim podemos “descontar” os efeitos atribuíveis somente a redução no consumo de alimentos que acompanha as infecções por nematóides gastrointestinais.

Tais estudos têm apontado a perda de proteína endógena pelo TGI como um fator determinante da severidade das alterações patológicas apresentadas pelo hospedeiro. Estas perdas são constituídas pelo extravasamento de plasma nas áreas lesadas pelos nematóides, pela descamação do epitélio atingido e pelo aumento na produção de muco (POPPI *et al.* 1986; BOWN *et al.* 1991a). De todas estas fontes responsáveis por perdas protéicas, a única até hoje quantificada foi a que envolve extravasamento de proteínas plasmáticas, e somente para infecções com os parasitas abomasais *Haemonchus* e *Ostertagia* (ABBOTT *et al.*, 1985b; PARKINS & HOLMES, 1989; GENNARI *et al.*, 1991).

Nestas infecções abomasais por nematóides do gênero *Haemonchus* e *Ostertagia*, a maior parte destas perdas é reabsorvida a nível de intestino delgado (ROWE *et al.* 1988). Alguns autores, trabalhando com o nematóide intestinal *Trichostrongylus colubriformis*, encontraram uma maior proporção de proteína extravasada ao longo do trato gastrointestinal (POPPI *et al.* 1981; BOWN *et al.* 1984; KYRIAZAKIS *et al.* 1996b). Este achado traz a necessidade de novos estudos, a fim de verificar se este aumento nas

perdas protéicas também ocorre com outros nematóides intestinais, entre eles a *Cooperia punctata*.

O principal sítio envolvido na reabsorção de proteínas por ruminantes parasitados por nematóides gastrointestinais, é a região do íleo (POPPI *et al.* 1986; KIMAMBO *et al.* 1988; ROWE *et al.* 1988). Contudo a eficiência energética deste processo é baixa, envolvendo um alto custo energético para o hospedeiro, como demonstraram os estudos com animais “pair fed” de SYKES & COOP (1976), SYKES *et al.* (1977) e SYKES & COOP (1979).

De um modo geral, pode se concluir que ocorre um deslocamento de proteína das funções do processo produtivo (deposição de músculo, produção de leite e lã) no sentido de reparar as injúrias determinadas pela infecção parasitária, através do reparo da área lesada no TGI e secreção de muco (STEEL *et al.* 1982; BOWN *et al.* 1984; SYMONS. 1985).

Há um consenso, de que a redução no consumo voluntário de alimentos é um dos principais fatores a contribuir para a redução na performance de ruminantes parasitados (SYKES & COOP. 1976; SYMONS & HENESSY. 1981; COOP *et al.* 1982). Até hoje, os mecanismos envolvidos em tal fenômeno são ainda mal compreendidos. Diversas hipóteses têm sido apresentadas na tentativa de lançar luz sobre o assunto, tais como uma redução na disponibilidade de aminoácidos, alterações no fluxo do bolo alimentar e em seu pH, alterações nos níveis de hormônios e peptídeos intestinais, ou ainda efeitos diretos no sistema nervoso central (SNC).

Quanto a redução da ingestão de alimentos em animais parasitados, ABBOTT *et al* (1985a) em um estudo onde foram utilizadas rações que diferiam em seu conteúdo protéico, observaram que as ovelhas apresentaram uma maior recusa de alimento quando submetidas à dieta com baixos níveis de proteína.

Diversos trabalhos investigaram o efeito dos níveis protéicos sobre o estabelecimento das populações de parasitas (BAWDEN. 1969; DOBSON & BAWDEN. 1974; ABBOTT, PARKINS & HOLMES. 1985a; ABBOTT, PARKINS & HOLMES. 1985b ABBOTT, PARKINS & HOLMES. 1986a; ABBOTT, PARKINS & HOLMES. 1986b, GENNARI *et al.* 1995) de diversas espécies. Nestes estudos foram utilizada dietas com o mesmo nível energético, mas que diferiam no conteúdo de proteína. O consenso geral destes autores é o de que o nível protéico não afetou a carga parasitária estabelecida e as contagens de ovos por gramas de fezes (opg). Contudo, as observações destes autores nos levam a concluir que a suplementação protéica apresentou efeitos benéficos sobre a capacidade do hospedeiro em fazer frente as diferentes alterações fisiopatológicas determinadas pela infecção.

HOUTERT *et al.* (1995) relatam que, apesar dos níveis de proteína não influenciarem o estabelecimento dos nematóides, os animais suplementados foram mais eficientes no processo de expulsão dos parasitas estabelecidos. STEAR *et al.* (1995) observaram efeitos da suplementação protéica sobre o tamanho dos parasitas estabelecidos e sobre a fecundidade das fêmeas. Estes parâmetros são indicadores da ocorrência de uma resposta imune.

Trabalhos realizados em área tropicais e subtropicais, mostraram que as mudanças drásticas nas condições nutricionais que normalmente ocorrem durante a estação seca, sobretudo nos teores protéicos das pastagens, se refletem em parasitismo severo, a despeito das baixas cargas de contaminação ambiental encontradas neste período.

ALLONBY (1974), em um trabalho realizado no Quênia, observou casos de haemonchose crônica durante a estação seca e os associou à baixa qualidade da alimentação disponível para os animais.

Estudos preliminares nesta área mostram que animais com infecções estabelecidas quando transferidos para um plano de nutrição superior (especialmente com melhoras no teor protéico) demonstram uma melhora do quadro clínico, uma redução nas contagens fecais e maior resistência à re-infecções (LAURENCE *et al.* 1951; BRUNDSON. 1964).

Novos trabalhos são ainda necessários para uma melhor compreensão do papel dos teores protéicos sobre a capacidade do hospedeiro lidar com o desafio da infecção parasitária, sobretudo com especial atenção para os mecanismos pelos quais o maior aporte nutricional de proteína se reflete em uma maior habilidade, por parte do hospedeiro, em efetuar uma resposta de maior eficiência.

Um melhor entendimento da interação nutrição x parasitismo nas infecções por *Cooperia punctata* se faz necessário, principalmente se consideramos que o sítio da infecção é o mesmo local onde ocorre a absorção protéica, ou seja, o intestino delgado. Seria de extrema importância analisar se níveis maiores de proteína efetivamente auxiliam o animal infectado em compensar as perdas sofridas por extravasamento no TGI, e compreender melhor os mecanismos envolvidos neste processo.

Assim, foi nosso objetivo estudar os efeitos da suplementação protéica sobre as alterações fisiopatológicas em bezerros infectados com *Cooperia punctata*.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 20 bezerros machos da raça Holandesa Preta e Branca, com aproximadamente 8 meses de idade, não castrados, e peso vivo médio de 100 kg, criados livres de ecto e endoparasitas desde o nascimento.

Todos os animais eram procedentes da mesma propriedade, situada na município de Caçapava, SP, e submetidos ao mesmo manejo até o início do experimento. Os animais foram mantidos desde a desmama com uma dieta de manutenção constituída de 500 g de ração comercial completa (Terneirina®), 1 kg de feno de capim Coast-cross (*Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*. A alimentação era fornecida duas vezes ao dia, as 9:00 e 16:00 horas.

3.2. Delineamento Experimental

Foram constituídos quatro grupos divididos em blocos casualizados, de acordo com dois tratamentos: o nível protéico e a infecção.

Os animais foram divididos em dois tratamentos nutricionais. Um primeiro grupo recebeu uma suplementação protéica, sendo denominado grupo Suplementado, com 18,5% de proteína bruta na matéria seca. O

outro grupo foi mantido com uma dieta contendo os níveis protéicos suficientes para um ganho de peso modesto (National Research Council, 1988) considerando animais desta idade e categoria, tendo sido denominado grupo Basal, com 8,6% de proteína bruta na matéria seca.

Os animais foram ranqueados por peso, sendo então sorteados entre os diferentes tratamentos: infectado ou não infectado com 150.000 L₃ de *C. punctata*.

A distribuição dos animais nos grupos experimentais foi feita conforme indicado na Tabela 1:

TABELA 1 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais e resumo das atividades desenvolvidas no decorrer do experimento.

Grupo	nº de Animais	Tipo de Dieta	Infecção com <i>C.punctata</i>	Balanco N e de H ₂ O	Sacrifício
Suplementado infectado	5	Suplementação protéica (18,5% de PB)	150.000 L ₃	DAI -5 a DAI 0 e DAI 35 a DAI 40	DAI 50
Basal infectado	5	Nível protéico normal (8,6% de PB)	150.000 L ₃	DAI -5 a DAI 0 e DAI 35 a DAI 40	DAI 50
Suplementado não infectado	5	Suplementação protéica (18,5% de PB)	-	DAI -5 a DAI 0 e DAI 35 a DAI 40	DAI 50
Basal Não infectado	5	Nível protéico normal (8,6% de PB)	-	DAI -5 a DAI 0 e DAI 35 a DAI 40	DAI 50

DAI = Dias Após a Infecção. O sinal de negativo (-) indica dias anteriores à infecção experimental.

Amostras de sangue foram colhidas semanalmente de todos os animais para a realização de hemograma completo. O soro foi separado por centrifugação para a realização posterior de análises bioquímicas. Também semanalmente, foi realizada colheita de fezes para contagem de ovos por grama de fezes (opg) e cultura de larvas das amostras positivas.

Todos os animais eram pesados semanalmente, sempre no mesmo dia e horário, e sempre respeitando um jejum prévio de no mínimo 16 horas. Nos DAI 0, 30 e 41 colheu-se saliva para a dosagem das concentrações de sódio e potássio.

Conforme observa-se na Tabela 1, foram realizadas duas semanas de estudos dos balanços hídrico e de nitrogênio: uma anterior à infecção do DAI -5 ao DAI 0, e outra após a patência do DAI 35 ao DAI 40. O objetivo deste procedimento foi o de utilizar cada animal como seu próprio controle, pois obtivemos valores de diversos parâmetros para os animais livres de parasitas, e posteriormente, novas medições foram realizadas nos mesmos animais, só que agora infectados. Durante estes períodos de estudo, os animais eram transferidos para as gaiolas metabólicas localizadas no mesmo galpão experimental, numa parte reservada para este fim.

Todos os animais foram pesados e abatidos no DAI 50. Necrópsias parasitológicas foram realizadas para o recolhimento da carga parasitária existente na ocasião. Amostras das carcaças foram retiradas de todos os animais da região compreendida entre a 7^a e 10^a costelas, e posteriormente submetidas à análises bromatológicas para determinação da constituição corporal dos animais. Fragmentos das diferentes porções do intestino delgado (ID) foram colhidos, fixados para posterior análise histopatológica.

3.3. Galpão Experimental

O experimento foi realizado em um galpão com 4 divisões especialmente preparadas para este fim. Os animais foram mantidos em piso cimentado lavado duas vezes ao dia, sendo realizada a desinfecção diária com hipoclorito de sódio à 1%. Os animais eram mantidos presos aos cochos no momento da alimentação (sistema “tie-stall”) de modo a possibilitar o fornecimento individual de alimento, bem como controlar os níveis de consumo.

Durante os períodos de balanço hídrico e de nitrogênio, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais adequadas para estudos metabólicos, que permitiam o controle diário do fornecimento e consumo de alimentos e água, e possibilitavam a medição da excreção total de fezes e urina, bem como a colheita de amostras.

3.4. Infecção

A cepa de *C. punctata* utilizada foi isolada em 1987 pelo Laboratório de Helmintologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do ICB-USP, a partir de animais naturalmente infectados.

Neste experimento, as larvas infectantes de terceiro estágio (L₃) foram obtidas a partir das fezes de um animal doador com infecção monoespecífica de *C. punctata*. Estas foram estocadas à temperatura ambiente e utilizadas, no máximo, ao décimo dia após sua retirada das coproculturas. Os inóculos foram preparados no dia anterior à infecção. Doses individuais de 150.000 L₃ foram preparadas e acondicionadas em

tubos com 20 ml de água destilada. Os animais receberam o inóculo por via oral, tendo-se o cuidado de instilar pequenos volumes de água destilada na cavidade bucal após a aplicação da dose para assegurar a deglutição da mesma.

3.5. Dietas Experimentais

Um mês antes do início do experimento, a dieta de manutenção foi substituída pelas dietas experimentais. A composição dos alimentos oferecidos foi determinada em análises realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do CENA, USP, e no Laboratório de Doenças Nutricionais do Departamento de Clínica Médica da FMVZ, USP. Os animais do grupo Suplementado receberam uma dieta com alto conteúdo protéico (18,5% de proteína bruta na matéria seca), proporcionado pela adição de farelo de soja à ração. Os animais do grupo Basal receberam uma ração sem suplementação protéica (8,6% de proteína bruta na matéria seca). Melaço de cana em pó foi adicionado à ração deste grupo a fim de proporcionar a igualdade em termos energéticos com os animais do grupo Suplementado. As Tabelas 2, 3 e 4 descrevem em detalhes as dietas utilizadas.

TABELA 2 – Formulação das dietas oferecidas aos animais experimentais.

Alimento (animal/ dia)	Grupo Suplementado	Grupo Basal
Farelo de soja	600 g	100 g
Melaço de cana	-	500 g
Feno Coast-cross	2.000 g	2.000 g

TABELA 3 - Composição dos alimentos oferecidos aos animais experimentais.

	Feno Coast- cross	Farelo de soja	Melaço de cana
Matéria seca (%)	88,13	90	97,86
Matéria mineral (%)	6,34	6,20	13,98
Proteína bruta (%)	6,3	58,87	6,3
Extrato etéreo (%)	1,80	1,48	0,48
Energia Metabolizável (Mcal/ Kg MS)	2,1	3,3	2,67
Cálcio (%)	0,35	não disponível	Não disponível
Fósforo (%)	0,23	0,68	0,12

TABELA 4 - Composição final das dietas oferecidas diariamente aos animais.

	Grupo Suplementado	Grupo Basal
Matéria seca (g)	2294,54	2338,3
Energia metabolizável (Mcal/ Kg MS)	5,31	5,18
Proteína Bruta (g)	424,66 (18,5% na MS)	200,56 (8,6% na MS)

3.6. Técnicas Parasitológicas

O acompanhamento das contagens de ovos por grama de fezes (o.p.g.) foi realizado semanalmente em todos os animais. Todos os exames de o.p.g. foram realizados de acordo com o Método McMaster modificado (WHITLOCK, 1948).

As necrópsias foram realizadas de acordo com a técnica de RITCHIE *et al* (1966), porém com algumas modificações usualmente utilizadas no Laboratório de Helminologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do ICB-USP. O intestino delgado foi ligado no piloro e na válvula íleo-cecal, e posteriormente dividido em duas porções: um segmento inicial constituído dos três primeiros metros do ID e todo o restante do órgão como segunda porção. Os conteúdos obtidos na abertura e na lavagem da mucosa intestinal foram homogeneizados, retirando-se duas amostras de 10% do volume total, destinadas à contagem, classificação segundo sexo e estágio evolutivo, e mensuração dos nematóides. Fixou-se as amostras com formol a 10%. Destas alíquotas, realizou-se a contagem dos nematóides encontrados em 10% da amostra, perfazendo assim a contagem de 1% do conteúdo total. Cada segmento do ID teve então a mucosa raspada e colocada em banho-maria a 42°C, para a obtenção das formas imaturas.

3.7. Técnicas Histopatológicas

Secções circulares de cerca de 1 cm de comprimento foram retiradas antes da abertura do intestino. Amostraram-se tecidos do duodeno (a cerca de 15 cm do piloro) e porção média do jejuno. Os segmentos foram abertos, lavados com PBS e fixados em formalina à 10% para posterior preparo dos cortes histológicos. Foi feita a inclusão do material em parafina, e

posteriormente preparação de lâminas com cortes de 5 µm de espessura, que foram coradas pelo método da hematoxilina – eosina.

3.8. Hematologia

Semanalmente, foi realizada colheita de 2 amostras de sangue - com e sem EDTA (sal disódico a 10%) - através de punção da veia jugular utilizando-se o sistema Vacutainer.

Com a amostra de sangue com EDTA realizou-se hemograma completo: contagem de hemácias e leucócitos, dosagem da concentração de hemoglobina pelo método de cianometahemoglobina, determinação do volume globular pelo método do microhematócrito, dosagem de proteínas plasmáticas através do uso de um refratômetro e contagem diferencial de leucócitos pelo método do esfregaço sangüíneo corado segundo metodologia usualmente empregada.

A partir das amostras de sangue colhidas sem EDTA, o soro foi recuperado por centrifugação e estocado a –20°C em duas alíquotas, para as posteriores dosagens das proteínas totais, albumina e globulinas, cálcio sérico total e fósforo inorgânico.

3.9. Balanço de Nitrogênio e Estudos com Água Tritiada

O balanço hídrico e de nitrogênio foi realizado em duas diferentes ocasiões: antes e após a infecção experimental. Os períodos de estudo foram de DAI -5 a DAI 0 e de DAI 35 a DAI 40. Os animais foram transferidos para as gaiolas metabólicas após um jejum de 16 horas, quando então recebiam a injeção intravenosa contendo água tritiada. O alimento e a água foram restaurados 6 horas após a injeção.

3.9.1. Colheita e amostragens de fezes e urina

A colheita destes materiais foi realizada duas vezes ao dia, sempre antes do fornecimento da alimentação. Durante os períodos de estudo, sacolas coletoras foram colocadas nos animais experimentais para a colheita das fezes totais. A massa fecal total foi anotada, e uma amostra correspondente à 10% do peso total foi colhida após devida homogeneização.

A urina foi recolhida das bandejas das gaiolas metabólicas e uma alíquota correspondente a 5% do volume total foi depositada numa garrafa plástica identificada, perfazendo uma amostra única da urina de cada bezerro durante todos os dias de observações. Ácido sulfúrico 0,2 M, em um volume de cerca de 10% do total esperado de produção de urina, era adicionado às bandejas a fim de prevenir perdas de nitrogênio por volatilização da amônia.

Todos os pesos e volumes foram registrados em todas as colheitas, e as amostras colhidas foram mantidas a - 20 °C até o momento das análises.

3.9.2. Colheita e amostragem do alimento

Colheu-se amostras de feno e concentrado (50g de cada) a cada oferta de alimento aos animais, as quais, foram reunidas formando um “pool” representativo dos alimentos oferecidos aos bezerros durante os 5 dias de cada fase de estudos de metabolismo.

3.9.3. Análises bromatológicas

Estas análises foram realizadas com os alimentos, fezes e urina para o estudo do balanço de nitrogênio. Consistiram na determinação da matéria seca a 60 e a 100 °C, da matéria mineral, cálcio, fósforo e na determinação da porcentagem de nitrogênio feita diretamente através da dosagem total pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1970).

3.10. Determinação do “turnover” da Água e da Composição Corporal através do uso de água tritiada

A quantidade de água tritiada utilizada foi calculada a partir da média do peso dos animais (110 Kg), levando em consideração as recomendações da Agência Internacional de Energia Atômica para estudos de dosagem da água corpórea total em ruminantes, ou seja, 1 Mbq por quilograma de peso vivo (IAEA, 1982).

A solução de água tritiada foi injetada na veia jugular esquerda de cada animal. Após as injeções de trítio foram feitas colheitas de sangue após 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min e 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 e 96 horas, através de punção na veia jugular direita utilizando-se sistema à

vácuo contendo anticoagulante EDTA. Duas amostras de 1 ml de plasma foram transferidas para tubos identificados, aos quais foram adicionados 8 ml de solução cintiladora (PATTERSON & GREENE, 1965). A leitura da atividade das amostras foi realizada em espectrômetro de cintilação.

3.11. Dosagem de cálcio e fósforo séricos

Dosagens de Ca total e do P inorgânico foram realizadas nas amostras de soro colhidas, no Laboratório de Patologia Clínica da FMVZ – UNESP, Botucatu.

Para a dosagem do cálcio total utilizou-se o kit produzido pela ANALISA Diagnóstica, baseado na metodologia da cresolftaleína complexona (púrpura de ftaleína). As leituras foram realizadas no Sistema Bioquímico SB-180 (CELM), que opera por fotometria monocromática, no comprimento de onda de 570 nm.

Para as dosagens de Fósforo inorgânico também foi utilizado um kit produzido pela ANALISA Diagnóstica, baseado na reação do íon fosfato com o molibdato de amônio, formando um complexo que é reduzido em meio alcalino à azul de molibidênio, que pode ser lido no comprimento de onda de 650 nm. Novamente, as leituras foram realizadas no Sistema Bioquímico SB-180 (CELM).

3.12. Dosagem de sódio e potássio na saliva

As dosagens de Na e K na saliva foram feitas em amostras colhidas nos DAI 0, 30 e 41. Para a coleta utilizou-se uma bomba à vácuo, succionando a saliva diretamente da boca do animal, localizando sempre a sonda utilizada em duas regiões: embaixo da língua (buscando a glândula sublingual) e atrás do último molar inferior (região da parótida). Este cuidado deveu-se a pequenas diferenças encontradas na concentração da saliva produzida por estas duas glândulas. Metade do material foi coletado em cada um dos pontos citados.

Teve-se o cuidado de manter os animais em jejum prévio de 12 horas para evitar a contaminação das amostras por alimento. Não era realizada a colheita de animais em ruminção. O material colhido foi centrifugado para a remoção de impurezas, e estocado a 4 °C até o momento das análises. As dosagens foram realizadas em um espectrofotômetro de chama (CELM FC-130), calibrado nos seguintes padrões: Na 140 mMol/ l e K 5 mMol/ l. Os resultados apresentados são as médias de três leituras consecutivas.

3.13. Determinação da Composição da Carcaça dos Animais

O método utilizado foi baseado naquele proposto por WALLACE *et al.* (1995) e realizado no Laboratório de Nutrição Animal do CENA, USP. Amostras constituídas da 7^a até a 11^a costela inclusive foram retiradas, sempre da meia carcaça esquerda. As amostras foram envolvidas em sacos de polietileno, identificadas e congeladas para posterior determinação da composição da carcaça, uma vez que esta região é um indicador confiável da composição da carcaça como um todo (KEMPSTER *et al.* 1976). Antes de ser descongelado, separou-se a 9^a costela. Esta foi então moída em sua

totalidade (gordura, músculo e ossos), homogeneizada e liofilizada para determinação da matéria seca. Foram então realizadas ainda as análises de matéria seca a 100 °C, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo.

Por ocasião da análise da composição corporal realizada nas amostras de carcaça colhidas, determinou-se as concentrações deste minerais nos ossos.

Amostras da 9^a costela foram retiradas da amostra originalmente colhida, e picadas em pequenos quadrados de cerca de 1 cm de lado. Removeu-se todo o tecido aderido ao osso, lavou-se o material e pesou-se as amostras em balança analítica. O volume foi então determinado por deslocamento de água em uma proveta de 25 ml com 0,2 ml de precisão.

As amostras foram levadas em cadinho de porcelana para a estufa a 100°C para secagem. Procedeu-se então a extração de gordura por 8 horas para a determinação da porcentagem de extrato etéreo. O material que sobrou foi moído com o auxílio de um pistilo e posteriormente levado à mufla a 600°C para a determinação do teor de matéria mineral. As cinzas foram então digeridas com HCl.

A solução resultante da digestão foi então usada para as determinações de cálcio e fósforo ósseos.

Para a dosagem do fósforo, utilizou-se reação com solução mista de molibdato de amônio a 5% e vanadato de amônio em meio ácido.

O cálcio foi dosado em espectrômetro de absorção e emissão atômicas Parkin-Elmer 306.

3.14. Pesagens

Os animais eram pesados semanalmente, sempre no mesmo dia e horário, respeitando-se um jejum prévio de água e alimentos de 16 horas. Medidas de ganho de peso semanal e total foram realizadas, sendo depois do abate correlacionadas com o peso vivo final e rendimento de carcaça de cada animal.

3.15. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tuckey ao nível de significância de 5%, para comparações múltiplas entre as médias.

Resultados

4. Resultados

4.1 Sinais Clínicos

Os animais pertencentes aos grupos infectados apresentaram sinais clínicos evidentes de cooperiose, com diarreia, inapetência, apatia e perda de peso no decorrer do período experimental.

No 7^o DAI, os animais do grupo Basal infectado começaram a apresentar fezes levemente pastosas, ao passo que as dos animais pertencentes ao grupo Suplementado infectado e grupos controles estavam com consistência normal.

Constatou-se a patência no 12^o DAI. Os animais do grupo Basal infectado apresentavam fezes amolecidas, de consistência menos firme do que no 7^o DAI, e os animais 36 e 38 observou-se diarreia aquosa e fétida. As fezes da maioria dos animais do grupo Suplementado infectado apresentavam consistência amolecida sem serem pastosas, exceção feita ao animal 31, que chegou a apresentar um leve quadro diarreico. As fezes dos animais dos grupos controles estavam com consistência normal.

No 17^o DAI os animais do grupo Basal infectado continuavam a apresentar diarreia. Nos animais 20 e 38 observou-se diarreia aquosa, sendo que o 38 apresentava prostração e mucosas pálidas. O animal 36 recuperou-se da diarreia severa. As fezes dos animais do grupo Suplementado infectado apresentavam consistência amolecida sem serem pastosas. As fezes dos animais dos grupos controles estavam com consistência normal.

No período imediatamente após a patência, a diferença entre os dois grupos infectados (Suplementado e Basal) era visível. Os animais do grupo Basal infectado apresentavam um vazio do flanco mais pronunciado, menor elasticidade da pele ao exame clínico (demonstrando assim um quadro de desidratação), e o aspecto do pelo era quebradiço, menos brilhante e eriçado, quando comparados com os animais do grupo Suplementado.

A evolução da consistência fecal dos animais infectados durante a fase aguda da cooperiose, isto é, do 12^o ao 24^o DAI, está representada na Tabela 5.

TABELA 5 – Consistência fecal dos animais infectados com *C. punctata*, no período compreendido entre o 7^o e 29^o DAI.

Grupo	Animais	Dias Após a Infecção (DAI)								
		7	12	13	14	17	19	24	26	29
Suplementado	25	normal	normal	normal	normal	normal	diarreica	normal	pastosa	pastosa
	29	normal	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	normal	normal	pastosa
	31	normal	diarreica	diarreica	diarreica	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	normal
	34	normal	normal	normal	normal	normal	pastosa	pastosa	normal	pastosa
	40	normal	normal	normal	normal	normal	pastosa	diarreica	pastosa	normal
Basal	20	normal	pastosa	pastosa	pastosa	diarreica	pastosa	pastosa	pastosa	normal
	24	normal	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	normal	normal
	27	normal	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	normal	pastosa	normal
	36	normal	diarreica	diarreica	diarreica	pastosa	diarreica	diarreica	pastosa	pastosa
	38	normal	diarreica	diarreica	diarreica	diarreica	diarreica	pastosa	pastosa	pastosa

As Figuras de 1 a 4 demonstram a diferença no aspecto geral dos animais pertencentes aos dois grupos infectados.



FIGURA 1 – Bezerro pertencente ao grupo Basal infectado. Fotografia feita no 20º DAI. (animal 27)



FIGURA 2 – Bezerro pertencente ao grupo Basal infectado. Fotografia feita no 20º DAI. (animal 36)



FIGURA 3 – Bezerro pertencente ao grupo Suplementado infectado. Fotografia feita no 20^o DAI. (animal 31)

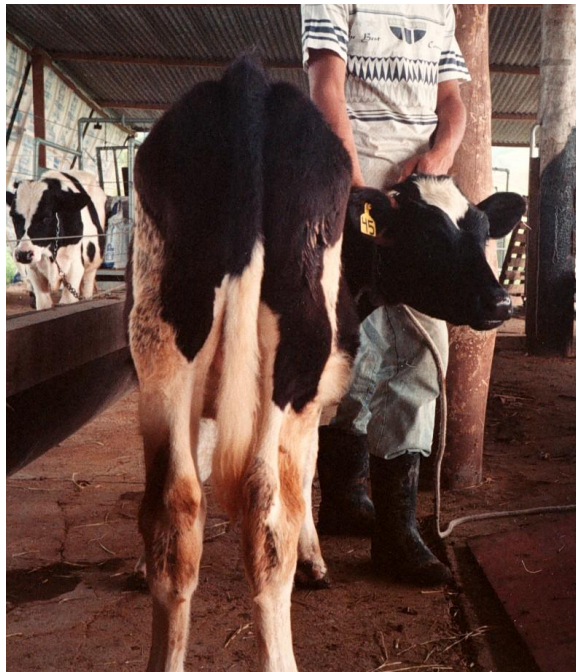


FIGURA 4 – Bezerro pertencente ao grupo Suplementado controle. Fotografia feita no 20^o DAI. (animal 45)

No 33^o DAI, o animal 38, pertencente ao grupo Basal infectado veio a óbito em decorrência do parasitismo. Este animal já vinha apresentando apatia e inapetência desde o 17^o DAI, e morreu após dois dias de intensa prostração e anorexia.

Durante a segunda fase de estudos metabólicos (35^o ao 40^o DAI) alguns animais pertencentes ao grupo Basal infectado apresentaram inapetência e prostração, ao passo que os integrantes do grupo Suplementado infectado mantiveram um apetite normal. Já na fase de estudos pré-infecção, esta tendência já havia sido observada, porém em intensidade muito menor.

Ao exame antemortem, notou-se uma tendência de igualdade entre os grupos, sendo que a maioria dos animais apresentava pelo sem brilho quebradiço, e em animais de ambos os grupos notava-se um edema sub-mandibular discreto.

4.2. Pesagens

Das pesagens semanais e das realizadas por ocasião do abate, extraíram-se dados referentes ao ganho de peso e rendimento de carcaça.

4.2.1. Peso Vivo

A Figura 5 demonstra a evolução do peso vivo dos animais durante todo o período experimental. Ainda que não tenham sido detectadas diferenças significativas entre os grupos no que se refere ao peso vivo final, constatou-se na análise de variância, efeitos de interação entre tempo e infecção ($p=0,0123$), entre tempo e tratamento nutricional ($p=0,005$) e entre esses três fatores ($p=0,0035$).

Pode-se observar uma queda de peso nos animais infectados, por ocasião do 7^o DAI, sendo que o grupo Basal infectado apresentou uma queda mais expressiva.

Dentro dos animais infectados, houve diferença entre os grupos Suplementado e Basal ($p < 0,05$), sendo os animais suplementados os que apresentaram um maior peso vivo. Do mesmo modo, dentro dos animais mantidos na dieta basal, infectados apresentaram um peso significativamente menor que os controles ($p < 0,05$).

No 28^o DAI voltou a ocorrer uma diferença detectável entre os grupos Suplementado e Basal ($p < 0,05$) na comparação dentro do grupo infectado, novamente com os animais suplementados apresentando pesos maiores que os seus pares mantidos na dieta basal.

O ganho de peso foi analisado, considerando tanto o ganho total ocorrido durante o período experimental, como as diferenças obtidas entre as pesagens semanais. No entanto, não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas atribuíveis a efeitos do nível protéico oferecido.

Na análise dos intervalos semanais, houve indicação de significância ($p = 0,0775$) para a interação entre tratamento nutricional e infecção. Um efeito de interação entre o fator tempo e a infecção ($p = 0,01$) foi constatado, bem como entre os três fatores envolvidos - tempo, infecção e tratamento nutricional ($p = 0,0061$).

Já no ganho de peso acumulado durante o período experimental, também foi possível constatar indicação de significância entre os fatores infecção e tratamento nutricional ($p = 0,0775$).

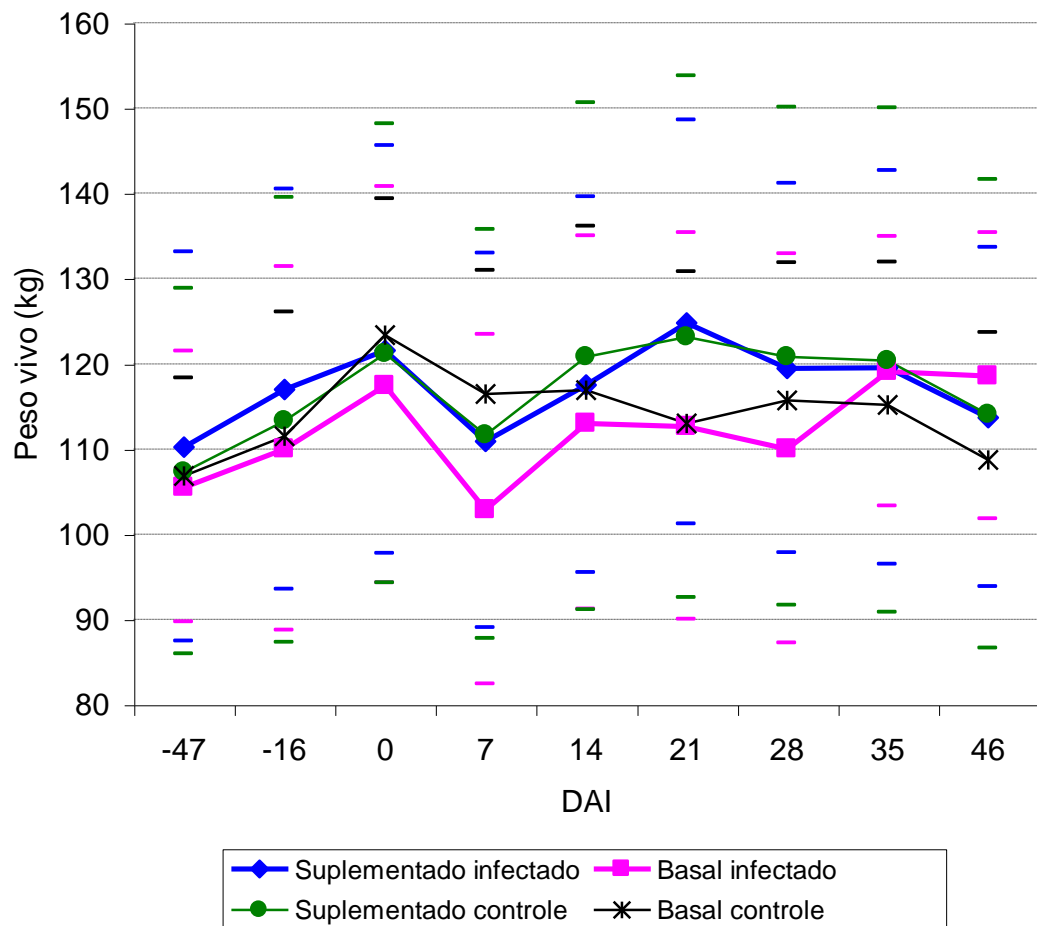


FIGURA 5 - Evolução do peso médio dos animais durante o decorrer do experimento. Os valores apresentados são as médias (em kg) dos grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.2.2. Rendimento de Carcaça

Observou-se diferenças significativas no rendimento de carcaça, tanto entre os grupos infectados x controles como entre os níveis nutricionais utilizados ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados na Figura 6

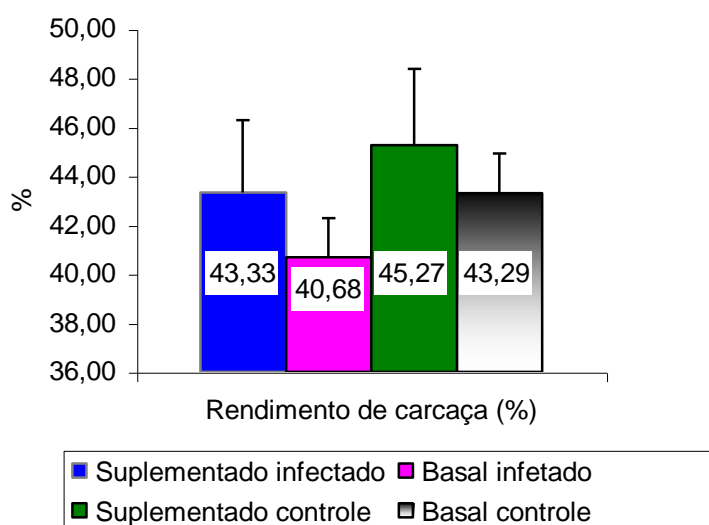


FIGURA 6 - Rendimento de carcaça médio (em %) para os diferentes grupos experimentais. Os traços sobre as barras representam os desvios – padrão para as respectivas seqüências.

4.3. Dosagens bioquímicas

4.3.1. Proteínas Séricas Totais

Os valores médios da concentração de proteínas séricas totais estão representados na Figura 7. Os animais infectados apresentaram valores significativamente menores que os controles ($p = 0,01$), independente do

tratamento nutricional oferecido. Ocorreu um efeito de interação ($p=0,0000$) entre os fatores tempo e infecção.

Observou-se uma expressiva queda dos níveis apresentados pelos animais pertencentes aos grupos infectados por volta do 21º DAI.

Na análise dos dados do 14º e do 21º DAI, encontraram-se diferenças entre controles e infectados em ambos os tratamentos nutricionais. Por ocasião do 28º DAI, esta diferença entre controle e infectados só pode ser constatada nos animais pertencentes ao grupo que recebeu suplementação protéica.

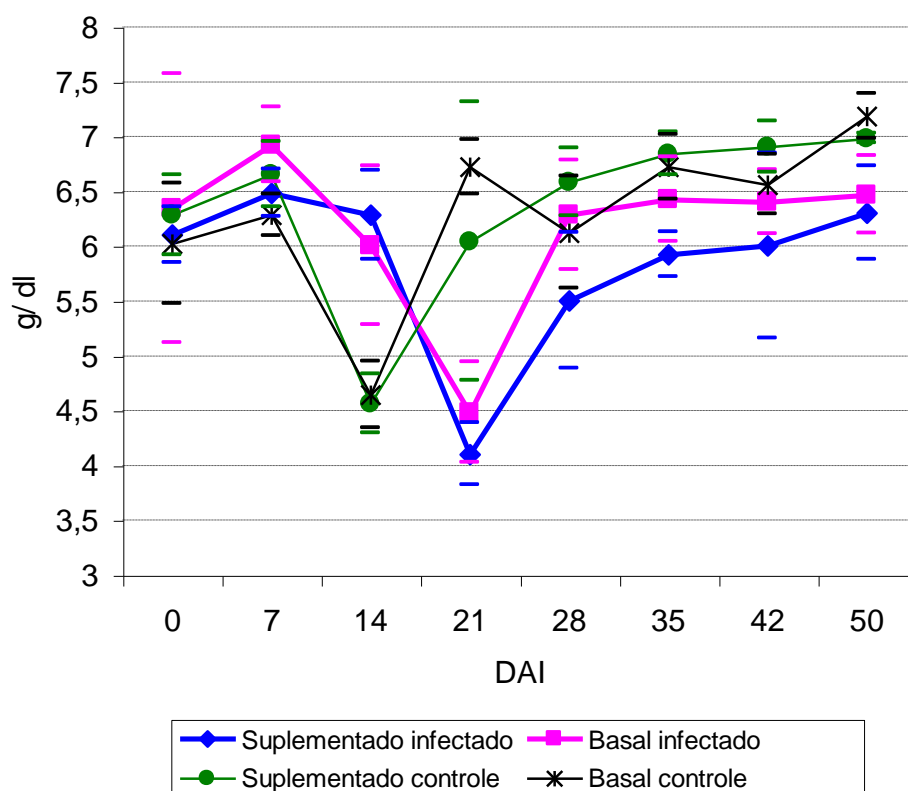


FIGURA 7 – Médias das concentrações de proteínas plasmáticas totais (g/ dl) para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.3.2. Albumina

Na figura 8 estão representadas as concentrações médias de albumina plasmática para os animais dos diferentes grupos experimentais. Chama atenção, novamente a queda apresentada pelos animais infectados por volta do 21^o DAI, sendo que os animais pertencentes ao grupo Basal infectado mostraram os menores valores. É interessante notar também a diferente dinâmica de evolução nos dois grupos infectados.

A diferença observada na concentração plasmática de albumina, na comparação entre controles e infectados foi altamente significativa ($p=0,0000$) na análise de variância, novamente sem influência do tratamento nutricional oferecido. Constatou-se efeito de interação entre os 3 fatores analisados, isto é, infecção, tratamento nutricional e tempo.

No teste de comparações múltiplas, descobriu-se que esta diferença ocorreu nos animais do grupo Suplementado, onde diferenças foram encontradas entre controles e infectados nos 28^o, 35^o, 42^o e 50^o DAI. Já entre os animais mantidos na dieta basal, somente existiu diferença entre controles e infectados no 50^o DAI.

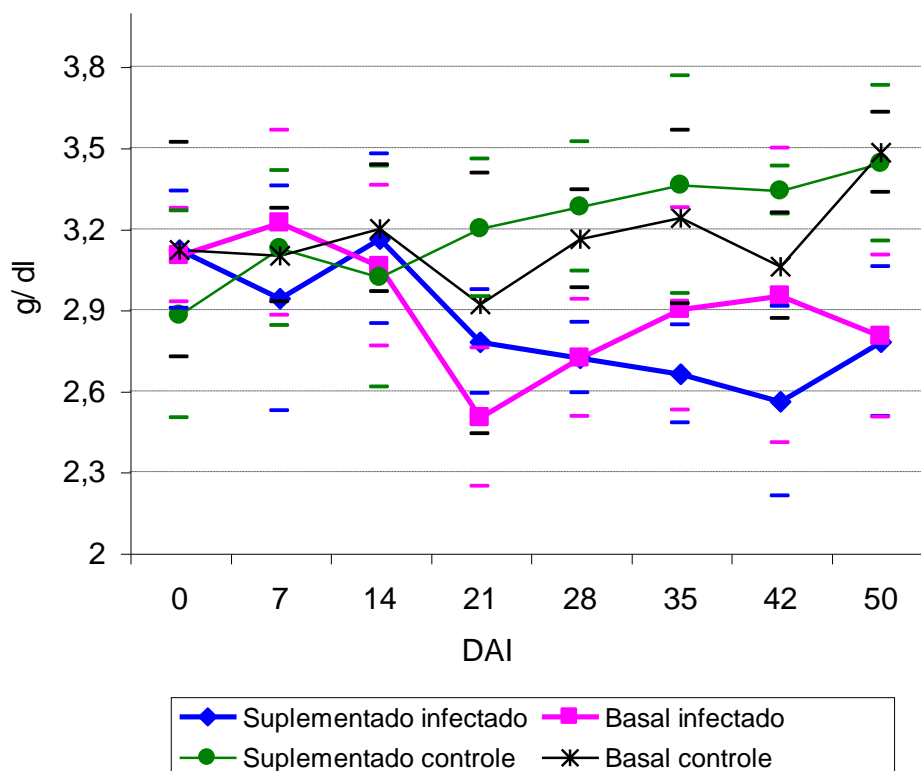


FIGURA 8 – Médias das concentrações de albumina plasmática (g/ dl) para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.3.3. Globulinas séricas

Os valores médios da concentração de globulinas séricas no decorrer do experimento estão representados na Figura 9. Novamente é reproduzida a queda expressiva no 21^o DAI.

Na análise de variância, constatou-se interação entre os fatores tempo e infecção ($p=0,0000$), e entre tempo e tratamento nutricional ($p=0,0053$).

A comparação das médias revelou diferenças entre controles e infectados para ambos os tratamentos nutricionais nos 14^o e 21^o DAI.

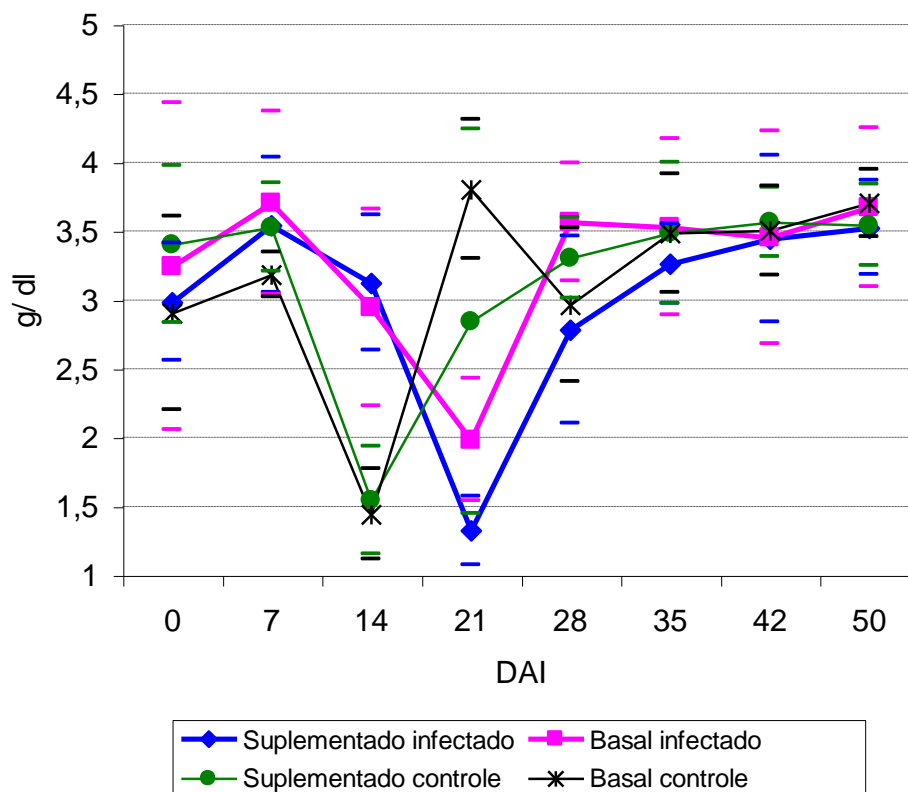


FIGURA 9 – Médias das concentrações de globulina plasmática (g/ dl) para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.3.4. Relação Albumina/ Globulina

Os valores médios da relação entre as concentrações de albumina e globulina séricas estão representados na Figura 10.

Na análise de variância, constatou-se efeito do fator tempo, efeito de interação entre tempo e tratamento nutricional e entre tempo e infecção. Não foram constatadas diferenças entre tratamentos nutricionais ou entre controles e infectados.

No teste de comparações múltiplas, descobriu-se diferença entre controles e infectados nos animais de ambos os tratamentos nutricionais no 14^o e 21^o DAI. Também no 21^o DAI, encontrou-se diferenças entre os tratamentos nutricionais para ambos os grupos controle e infectado.

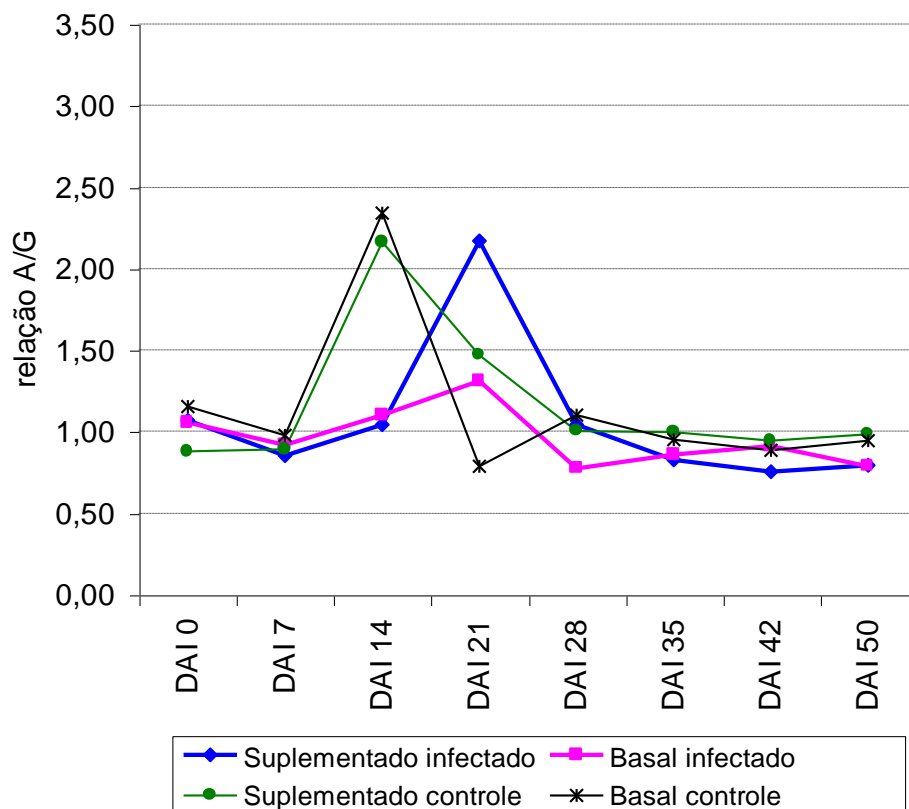


FIGURA 10 – Médias da relação entre as concentrações de albumina e globulina séricas para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.4. Cálcio Sérico Total

A Figura 11 contém os valores médios da concentração plasmáticas de cálcio sérico total. Os grupos infectados só começam a demonstrar comportamento diverso do dos animais controles a partir do 35^o DAI.

Os níveis de cálcio sérico diferiram significativamente na comparação entre controles e infectados ($p < 0,00001$), sem contudo apresentar influência dos teores de proteína oferecidos.

Constatou-se efeito do fator tempo ($p = 0,0000$), e efeito de interação entre tempo e infecção ($p = 0,14$) e entre tempo, infecção e tratamento nutricional ($p < 0,05$).

Foram identificadas diferenças entre controles e infectados para ambos os tratamentos nutricionais nos 35^o e 42^o DAI. No 50^o DAI somente foi possível detectar essa diferença para os animais pertencentes ao grupo que recebeu tratamento Basal em proteína.

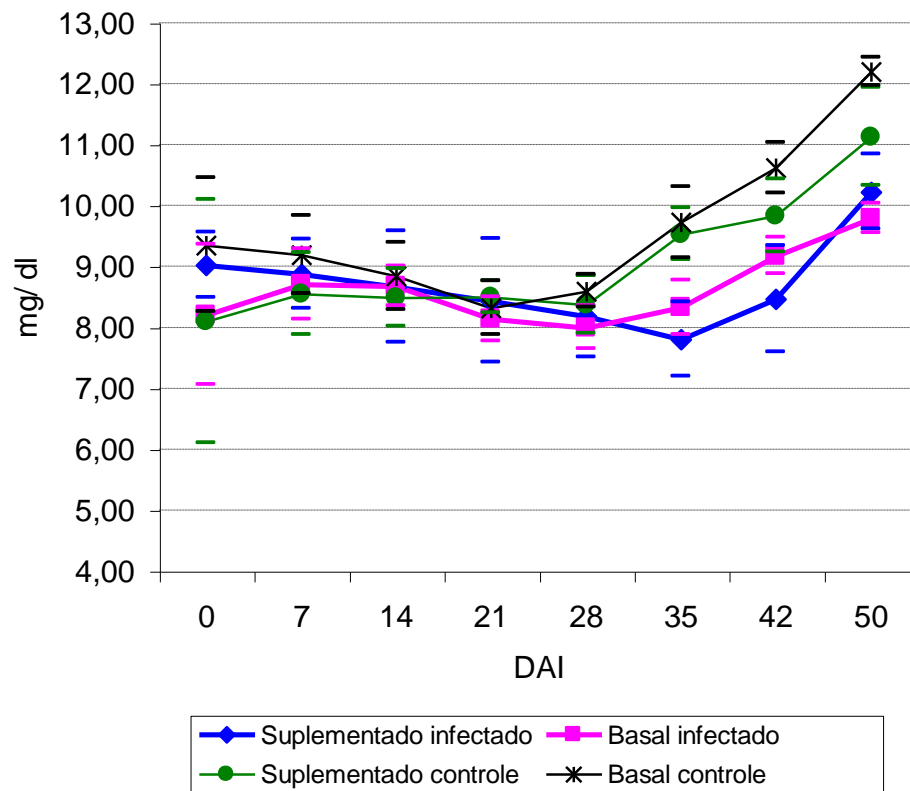


FIGURA 11 – Médias das concentrações de cálcio sérico total (mg/ dl) para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.5. Cálcio Ósseo

Os valores médios das dosagens de Cálcio nas amostras da 9^a costela retirada dos animais experimentais estão representados na figura 12. Não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas.

A determinação da matéria seca e da matéria mineral destas amostras também foram realizadas. Ambas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

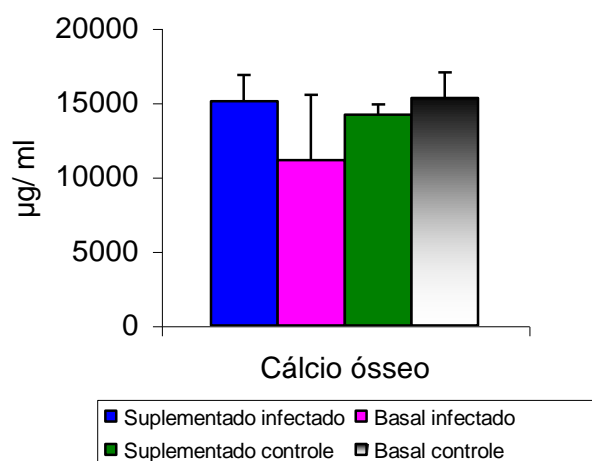


Figura 12 – Médias das concentrações de cálcio nos ossos (µg/ ml) para os diferentes grupos experimentais. Os traços sobre as barras representam os desvios – padrão para as respectivas seqüências.

4.6. Fósforo inorgânico

A Figura 13 demonstra evolução da concentração média de fósforo sérico durante o período experimental. Apesar da grande variação nos dados, foi possível constatar que controles e infectados diferiram significativamente ($p=0,018$). Esta diferença foi identificada como ocorrendo entre controles e infectados dentro do grupo mantido com a dieta Basal.

Na análise de variância, constatou-se também o efeito do tempo, efeito de interação entre tempo e tratamento nutricional, entre tempo e infecção e entre estes três fatores.

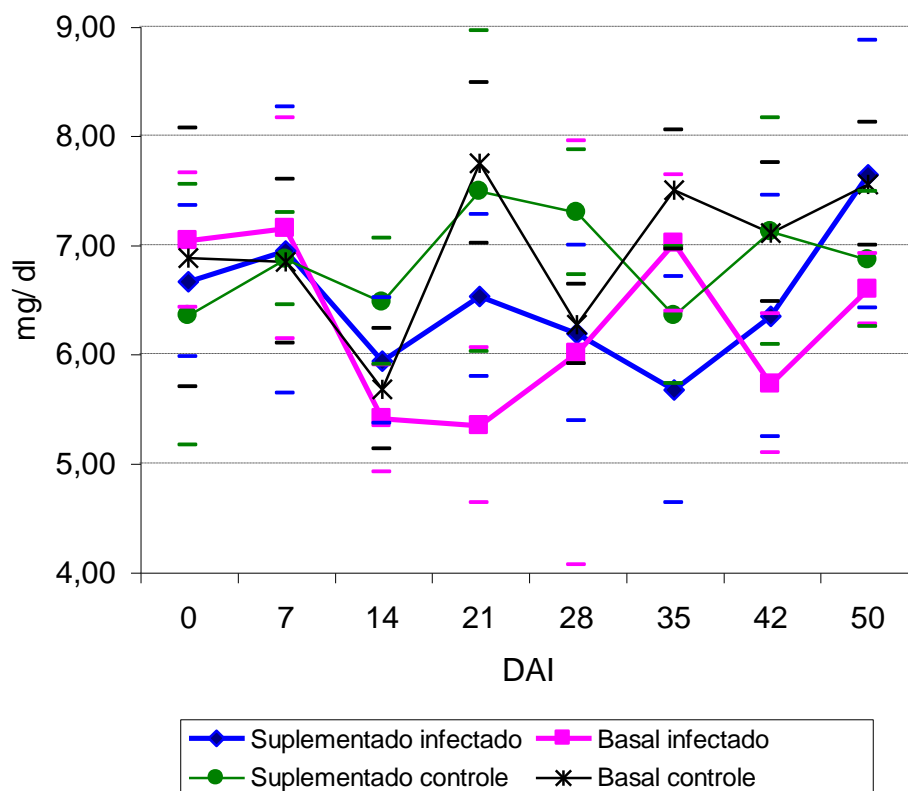


FIGURA 13 – Médias das concentrações de fósforo inorgânico no soro (mg/ dl) para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.7. Fósforo Ósseo

Os valores médios das dosagens de Cálcio nas amostras de costela retiradas dos animais experimentais estão representados na figura 14. Não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas.

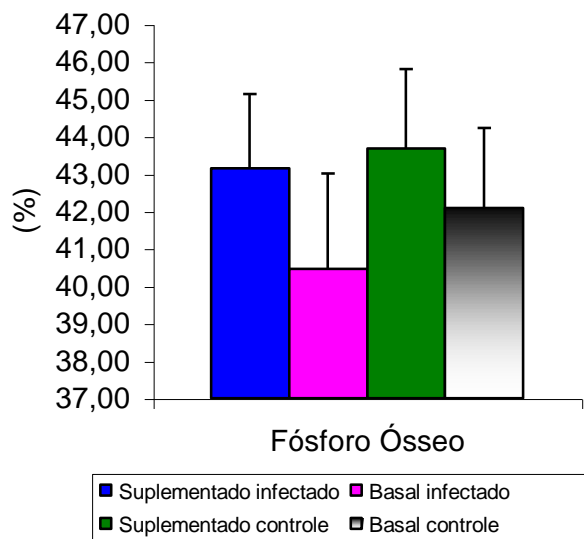


FIGURA 14 – Médias das concentrações de fósforo nos ossos (%) para os diferentes grupos experimentais. Os traços sobre as barras representam os desvios – padrão para as respectivas seqüências.

4.8. Razão Na/ K salivar

Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada para as dosagens de sódio e potássio na saliva.

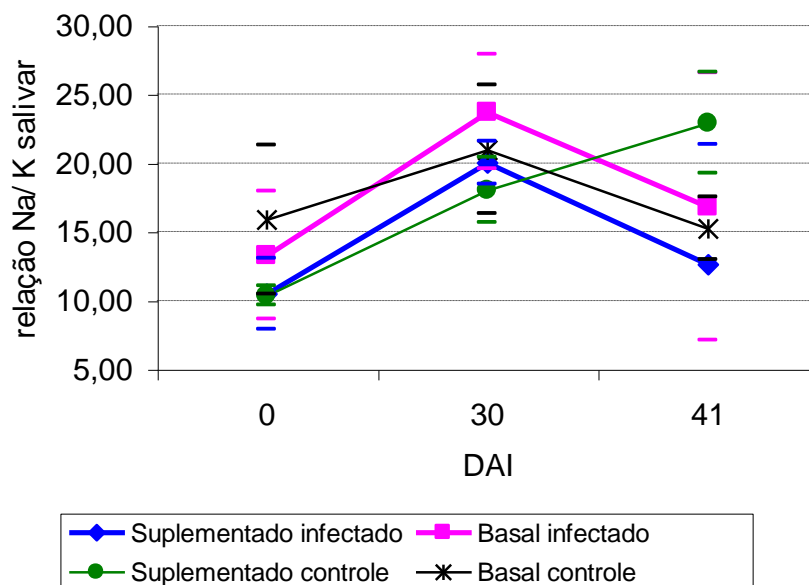


FIGURA 15 – Valores médios da razão Na/ K salivar para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9. Hemograma

Todos os valores de referência utilizados na análise dos resultados do hemograma foram os preconizados por SCHALM (1961) para bezerros de mesma idade dos animais utilizados neste experimento. Consultou-se também os valores descritos por TÁVORA (1997), obtidos em animais criados no estado de São Paulo.

4.9.1. Eritrograma

4.9.1.1 Hematócrito

Os valores médios do hematócrito para todos os animais no decorrer do experimento, estão apresentados na Figura 16. Observou-se uma queda nos valores para ambos os grupos infectados (Suplementado e Basal) do 7^o DAI em diante. Diminuições mais expressivas foram encontradas nos 35^o DAI no grupo Basal infectado e no 46^o DAI para ambos Basal e Suplementado infectados. Os animais dos grupos controle não demonstraram alterações significativas no decorrer do experimento.

Dentro dos grupos mantidos na dieta basal, diferenças entre os animais controle e infectados foram encontradas no 35^o e 46^o DAI. Já para os grupos que receberam suplementação, diferença estatisticamente significativa entre controles e infectados somente ocorreram no 46^o DAI.

Todos os valores encontrados situaram-se dentro da faixa de normalidade (24 a 46 %), a exceção do animal 27, pertencente ao grupo Basal infectado, que nos 21^o, 35^o e 46^o DAI, apresentou valores abaixo da faixa de normalidade (21, 22 e 21%, respectivamente).

No teste de comparações múltiplas de Tuckey ($p < 0,05$), constataram-se diferenças significativas dentro dos grupos infectados na comparação entre suplementado e basal no 35^o DAI.

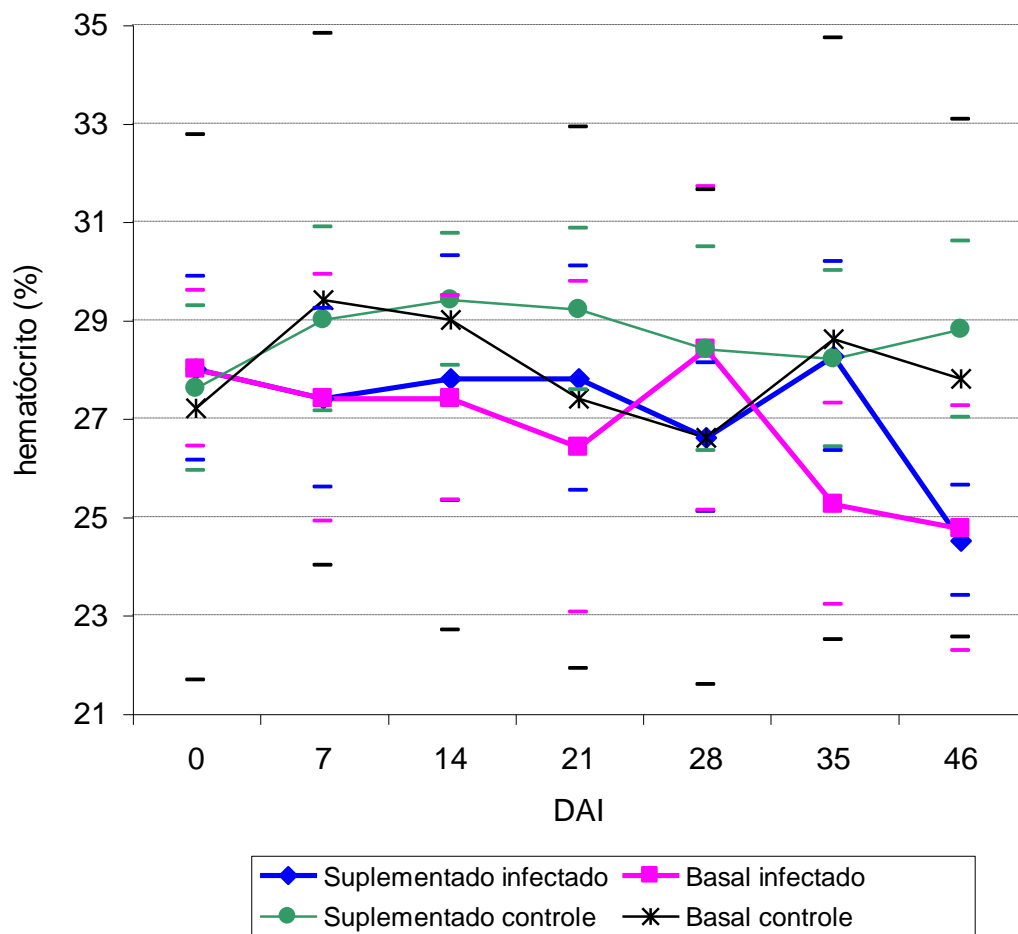


FIGURA 16 – Valores médios do hematócrito do sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9.1.2. Hemácias

As médias das contagens do número de hemácias no sangue circulante dos animais no decorrer do experimento estão apresentados na Figura 17. Não foram encontradas diferenças significativas na análise de variância. Contudo, chama a atenção a queda nas contagens para ambos os grupos infectados (suplementado e basal) no 14^o DAI. Novamente, todos os resultados encontrados situaram-se dentro dos valores normais (5 a 10 milhões de hemácias/ μ l).

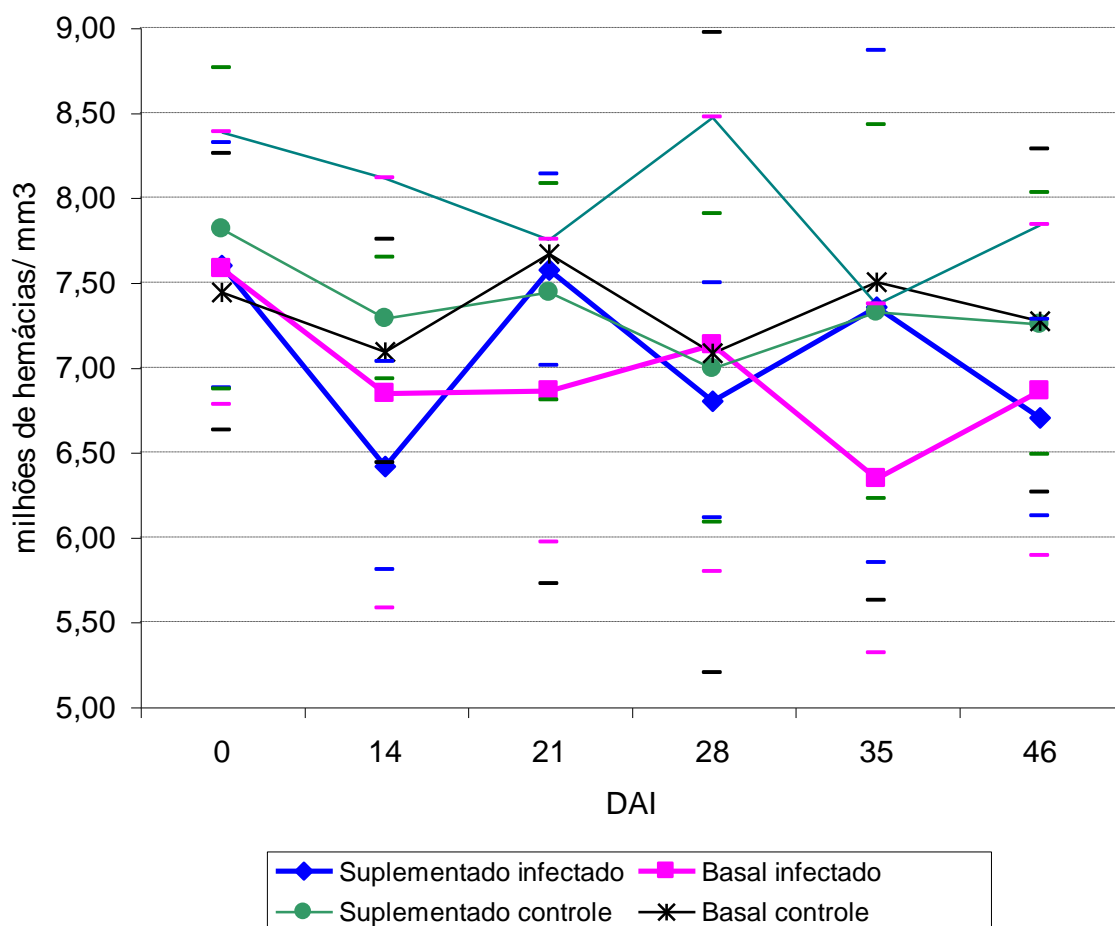


FIGURA 17 – Valores médios do número de hemácias (milhões de hemácias/ μ l) no sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9.1.3. Hemoglobina

As médias das concentrações de hemoglobina obtidas em todo o período experimental estão apresentadas na Figura 18. O comportamento de todos os grupos foi semelhante durante o período analisado, com exceção da queda apresentada pelo grupo Suplementado infectado no 46º DAI, chegando a ultrapassar os limites de referência (8 a 15 g/ dl).

Aqui novamente, o animal 27, pertencente ao grupo Basal infectado, foi o único a apresentar valores constantemente abaixo dos valores de referência. No referido 46º DAI, quase todos os animais de ambos os grupos infectados apresentaram valores abaixo do mínimo considerado como normal.

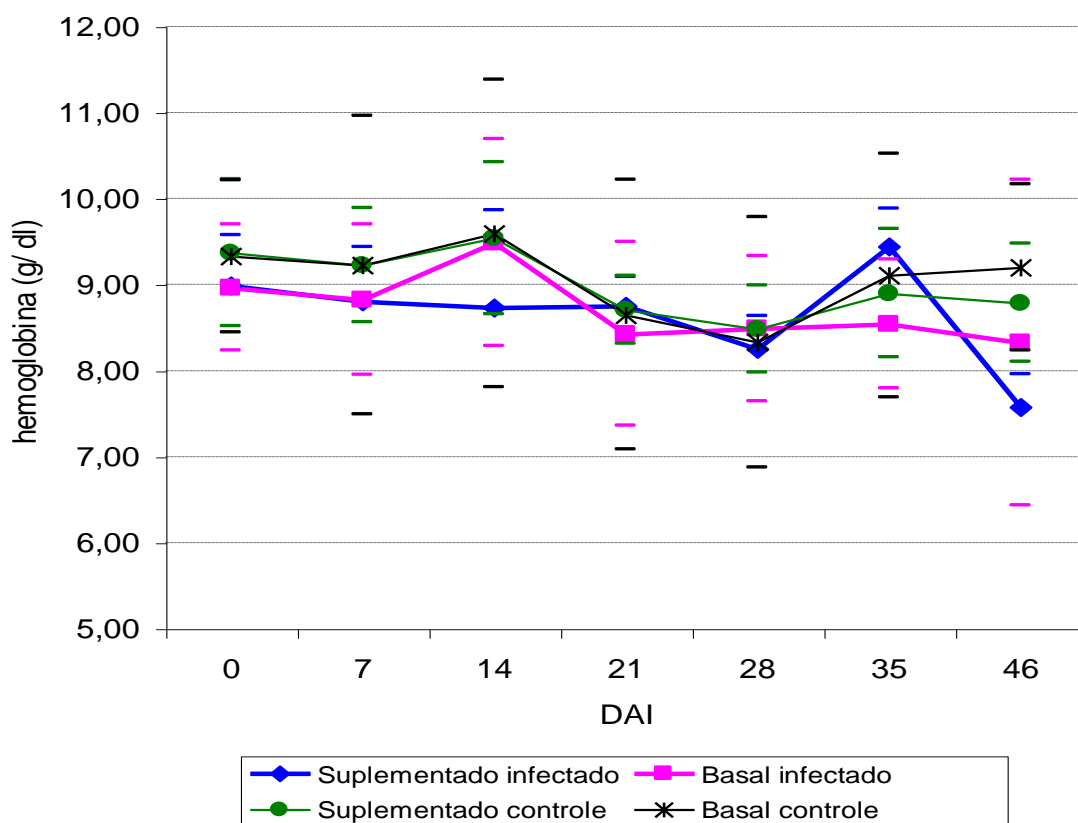


FIGURA 18 – Valores médios da concentração de hemoglobina (g/ dl) no sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9.2. Leucograma

4.9.2.1. Leucócitos totais

Os dados das contagens de leucócitos totais sofreram transformação pela raiz quadrada. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, ainda que uma queda nos valores médios obtidos para ambos os grupos infectados tenha sido observada no 14^o DAI. A maior queda observada foi a da média do grupo basal infectado, conforme pode ser constatado na Figura 19.

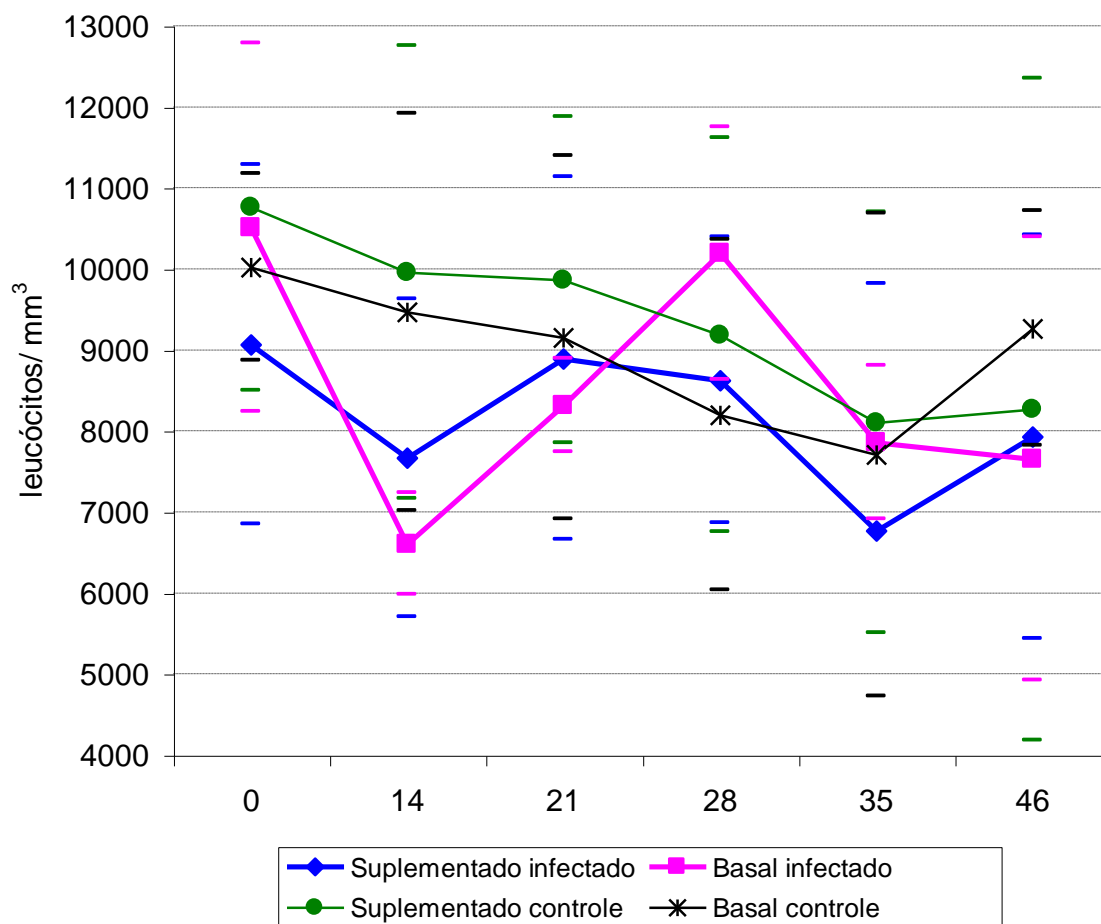


Figura 19 – Valores médios do número total de leucócitos (células/ mm³) no sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9.2.2. Neutrófilos

As médias do número total de neutrófilos no sangue circulante dos animais estão representadas na Figura 20. Observa-se uma queda nas contagens de ambos grupos infectados na comparação com os controles, por ocasião do 14^o DAI.

O animal 27, pertencente ao grupo Basal infectado, comportou-se novamente de maneira particular, tendo apresentado valores fora da normalidade em três das seis coletas realizadas (14^o, 21^o e 46^o DAI).

Para a análise estatística, fez-se necessária a transformação dos dados pela raiz quadrada. Na análise de variância, constatou-se uma interação entre os fatores tempo e infecção ($p=0,0013$). Esta interação foi identificada com sendo dentro grupo basal infectado, onde as contagens do 14^o e 46^o DAI diferiram da realizada no dia da infecção, e as dos 28^o e 46^o DAI diferiram entre si ($p<0,005$).

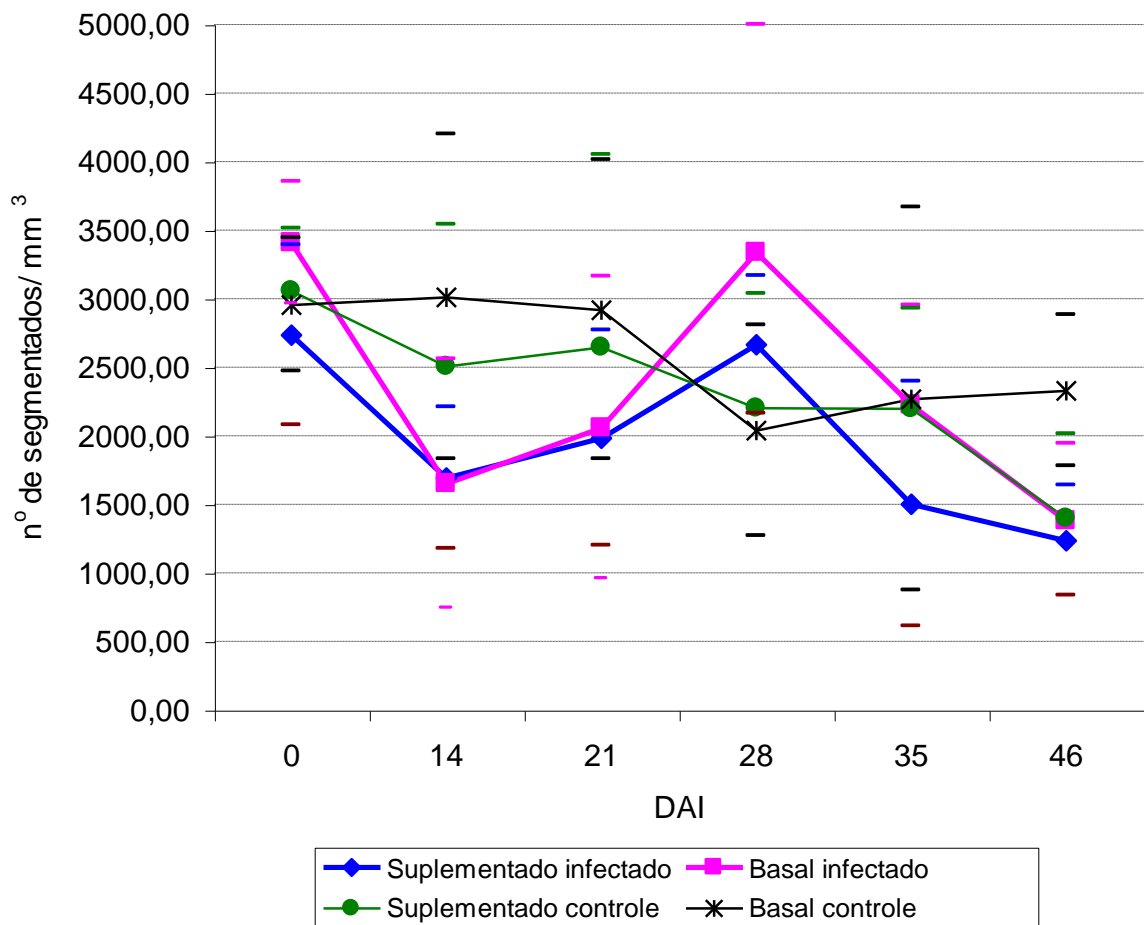


FIGURA 20 – Valores médios do número total de neutrófilos (células/ mm³) no sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9.2.3. Linfócitos

O número médio de linfócitos no sangue circulante dos animais ao decorrer do experimento está representado na Figura 21. Observou-se uma queda no grupo basal infectado, do 14^o ao 21^o DAI, com valores situando-se abaixo da faixa de normalidade (5600 a 8200 células/ mm³).

Os dados foram transformados pela raiz quadrada. Não foram encontradas diferenças significativas.

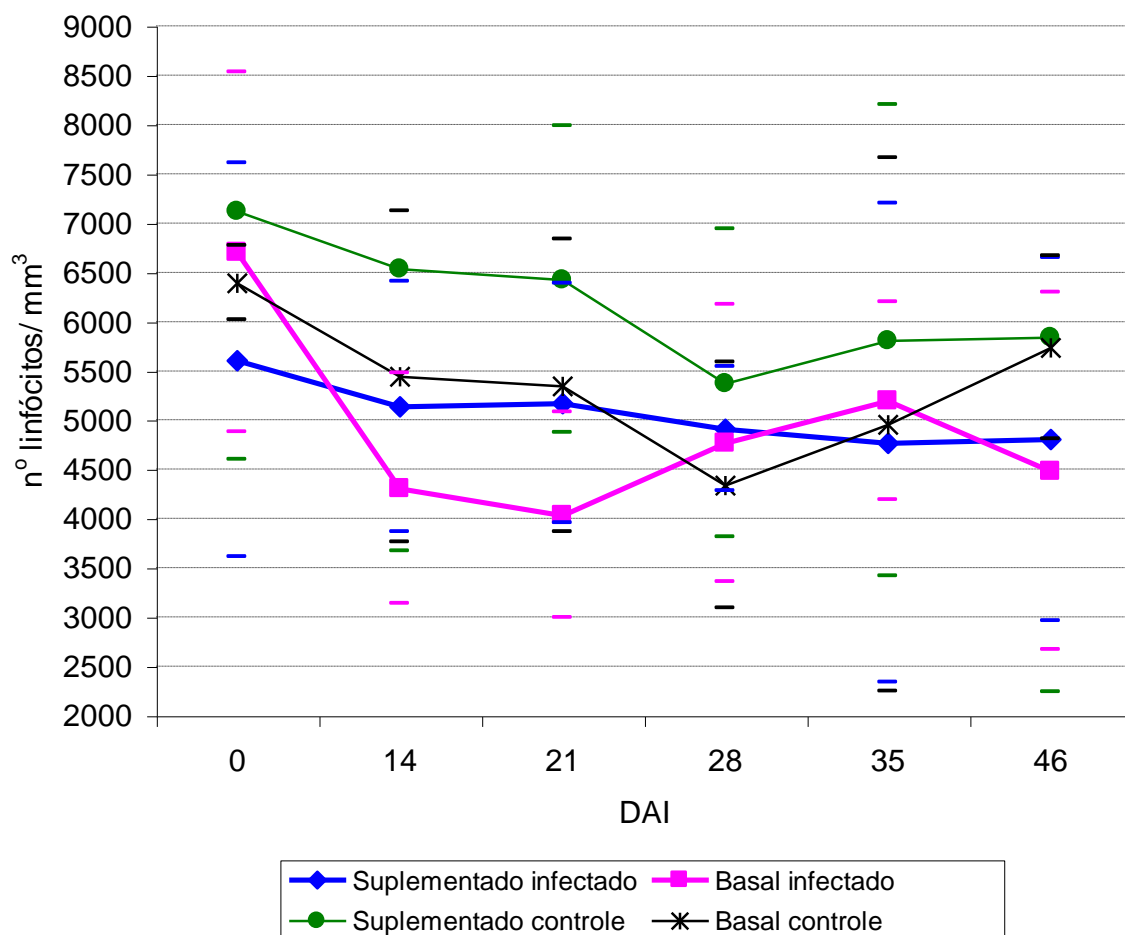


FIGURA 21 – Valores médios do número total de linfócitos (células/ mm³) no sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9.2.4. Eosinófilos

As médias do número de eosinófilos no sangue circulante dos animais está representado na Figura 22. Pode-se observar claramente a ocorrência de um pico nas contagens no 28^o DAI, sendo que os maiores valores pertencem ao grupo Basal infectado.

Mais uma vez, o animal 27, pertencente ao grupo Basal infectado, comportou-se de maneira singular, sendo o único animal a apresentar contagens acima dos valores de referência (220 a 1020 células/ mm³). Contudo, a média do grupo ao qual este animal pertence (Basal infectado), situou-se dentro da normalidade.

Os dados sofreram transformação pela raiz quadrada. Na análise de variância, observou-se diferença significativa ($p=0,05$) na comparação entre controle e infectado. Também constatou-se efeito de interação entre os fatores tempo e infecção ($p=0,039$). No teste de Tuckey, encontrou-se diferença entre controle e infectados dentro dos animais mantidos com a dieta Basal, no momento do pico de contagem (28^o DAI). Da mesma maneira, este foi o único grupo a apresentar diferença entre os dias, sendo a contagem do 28^oDAI significativamente diferente do dia da infecção e do 46^o DAI.

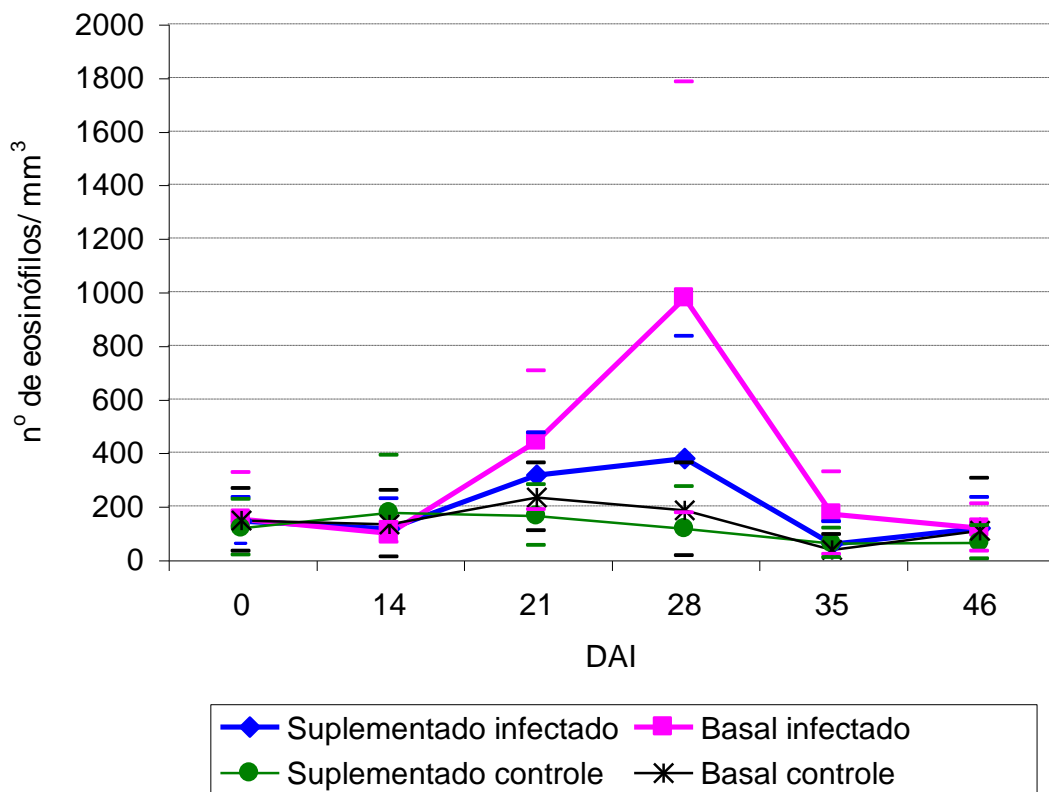


FIGURA 22 – Valores médios do número total de eosinófilos (células/mm³) no sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.9.2.5. Monócitos

Os valores médios das contagens de monócitos no sangue circulante dos animais estão dispostos na Figura 23.

Os dados sofreram transformação pela raiz quadrada. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

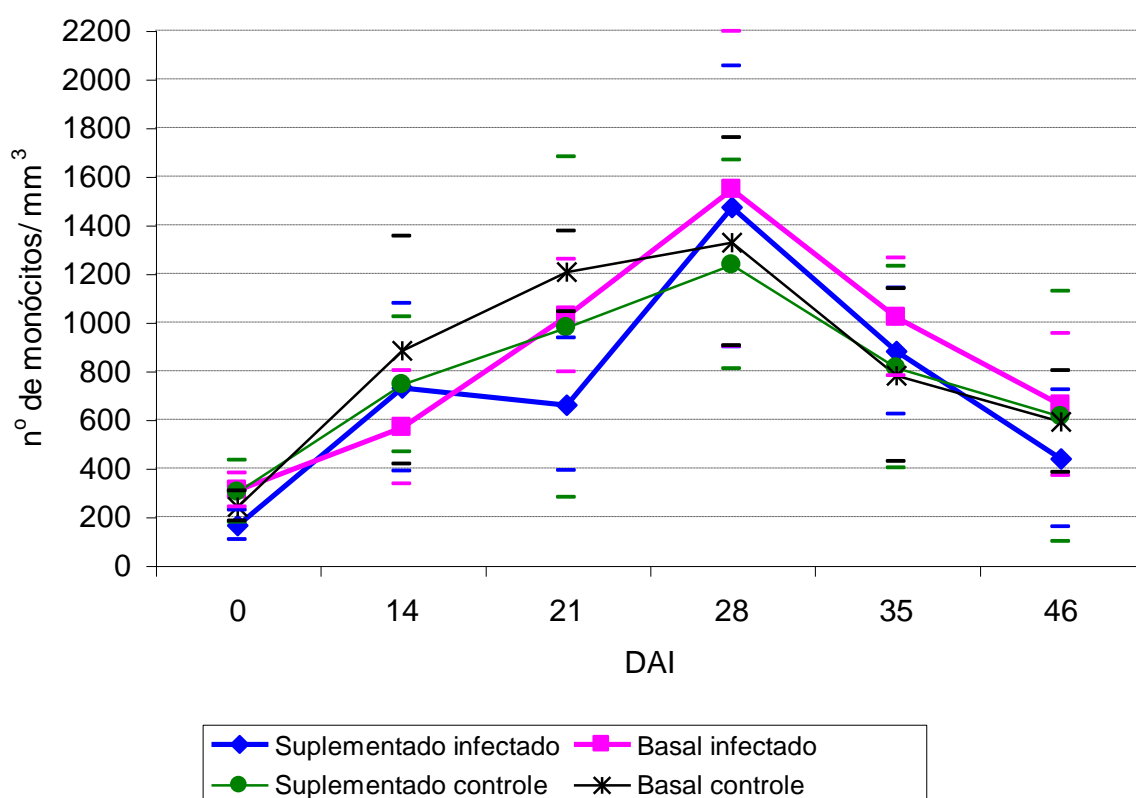


FIGURA 23 – Valores médios do número total de monócitos (células/ mm^3) no sangue circulante para os diferentes grupos experimentais. Os traços representam os desvios – padrão para as seqüências de mesma cor.

4.10. Composição Corporal dos Animais obtida através do Princípio de Diluição - Estudos com Água Tritiada.

Os dados referentes à composição corporal dos animais experimentais e de seu metabolismo hídrico, obtidos pelo método de diluição da água tritiada foram: água corporal total (ACT), porcentagem de gordura, porcentagem de sólidos desengordurados, taxa de turnover da ACT e sua meia vida biológica ($T_{1/2}$). Este parâmetros estão apresentados na Tabela 6.

A análise de variância detectou diferenças estatisticamente significativas nos valores encontrados para a água corporal total entre infectados e controles ($p=0,003$) e efeito de interação entre tratamento e infecção ($p=0,042$). Não foram encontradas alterações que pudessem ser atribuídas aos tratamentos nutricionais oferecidos. No teste de Tuckey, diferenças foram encontradas dentro do grupo mantido na dieta basal na comparação antes x depois ($p<0,05$).

Nos dados referentes a porcentagem de gordura apresentada pelos animais, novamente observou-se diferenças estatisticamente significativas entre infectados e controles ($p=0,003$) e efeito de interação entre tratamento e infecção ($p=0,042$). Também não foram encontradas alterações atribuíveis aos tratamentos nutricionais oferecidos. Na comparação das médias encontrou-se diferenças dentro do grupo mantido na dieta basal na comparação antes x depois ($p<0,05$).

Os resultados para a porcentagem de sólidos desengordurados (que representa a quantidade de proteína presente no organismo, mais as cinzas), o padrão de resposta repetiu-se. Mais uma vez foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre infectados e controles ($p=0,003$) e efeito de interação entre tratamento e infecção ($p=0,042$). A semelhança dos casos anteriores, não foram encontradas alterações

atribuíveis aos tratamentos nutricionais oferecidos. No teste de Tuckey, encontrou-se diferenças dentro do grupo mantido na dieta basal na comparação antes x depois ($p < 0,05$).

A análise de variância realizada nos dados da taxa de turnover da água nos animais experimentais acusou apenas uma indicação de efeito de interação entre infecção e tratamento nutricional oferecido ($p = 0,077$).

Já para os dados referentes à meia vida biológica da água tritiada ($T_{1/2}$), fez-se necessária a transformação logarítmica dos dados. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas na análise de variância na comparação entre infectados e controles ($p = 0,015$) e constatou-se efeito de interação entre infecção e tratamento nutricional ($p = 0,034$). No teste de Tuckey, somente dentro do grupo mantido na dieta basal foram encontradas diferenças ($p < 0,05$) na comparação entre antes e após a infecção.

TABELA 6- Meia Vida Biológica ($T_{1/2}$), Taxa de turnover, Água Corporal Total (ACT) e dados de Composição Corporal em bezerros, antes e após a infecção com *C. punctata*, nos diferentes grupos experimentais. Valores apresentados são as médias seguidos de seus respectivos desvios padrão.

Tratamento/ Fase de Estudo	$T_{1/2}$ (hs)	Turnover ($l\ d^{-1}\ pv^{-1}$)	ACT (%pv)	Gordura (%pv)	Sólidos Desengordurados (%pv)
Suplementado antes da infecção	0,8±0,6	13,58±6,01	44,7±7,8	39,0±10,7	16,4±2,9
Suplementado após a infecção	0,5±0,1	11,63±3,82	35,9±5,5	50,9±7,5	13,1±2,0
Basal antes da infecção	1,2±1,1 ^a	9,8±3,52	52,9±13,7 ^a	26,6±18,7 ^a	20,5±5,0 ^a
Basal após a infecção	0,4±0,1 ^b	14,43±4,36	36,6±13,7 ^b	50,1±18,7 ^b	13,4±5,0 ^b

a,b letras diferentes dentro da mesma coluna indicam significância ($p < 0,05$)

4.11. Balanço Hídrico

Os dados referentes aos cálculos do balanço hídrico nos animais experimentais estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7- Cálculos do balanço hídrico dos animais experimentais antes e após a infecção com *C. punctata*, nos diferentes grupos experimentais. Valores apresentados são as médias seguidos de seus respectivos desvios padrão.

Tratamento/ Fase de Estudo	Ingestão de Água (l d⁻¹)	Excreção de Água (l d⁻¹)	Balanço Hídrico
Suplementado antes da infecção	13,8±1,57	8,61±1,04	5,19±0,99
Suplementado após a infecção	13,2±2,07	8,59±1,49	4,59±1,26
Basal antes da infecção	12,3±0,71	7,87±0,71	4,43±0,42
Basal após a infecção	11,31±2,21	7,07±2,16	4,28±0,67

Na análise estatística não foi possível identificar alterações significativas para os dados acima apresentados.

4.12. Análise Bromatológica da Carça

Os dados referentes às análises bromatológicas realizadas nas amostras retiradas das carças dos animais experimentais (porcentagem de matéria seca, porcentagem de matéria mineral, teores de extrato etéreo e teores de proteína bruta) estão apresentados nas Figuras de 24 a 27. Não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, seja entre infectados e controles, seja entre os níveis nutricionais oferecidos.

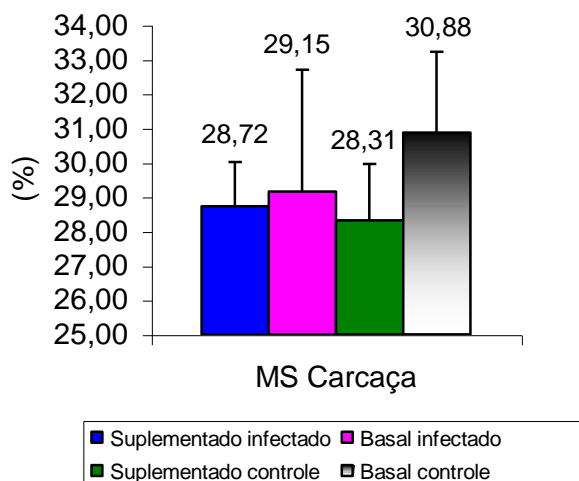


FIGURA 24 – Médias da porcentagem de matéria seca nas amostras retiradas da 9^a costela dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

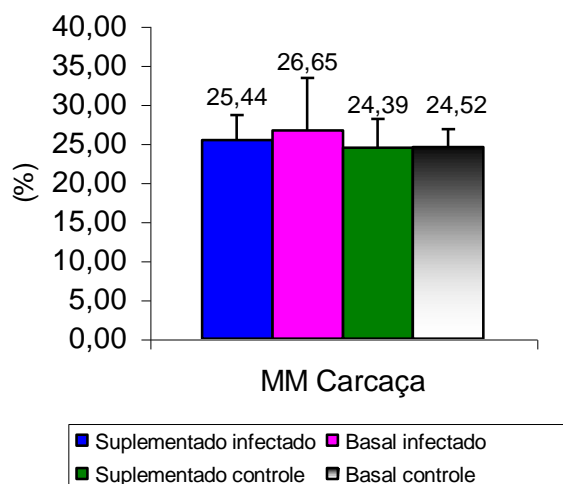


FIGURA 25 – Médias da porcentagem de matéria mineral nas amostras retiradas da 9^a costela dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

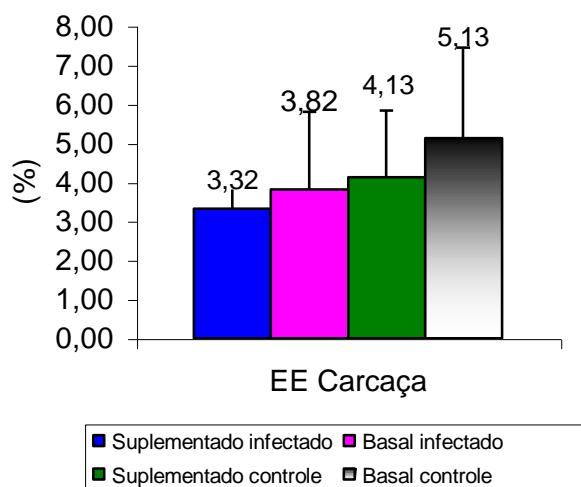


FIGURA 26 – Médias dos teores de extrato etéreo nas amostras retiradas da 9^a costela dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

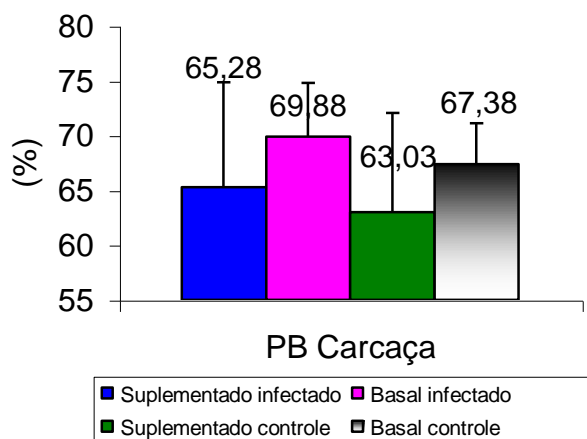


FIGURA 27 – Médias dos teores de proteína bruta nas amostras retiradas da 9^a costela dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

4.13. Aspectos Nutricionais

4.13.1. Digestibilidade da Matéria Seca

Os dados referentes a digestibilidade aparente da matéria seca estão apresentados na Tabela 8. Para a realização das análises estatísticas, os dados foram transformados pelo arcosseno da raiz quadrada.

A análise de variância constatou a ocorrência de uma diminuição na digestibilidade aparente da matéria seca devido a infecção experimental ($p=0,047$). O nível de proteína oferecido influenciou positivamente este parâmetro ($p=0,039$), sem ter sido possível, no entanto, constatar interação entre os fatores infecção x nível de protéico.

Foi encontrada diferença significativa ($p<0,05$) na comparação entre os valores da digestibilidade entre os dois tratamentos nutricionais durante a fase de estudos realizada após a infecção experimental.

TABELA 8- Digestibilidade aparente para matéria seca, antes e após a infecção com *C. punctata*, nos diferentes grupos experimentais. Valores apresentados são as médias seguidas dos respectivos desvios padrão.

Período/ Tratamento	Peso vivo (kg)	Ingestão de Matéria Seca (g kg ⁻¹ d ⁻¹)	Excreção de Matéria Seca (g kg ⁻¹ d ⁻¹)	Digestibilidade de Matéria Seca (%)
Suplementado antes da infecção	121,56 ± 23,91	19,44 ± 1,80	5,42 ± 0,53	72,08 ± 1,64
Suplementado após a infecção	119,48 ± 23,11	19,77 ± 1,85	5,89 ± 0,91	70,16 ± 4,05
Basal antes da infecção	117,44 ± 23,24	18,22 ± 1,43	6,02 ± 0,81	66,95 ± 3,95
Basal após a infecção	119,02 ± 15,81	19,07 ± 1,69	6,53 ± 0,32	65,61 ± 2,45

4.13.2. Balanço de Nitrogênio

Os dados referentes aos estudos do balanço de nitrogênio estão apresentados na Tabela 9.

Observou-se uma redução no balanço de nitrogênio no período de estudos pós infecção, significativa para ambos os tratamentos nutricionais ($p < 0,05$). Nos animais do grupo Suplementado infectado ocorreu um expressivo aumento na excreção urinária de nitrogênio ($p < 0,05$). Ambos os resultados foram obtidos no teste de Tuckey.

Na análise da eficiência de retenção (traduzida na digestibilidade aparente), pode-se observar uma menor diminuição relativa na comparação entre os períodos de estudo, para os animais pertencentes ao grupo suplementado (uma redução 20,09% na média do grupo suplementado contra 71,78% para a média dos animais mantidos na dieta basal).

Na análise dos resultados do teste de Tuckey, pode-se constatar que alterações significativas na comparação entre os resultados obtidos nos períodos de estudo realizados antes e após a infecção experimental, somente foram encontradas para o grupo mantido na dieta Basal.

TABELA 9- Média diária do balanço de Nitrogênio (N) em bezerros, antes e após a infecção com *C. punctata*, nos diferentes grupos experimentais. Valores apresentados são as médias seguidos de seus respectivos desvios padrão.

Período/ Tratamento	Ingestão de Nitrogênio (g d ⁻¹)	Excreção de Nitrogênio (g d ⁻¹)			Balanço de Nitrogênio	Digestibilidade aparente do N (%)
		Fezes	Urina	Total		
Suplementado antes da infecção	55,02±4,18	9,20±1,08	17,76±3,28	26,95±4,13	28,06±2,07	51,17±4,57
Suplementado após a infecção	52,47±3,95	9,25±0,66	21,82±3,23	31,08±3,78	21,39±1,64	40,89±3,64
Basal antes da infecção	22,60±3,08	10,36±0,91	8,51±0,79	17,45±3,34	5,14±1,06	17,93±8,67
Basal após a infecção	20,14±0,82	8,26±4,42	7,78±2,64	19,07±2,12	1,06±1,59	5,42±8,06

4.14. Dados parasitológicos

4.14.1. Carga parasitária

Os dados referentes ao número de parasitos encontrados sofreram transformação pela raiz quadrada. Não foram observadas diferenças significativas entre as cargas parasitárias totais recuperadas dos animais de ambos os grupos infectados.

Observou-se no entanto, uma tendência de maior ocorrência de parasitos na segunda porção do intestino delgado nos animais do grupo Suplementado infectado, na comparação com o grupo Basal infectado. Neste último grupo, apenas o animal 24 apresentou número significativo de parasitas nas porções finais do intestino delgado.

No teste de comparações múltiplas, constatou-se diferença dentro do grupo Basal infectado na comparação entre o número de parasitas estabelecidos nas duas regiões estudadas ($p < 0,05$).

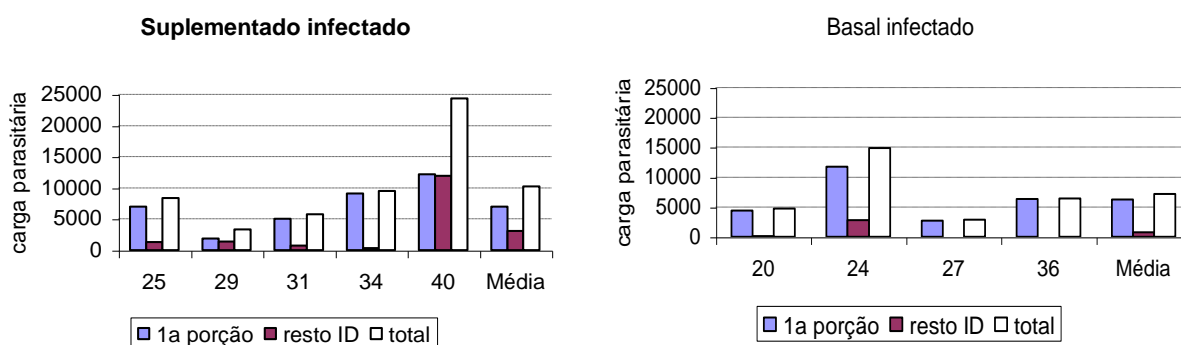


FIGURA 28 - Carga parasitária recuperada do conteúdo do intestino delgado dos animais dos grupos Suplementado infectado e Basal infectado. Dados da primeira porção são referentes ao material coletado nos 3 primeiros metros do intestino delgado.

4.14.2. Proporção Machos/ Fêmeas

Devido a baixa ocorrência de parasitos nas porções finais do intestino delgado dos animais pertencentes ao grupo Basal infectado, onde somente o animal 24 apresentou quantidade significativa de parasitas, os dados referentes a sexagem dos parasitos referem-se à soma do material recolhido em todo o intestino.

Na análise de variância, constatou-se diferença significativa na porcentagem de ocorrência de machos e fêmeas ($p=0,0043$), estando as fêmeas presentes em maior quantidade. Foi também detectado um efeito de interação entre os fatores tratamento nutricional e sexo dos parasitas ($p=0,0292$). Observou-se que essa diferença na proporção macho/ fêmea dentro do grupo Suplementado infectado ($p<0,05$).

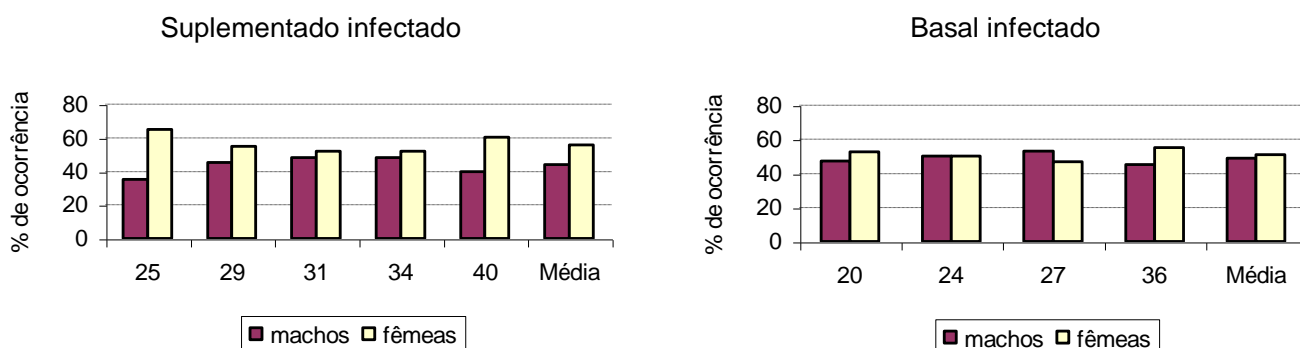


FIGURA 29 - Participação percentual de machos e fêmeas na carga parasitária recuperada do conteúdo total do intestino delgado dos animais dos grupos Suplementado infectado e Basal infectado.

4.14.3. Comprimento dos parasitas

Novamente, devido a baixa ocorrência de parasitos nas porções finais do intestino delgado dos animais pertencentes ao grupo Basal infectado, onde somente o animal 24 apresentou quantidade significativa de parasitas, os dados referentes ao comprimento dos parasitos referem-se somente ao material recolhido na primeira porção do intestino dos animais.

Não foram observadas diferenças quando da mensuração do comprimento dos vermes.

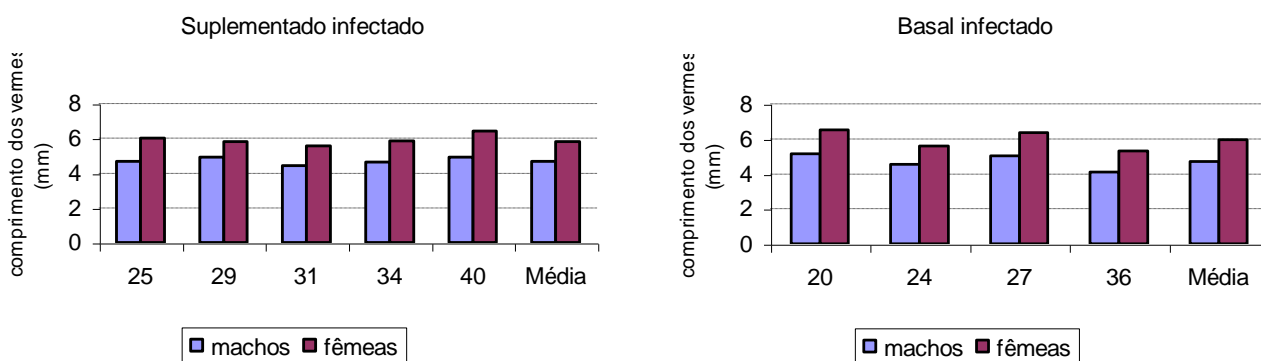


FIGURA 30 - Comprimento médio em milímetros dos parasitos recolhidos à necrópsia dos animais experimentais dos grupos Suplementado infectado e Basal infectado. Dados referentes à porção inicial (primeiros 3 metros) do intestino delgado.

4.14.4. Contagens de Ovos por Grama de Fezes

Os dados das contagens de ovos por grama de fezes foram transformados pelo logaritmo natural de $x+1$. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Contudo, os animais pertencentes ao grupo Basal infectado tenderam à apresentar contagens mais elevadas do que seus pares mantidos em dieta com suplementação protéica.

Em ambos os grupos, um animal praticamente não apresentou ovos nas fezes durante todo o experimento (animais 34 no grupo Suplementado e 36 no grupo Basal). Na média, o comportamento dos animais de ambos os grupos seguiu uma dinâmica semelhante.

O pico de contagem no grupo Basal ocorreu no 14^o DAI, alguns dias antes, se comparado ao pico do grupo Suplementado, que ocorreu no 17^o DAI.

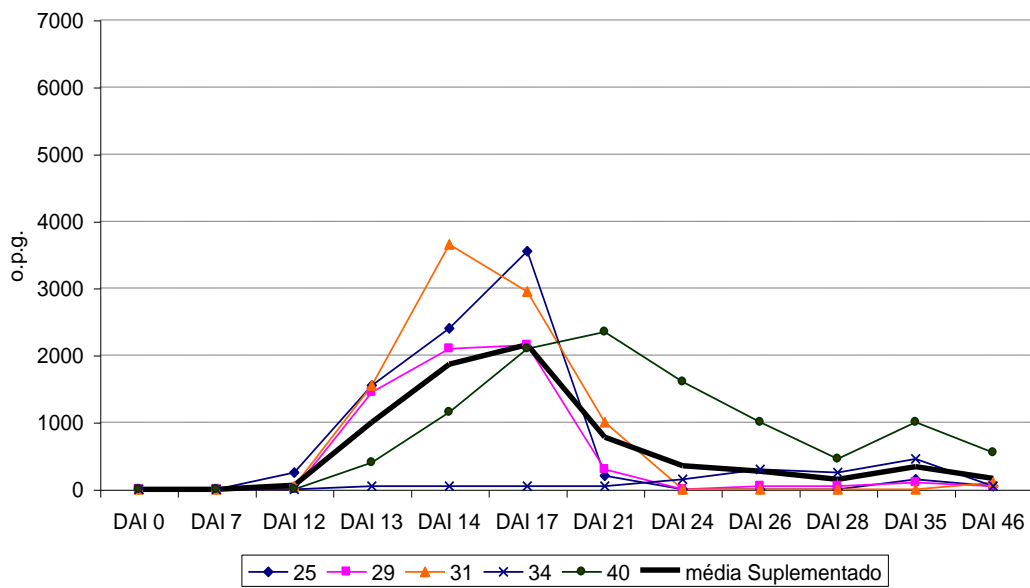


FIGURA 31 – Contagens de ovos por grama de fezes dos animais do grupo Suplementado infectado, durante todo o período experimental.

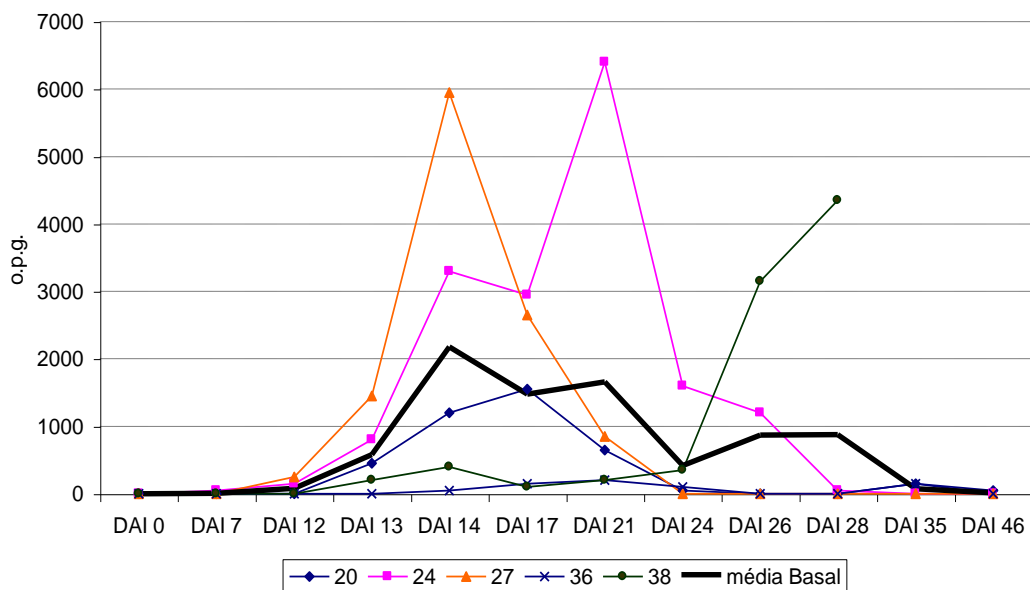


FIGURA 32 – Contagens de ovos por grama de fezes dos animais do grupo Basal infectado, durante todo o período experimental.

4.15. Resultado dos exames Histopatológicos

O material foi examinado em microscópio ótico padrão. Pode-se observar um intenso infiltrado inflamatório misto, predominantemente composto de células monoclueares. Constatou-se a presença de grande número de eosinófilos e plasmócitos. Chamou-nos a atenção também a ausência de mastócitos e neutrófilos, o que nos leva a postular que o fator quimiotático para eosinófilos tenha sido liberado diretamente pelo agente. Não foi possível neste primeiro exame, evidenciar diferenças na intensidade e caracterização do infiltrado inflamatório na comparação entre os tratamentos nutricionais oferecidos. Contudo, áreas consideráveis de necrose na extremidade das vilosidades intestinais foram evidenciadas em todos os animais pertencentes ao grupo Suplementado infectado, sem que no entanto, lesões similares pudessem ser encontradas nos animais do grupo Basal infectado. Nas áreas necróticas puderam ser encontradas células gigantes e multinucleadas.

Somente dois dos dez animais controles não apresentaram infiltrado inflamatório evidente. Os demais, manifestaram um infiltrado de intensidade menor que os animais infectados, e também com uma composição distinta, chamando a atenção o menor número de eosinófilos presentes nos controles. Lembramos que todos os controles permaneceram negativos nos exames de contagem de ovos por grama de fezes no decorrer do período experimental. Contudo, presença de oocistos de *Eimeria* sp. foram encontrados em diversos destes animais, o que provavelmente pode responder pelas alterações encontradas no exame histopatológico.

Apresentamos a seguir uma seleção das fotomicrografias realizadas.

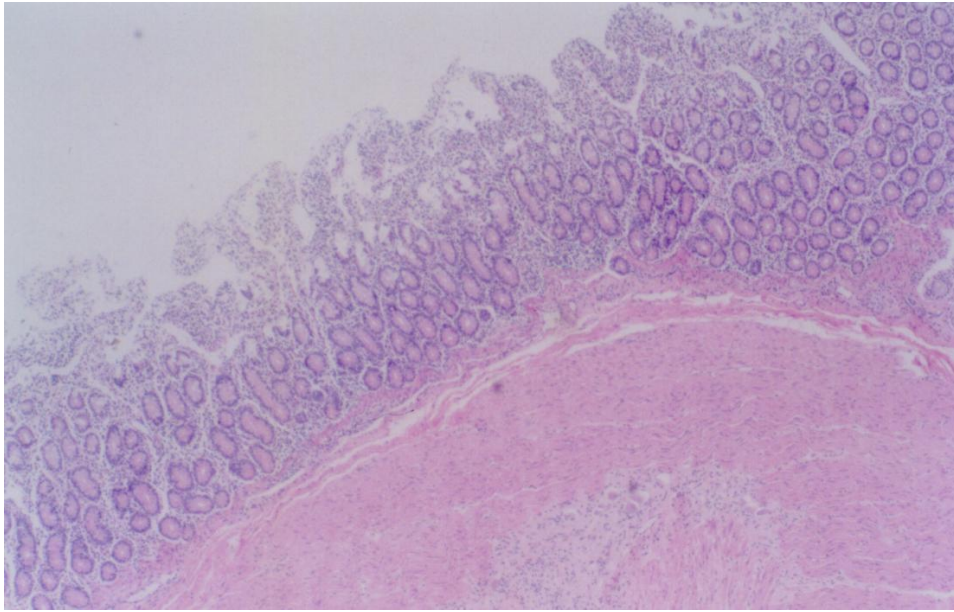


FIGURA 33 - Fotomicrografia de corte histológico da porção inicial de duodeno de bovino infectado com *Cooperia punctata*, pertencente ao grupo suplementado, com 50 dias de evolução, mostrando necrose discreta do ápice das vilosidades e preservação da região das criptas. Coloração: HE. Aumento: 14x.

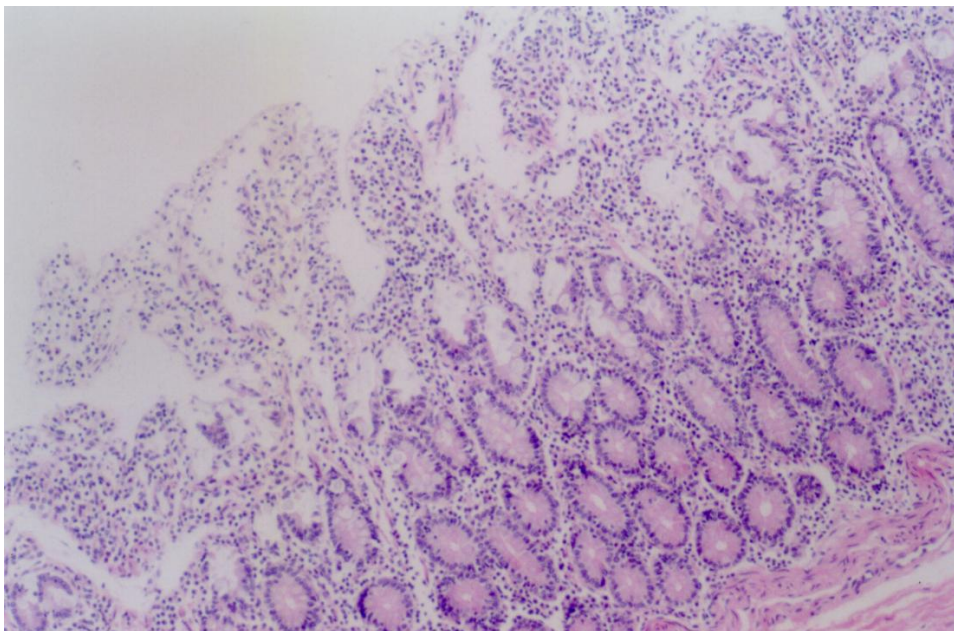


FIGURA 34 – Detalhe da fotomicrografia anterior, evidenciando o desarranjo do ápice das vilosidades, com necrose discreta e infiltrado inflamatório, que se estende das partes mais superficiais às profundas da mucosa. Col. HE. Aumento: 36x.

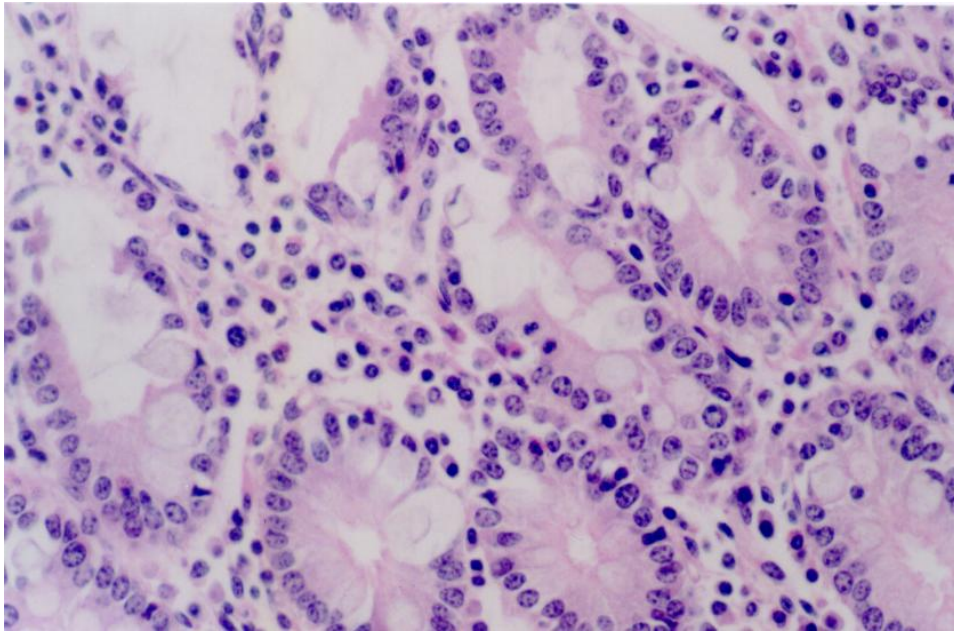


FIGURA 35 - Detalhe da fotomicrografia, anterior evidenciando porções profundas da mucosa, com suas criptas preservadas e com infiltrado inflamatório moderado e misto. Col. HE. Aumento: 140x.

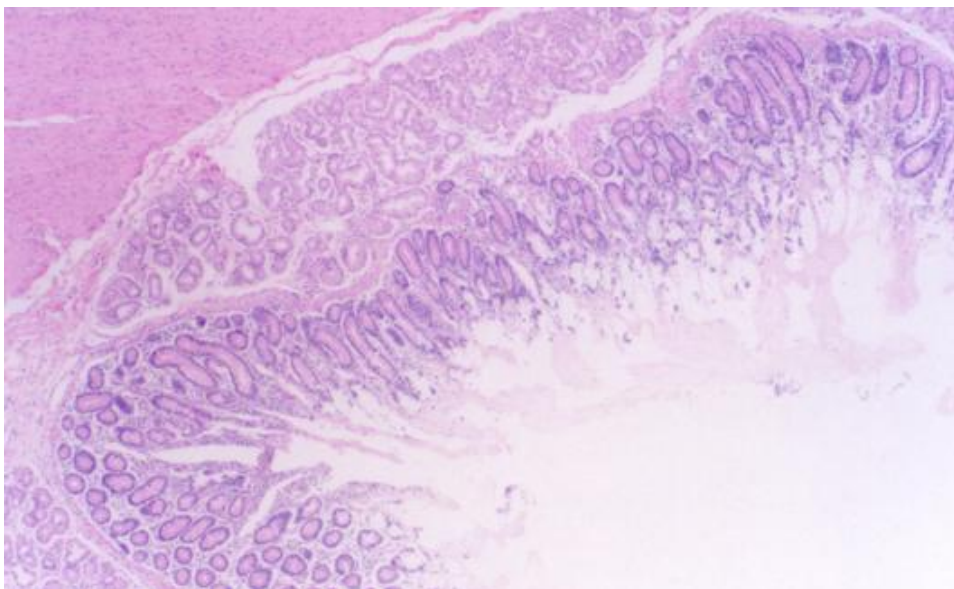


FIGURA 36 - Fotomicrografia de corte histológico da porção inicial de duodeno de bovino infectado com *Cooperia punctata*, pertencente ao grupo suplementado, com 50 dias de evolução, mostrando necrose intensa do ápice das vilosidades e preservação das criptas, com infiltrado inflamatório. Col. HE. Aumento: 14x.

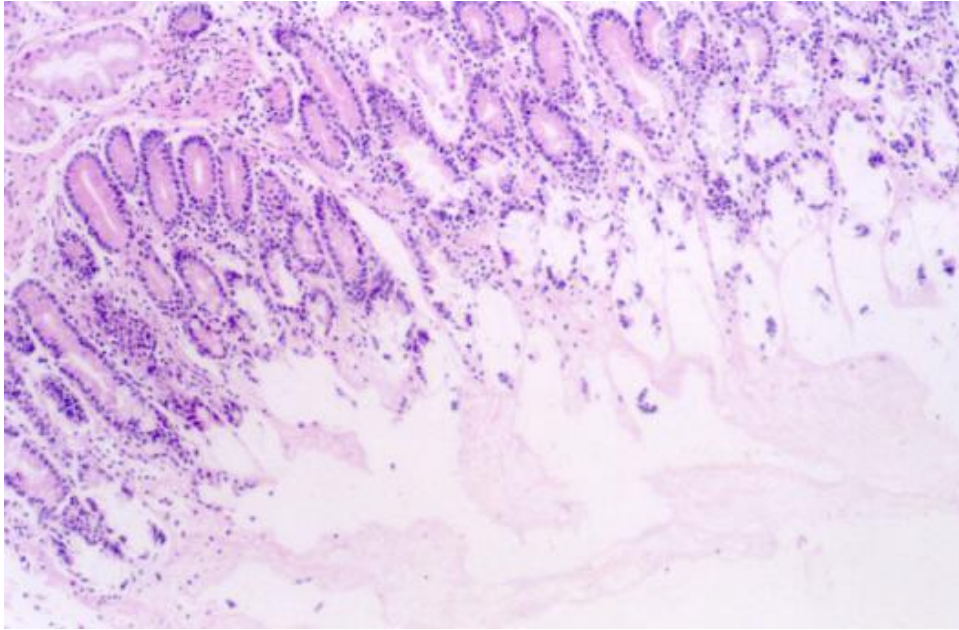


FIGURA 37 – Detalhe da fotomicrografia anterior, evidenciando a necrose do ápice das vilosidades e a preservação das camadas mais profundas da mucosa, com infiltrado inflamatório. Col. HE. Aumento: 36x.

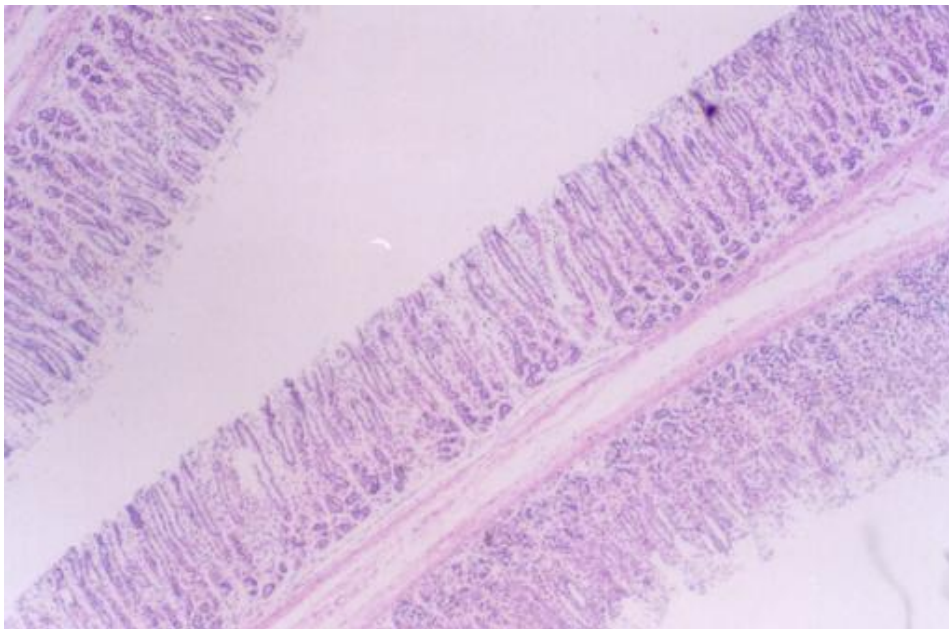


FIGURA 38 – Fotomicrografia de corte histológico da porção inicial de duodeno de bovino, de um animal pertencente ao grupo controle, mostrando mucosa bem preservada em toda a sua extensão. Col. HE. Aumento: 14x.

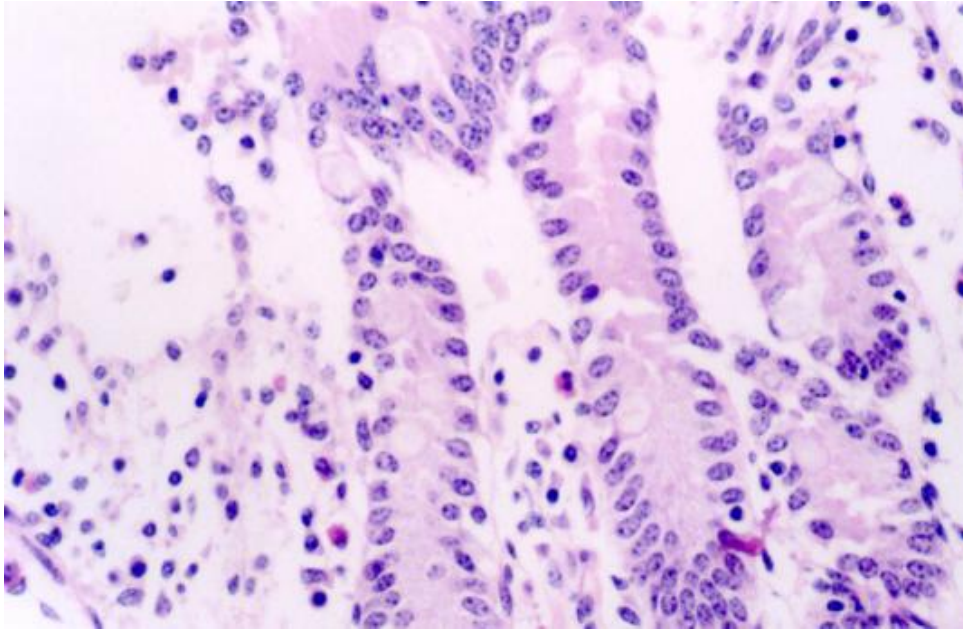


FIGURA 39 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando vilosidades e criptas bem preservadas, com infiltrado inflamatório misto, discreto, na matriz extracelular dos vilos e das criptas. Col. HE. Aumento: 140x.

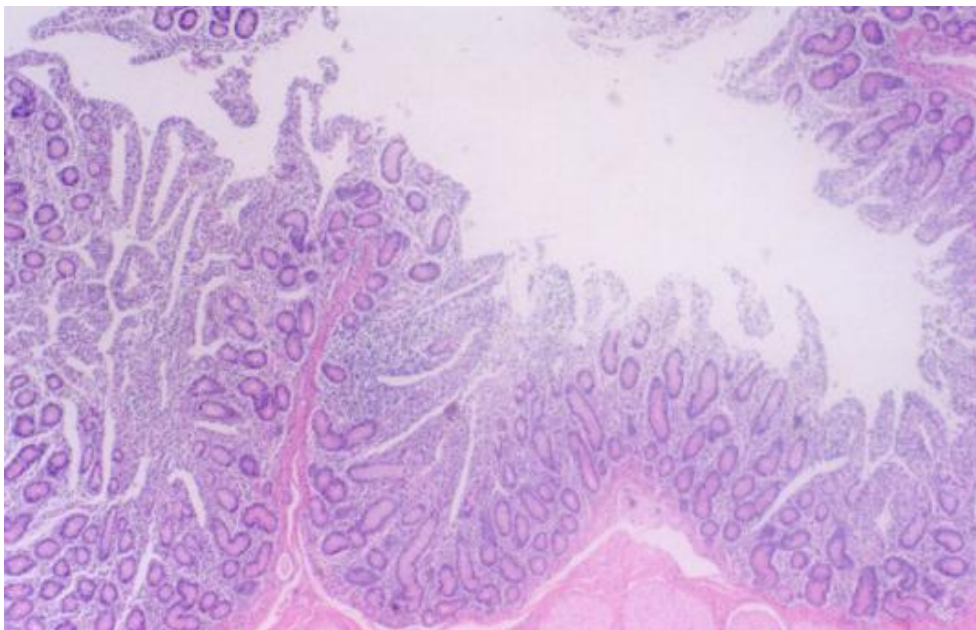


FIGURA 40- Fotomicrografia de corte histológico de jejuno terminal de bovino infectado com *Cooperia punctata*, com 50 dias de evolução da infecção, mostrando o ápice das vilosidades bem como as porções profundas da mucosa, com intenso infiltrado inflamatório. Destaca-se o alto grau de preservação das criptas. Col. HE. Aumento: 14x.

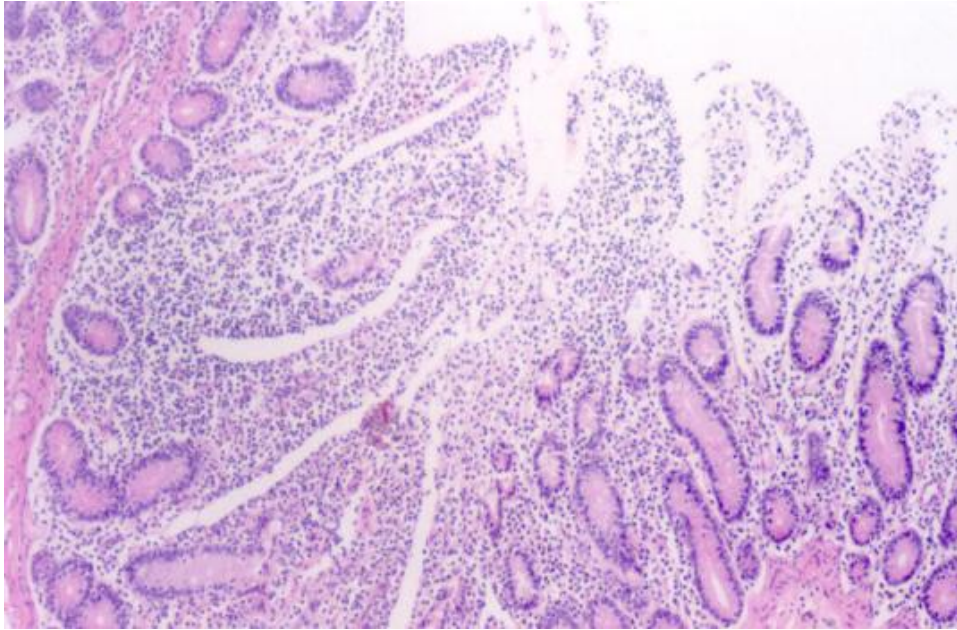


FIGURA 41 – Detalhe da fotomicrografia anterior, evidenciando o achados anteriormente relatados. Col. HE. Aumento: 36x.

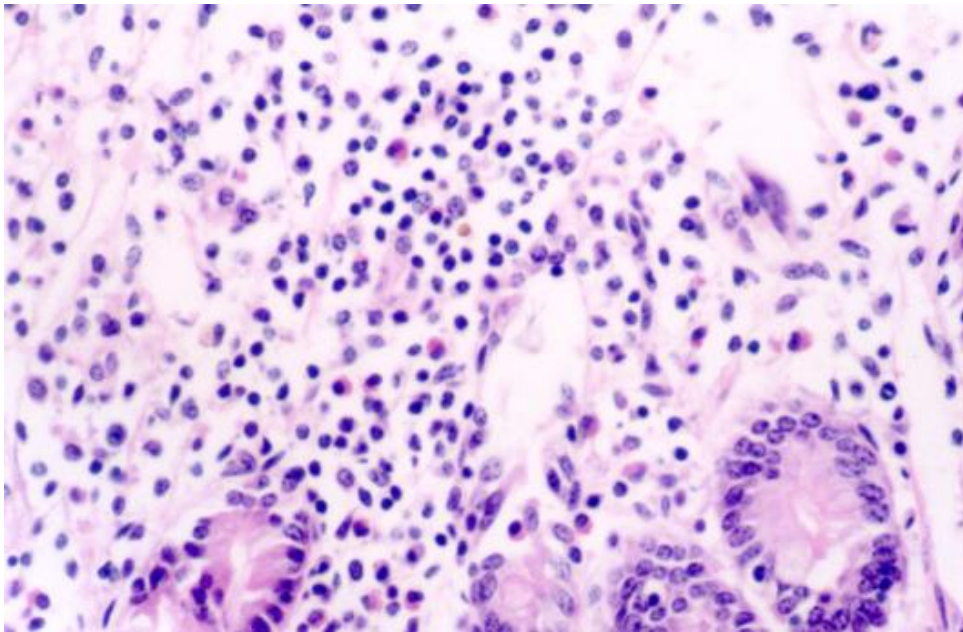


FIGURA 42 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando infiltrado inflamatório moderado, com predomínio de células mononucleares. Col. HE. Aumento: 140x.

Discussão

5. Discussão

5.1. Sinais Clínicos

Os sintomas apresentados pelos animais experimentais seguiram os classicamente descritos para a cooperiose, ou seja, fezes amolecidas e/ou diarreicas, desidratação, inapetência, prostração, perda de peso (BAILEY, 1949; ALICATA & LIND, 1961; YATSUDA, 1999).

Algumas diferenças puderam ser observadas na evolução das infecções por *Cooperia oncophora* e *C. punctata*. COOP *et al.* (1979) não puderam observar qualquer sinal clínico quando da infecção com 20.000 larvas de *C. oncophora*. SATRIJA & NANSEN (1992), utilizando uma carga infectante de 200.000 larvas do mesmo parasita, descreveram sintomas discretos de cooperiose em apenas alguns dos animais experimentais. ARMOUR *et al.* (1987) apontaram apenas amolecimento das fezes e diminuição do apetite em bezerros que receberam 60.000 larvas de *C. oncophora*. Não existem relatos na literatura de óbitos em decorrência de infecções por *C. oncophora*, o que foi observado no presente trabalho, devido a *C. punctata*. A severidade do quadro clínico apresentado pelos animais contrasta com as descrições constantes da literatura internacional, o que nos leva, juntamente com o óbito registrado, a afirmar que diferenças marcantes na patogenicidade das duas espécies são um fato.

A diferença na severidade dos sintomas clínicos entre os tratamentos nutricionais foi evidente. Os animais pertencentes ao grupo Basal infectado apresentaram um quadro diarreico mais intenso e que se manifestou mais cedo que nos animais do grupo Suplementado. Durante o segundo período

de estudos metabólicos, somente os animais mantidos na dieta basal apresentaram redução na ingestão de alimentos.

Semelhante perfil de resposta foi descrito por ABBOTT *et al.* (1985a), que em ovelhas infectadas por *Haemonchus contortus* e submetidas a dois teores de proteína na dieta (17% *versus* 8,8% de PB na MS), encontrou diferenças entre os grupos no tocante ao estado geral dos animais. VAN HOUTERT & SYKES (1996) e COOP & HOLMES (1996) citam em suas revisões, diversos exemplos de diferenças nas respostas à infecções parasitárias, sempre enfatizando que animais mantidos em plano superior de nutrição, especialmente quanto ao teor de proteína de suas dietas, suportam melhor o desafio parasitário. Infelizmente, poucos são os autores que incluem uma avaliação clínica dos animais parasitados em seus artigos.

5.2. Pesagens e Performance

5.2.1. Ganho de Peso

A perda de peso é uma constante em infecções por nematóide gastrointestinais (HOLMES, 1987; ENTROCASSO *et al.*, 1986b; 1987), estando sua magnitude diretamente relacionada com a intensidade do desafio parasitário (PLOEGER *et al.*, 1995). Conforme demonstrado pelos efeitos de interação constatados, tanto a infecção como tratamento nutricional influenciaram o ganho de peso dos animais experimentais, ainda que não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para seus pesos finais de abate.

Aparentemente, os animais pertencentes ao grupo Basal infectado foram mais afetados pela fase larvar da infecção. No auge da patogenia

larvar (7^o DAI) os animais deste grupo apresentaram uma maior perda de peso ($p < 0,05$), quando comparados aos do grupo Suplementado infectado.

Diversos autores relataram efeitos de maiores teores protéicos sobre a performance de animais parasitados. BLACKBURN *et al.* (1991), trabalhando com caprinos jovens infectados por *H. contortus*, e mantidos em uma dieta basal que supria as recomendações mínimas para manutenção e crescimento, ou em uma dieta suplementada com o dobro do teor protéico da primeira, observaram que os animais dos grupos suplementados, ganharam mais peso e sofreram menos os efeitos da infecção. Aqueles pertencentes ao grupo mantido na dieta suplementada e infectados, terminaram o período experimental 11% mais leves que seu respectivos controles, ao passo que os infectados alimentados com a dieta basal apresentaram uma performance 23% inferior aos controles.

COOP *et al.* (1995) também encontraram um perfil de resposta semelhante em animais infectados com *Ostertagia circumcincta* e com um dos grupos tendo sido submetidos a uma infusão de caseinato de sódio, a título de suplementação protéica.

WALLACE *et al.* (1995; 1998), trabalhando com infecções por *H. contortus*, e suplementações com farelo de soja ou uréia, também observaram que os animais que receberam teores maiores de proteína em sua alimentação, perderam menos peso durante a infecção parasitária na comparação com os grupos das dietas com baixa proteína. O mesmo pode ser dito das observações feitas por ABBOTT *et al.* (1985a).

Ovinos infectados por *T. colubriformis* também apresentaram semelhante resposta a suplementação protéica, apresentando uma performance superior aquela dos animais mantidos em planos de nutrição protéica inferiores (BOWN *et al.*, 1991a; 1991b; KYRIAZAKIS *et al.*, 1996a).

Portanto, a performance dos animais experimentais no presente experimento seguiu o comportamento apontado na literatura existente frente a resposta à suplementação protéica. Quando analisamos os dados da evolução do peso vivo em conjunto com a sintomatologia clínica apresentada, fica claro que os animais mantidos na dieta basal sofreram mais intensamente os efeitos da fase larvar da cooperiose.

5.2.2. Rendimento de Carcaça

O rendimento de carcaça dos animais experimentais confirmou a tese de que a proteína adicional produz efeitos significativos sobre a capacidade dos animais infectados manterem uma produção relativamente inalterada, a despeito da infecção parasitária. Os animais pertencentes ao grupo Suplementado infectado apresentaram um desempenho similar aos controles mantidos na dieta basal. Ou seja, a suplementação compensou os efeitos deletérios da infecção, fazendo com que os animais suplementados tivessem o mesmo nível de performance que seus controles livres de infecção mas mantidos numa dieta normal de crescimento. Esta resposta está de acordo com o conceito de “resilience”, anteriormente apresentado (COOP & HOLMES, 1996).

Não devemos esquecer contudo que a infecção determina perdas qualitativas na composição corporal dos animais (ENTROCASSO, 1987; POMPEU *et al.*, 1997; GENNARI, *et al.*, 1997), e que portanto o rendimento bruto não deve ser tomado como único fator na avaliação da validade do esquema de suplementação adotado, devendo ser analisado conjuntamente com dados qualitativos de composição corporal. As análises de composição corporal serão apresentadas mais a frente neste trabalho.

Diversos autores tem discorrido sobre os efeitos deletérios do parasitismo sobre o rendimento de carcaça dos animais afetados. Novamente ENTROCASSO *et al.* (1986b), avaliaram a resposta ao tratamento antiparasitário no tocante a tipificação de carcaças, seguindo critérios adotados pela “Meat and Livestock Commission” (1982). Uma maior percentagem dos animais submetidos a tratamentos preventivos atingiram classificação de carcaça superior, bem como seus rendimentos foram maiores.

Infelizmente, dentre os artigos referentes ao uso de suplementação protéica durante a infecção parasitária, poucos são os que fazem menção ao rendimento bruto da carcaça. WALLACE *et al.* (1995), trabalhando com cordeiros infectados por *H. contortus* e mantidos em dois diferentes regimes nutricionais (9,8 % contra 17,3 % PB na MS), não encontraram diferenças no rendimento de carcaça, a despeito de terem relatado diferenças na composição das mesmas entre os tratamentos nutricionais.

Esta diferença com os resultados aqui apresentados, pode ser eventualmente explicada por diferenças no comportamento do fluxo de proteína no organismo animal durante a infecção em função das diferentes espécies de parasitos envolvidas e, principalmente, devido ao local do parasitismo em cada caso. *Haemonchus contortus* lesa o abomaso, e apesar de a haemonchose severa causar sérios distúrbios nos mecanismos de digestão das proteínas, ela compromete relativamente pouco da absorção propriamente dita (BOWN *et al.*, 1984). Já a *Cooperia punctata* causa danos diretos no local onde a proteína é absorvida. É de se supor que o comportamento dos animais parasitados difira devido a estas particularidades inerentes a cada um destes agentes.

5.2.3. Análises Bromatológicas da Carcaça

As análises realizadas nas amostras de costela retiradas dos animais experimentais não demonstraram quaisquer alterações significativas.

O efeito da infecção parasitária sobre a composição corporal dos animais infectados é questão de controvérsia na literatura. Diferentes autores apontam resultados opostos, ora indicando que os nematóides gastrointestinais causam alterações nos teores de proteína, água, gordura e cinzas nas carcaças dos animais parasitados, ora afirmando o contrário.

Muito desta controvérsia pode ser atribuída aos diferentes métodos de amostragem, análise destas amostras e forma de expressar os resultados utilizados. Não podem ser desconsiderados os efeitos da enorme variação das condições ambientais as quais os animais são submetidos durante os diferentes experimentos, os parasitos estudados, entre outras. Não são raros os casos de trabalhos onde dois métodos são empregados, e os resultados obtidos apontam direções opostas.

BOWN *et al.* (1991a) estudaram os efeitos de infusões abomasais de energia ou proteína sobre diversos parâmetros durante a infecção por *T. colubriformis*, e relataram que os animais suplementados com proteína retiveram na carcaça uma maior porcentagem da energia metabolizável ingerida.

ENTROCASSO *et al.* (1986b) encontraram maiores porcentagens de osso e menores porcentagens de gordura e musculatura em animais infectados na comparação com grupos que receberam tratamento anti-helmíntico preventivo.

ASH & NORTON (1987) submeteram caprinos em crescimento a três diferentes teores de proteína na dieta: 11,3%, 16% e 20,9% PB. Estes

autores não observaram efeito do teor de proteína sobre a composição corporal dos animais - proteína, gordura, nitrogênio, cinzas e água, mas constataram que os animais mantidos em melhor nutrição protéica apresentaram um maior ganho diário para cada um destes componentes.

STEEL *et al.* (1980) encontraram reduções na porcentagem de matéria seca da carcaça e de gordura nas carcaças de cordeiros infectados, diretamente proporcionais ao grau do desafio parasitário por *T. colubriformis*. Aparentemente, o nível de infecção não afetou os teores de proteína e água da carcaça.

Entre os autores que trabalham especificamente com suplementação protéica na infecção parasitária, a discrepância entre resultados também se faz presente. Dois trabalhos provenientes do mesmo grupo apontam resultados opostos na resposta a suplementação durante a infecção parasitária. É importante ressaltar que as fontes de suplementação foram diferentes nos dois casos. WALLACE *et al.* (1998) trabalhando com *H. contortus* e suplementação com uréia não encontraram qualquer diferença entre suplementados e não suplementados. Já em um artigo anterior do mesmo grupo (WALLACE *et al.*, 1995), também com *H. contortus*, mas desta vez usando a farelo de soja como fonte adicional de proteína, notou-se que os animais suplementados demonstraram menores porcentagens de água e gordura, e maiores porcentagens de proteína e cinzas, cálcio e fósforo em suas carcaças, quando comparados aos mantidos na dieta basal.

Destes resultados tiramos mais um fator de variação na resposta da composição corporal a infecção parasitária: a fonte nutricional utilizada.

Correlacionando estes resultados, com os dados apresentados, podemos supor que a resposta dos animais infectados no presente experimento, ocorreu mais no sentido de um aumento de eficiência, em lugar de algum desvio de rota metabólica em decorrência da infecção, uma vez

que obtivemos uma resposta positiva à suplementação na análise “bruta”, representada pelo rendimento de carcaça, mas não pudemos constatar variações significativas na análise dos dados qualitativos.

Considerações adicionais a respeito serão feitas quando da discussão dos dados referentes as análises de composição corporal realizadas pelo princípio de diluição com o trítio.

5.3. Dosagens Bioquímicas

5.3.1. Proteínas séricas

O extravasamento de proteínas plasmáticas é uma característica marcante da infecção parasitária (SYMONS & JONES, 1978; BREMNER, 1982; HOLMES, 1987; PARKINS & HOLMES, 1989; COOP & HOLMES, 1996; VAN HOUTERT & SYKES, 1996). Devido a característica de efetuar ao menos uma passagem nas mucosas do hospedeiro, todas as espécies de nematóides gastrointestinais determinam algum tipo de lesão nestas mucosas, as quais são as responsáveis pela perda de proteínas plasmáticas para a luz do trato gastrointestinal.

SYKES *et al.* (1979) observaram quedas crescentes nos níveis de albumina plasmática no decorrer de uma infecção por *Trichostrongylus vitrinus*. Estes mesmos autores observaram alterações sem motivo aparente, nos níveis de globulinas dos animais controle, a semelhança do ocorrido no presente experimento. De igual modo, em ambos os casos, os controles mantiveram seus níveis de albumina inalterados no decorrer do período experimental. Muito provavelmente, tal queda reflete o stress do manejo a que os controles também foram submetidos.

STEEL *et al.* (1982) estudaram o efeito de desafios crescentes em cordeiros infectados por *O. circumcincta* e *T. colubriformis*. Foi constatado que quanto maior o número de larvas infectantes utilizados, menores os níveis plasmáticos de albumina e globulinas, e maiores as perdas de plasma (medidas em ml/ dia) pelos animais infectados. Ficou também provado que existe uma interação sinérgica em infecções mistas por vermes abomasais e intestinais, a qual resulta em maiores danos aos hospedeiros na comparação com os efeitos de infecções monoespecíficas. Trabalho anterior do mesmo grupo (STEEL *et al.*, 1980) com infecção somente por *T. colubriformis* já havia observado resposta semelhante para estes mesmos parâmetros. JONES & SYMONS (1982) também estudaram a resposta de cordeiros infectados por *T. colubriformis*, enfocando a síntese de proteínas pelo hospedeiro durante a evolução do quadro parasitário. Novamente, expressivas quedas nos níveis de albumina foram observadas.

Segundo YAKOOB *et al.* (1983), animais previamente expostos a pastos contaminados por nematóides gastrointestinais apresentaram uma resposta diferenciada ao desafio por infecções mistas com vários tricostrongilídeos. Aqueles que receberam um maior desafio parasitário inicial exibiram menores alterações em suas concentrações de albumina plasmática numa segunda infecção. Tal achado confirma que este parâmetro é um bom indicador da extensão de lesão tecidual determinada pela infecção por estes parasitas.

Quando analisamos os dados publicados para infecções por nematóides do gênero *Cooperia* sp o comportamento das concentrações das proteínas plasmáticas durante a infecção parasitária merece atenção especial. Quase em sua totalidade realizados com *Cooperia oncophora*, a maioria dos autores não relata diminuições nas concentrações de albumina plasmática (ARMOUR *et al.*, 1987; SATRIJA & NANSEN, 1992). Só COOP *et al.* (1979) relataram uma discreta hipoalbuminemia em bezerros infectados

com 20.000 L₃ de *C. oncophora*. Este dados comparados com o do presente trabalho, novamente confirmam a diferença de patogenicidade entre *C. oncophora* e *C. punctata*.

VIEIRA-BRESSAN *et al.* (1995) trabalharam com infecções mistas por *H. contortus* e *C. punctata*, apontaram um significativo extravasamento de proteínas plasmáticas, com mobilização de albumina do pool extravascular para o intravascular. Este autores concluíram que os efeitos desta infecção mista foram aditivos sobre os valores das concentrações de albumina plasmática.

Uma das hipóteses que gerou toda uma série de estudos concernentes a suplementação protéica durante a infecção parasitária, foi justamente a de que, em virtude da maciça perda gerada pelos parasitas, o metabolismo protéico dos hospedeiros era desviado de atividades de crescimento e produção (produção de leite, carne e lã) no sentido de repor as perdas de proteínas plasmáticas, sobretudo de albumina, e do reparo das áreas lesadas. Assim, faria sentido suprir este “gap” através de suplementação, possibilitando ao animal infectado combater a infecção nestas “duas frentes simultâneas”.

De fato, se considerarmos os níveis circulantes de albumina plasmática como um indicador da severidade dos danos determinados pelo parasitismo, temos na literatura uma indicação de que existe uma resposta positiva à suplementação protéica. São inúmeros os trabalhos onde diferenças significativas foram encontradas na comparação do comportamento deste parâmetro na resposta à suplementação (ABBOTT *et al.*, 1985b; KAMBARA *et al.*, 1993; WALLACE *et al.*, 1995; 1998; KYRIAZAKIS *et al.*, 1996b; ISRAF *et al.*, 1998). Chama a atenção a consistência desta resposta a despeito da ampla variação nas condições experimentais: espécies animais, espécies de parasitos, teores e fontes protéicas utilizados, entre outros. A única exceção foi COOP *et al.* (1995)

que não apontaram diferenças nos níveis de albumina na comparação entre suplementados e não suplementados na infecção por *O. circumcincta*, não por acaso nematóide abomasal. Em todos os artigos usando *Trichostrongylus* sp ou outros nematóides intestinais, a resposta foi positiva.

E neste ponto, os dados referentes as dosagens de proteínas plasmáticas apresentados neste trabalho vêm corroborar esta hipótese. Os animais infectados apresentaram a perda esperada de proteínas plasmáticas devido à infecção, sendo que estas foram mais expressivas nos animais mantidos na dieta basal. Quando observamos os resultados para as concentrações de albumina plasmática, vemos que os animais suplementados reagiram melhor ao desafio parasitário, apresentando menores quedas em seus níveis plasmáticos quando comparados aos mantidos na dieta Basal ($p < 0,05$).

5.3.2. Macroelementos

Alterações no metabolismo do cálcio foram descritas em infecções por diferentes parasitas gastrointestinais. SYKES *et al.* (1977) demonstraram que a deposição óssea de cálcio e fósforo foi reduzida em 35% em relação aquela dos controles não infectados. Em trabalho posterior os mesmos autores encontraram uma redução na atividade osteoblástica aliada a reduções nas concentrações plasmáticas destes dois elementos (SYKES *et al.*, 1979).

BOWN *et al.* (1991a) encontraram maiores deposições de cálcio em animais infectados por *T. colubriformis* mas que receberam suplementação com caseína, ainda que efeitos sobre a concentração plasmática não tenham sido observadas. Para o fósforo não puderam ser encontradas quaisquer alterações. Já KYRIAZAKIS *et al.* (1996b) encontrou maiores

alterações para os níveis de fósforo do que para os de cálcio, em infecções pelo mesmo parasita.

No presente trabalho, a infecção parasitária exerceu efeito sobre os níveis séricos de cálcio, sendo que conforme o processo progrediu as diferenças entre controles e infectados se tornaram estatisticamente significativas. Houve uma tendência por parte dos animais suplementados de recuperarem os níveis séricos deste elemento mais prontamente que seus pares mantidos na dieta basal, uma vez que na última dosagem realizada, por ocasião do 50^o DAI, apenas estes últimos continuavam a diferir dos controles.

Essas alterações determinadas no metabolismo do cálcio não foram suficientes para alterar os estoques ósseos deste elemento, conforme demonstrado pela ausência de diferença nas análises realizadas em fragmentos da 9^a costela retirados dos animais experimentais.

Já para as concentrações plasmáticas de fósforo inorgânico, apesar da grande variação nos resultados apresentados, foi possível detectar um efeito da infecção, particularmente nos animais mantidos na dieta basal. Da mesma forma que para com o cálcio, as alterações provocadas pela infecção não foram suficientes para provocar mobilização das reservas ósseas deste mineral.

Fica portanto patente que a infecção por *Cooperia punctata* determinou alterações no metabolismo de cálcio e fósforo, provavelmente por dificultar a absorção nas áreas lesadas, e que os animais mantidos na dieta basal sofreram estes efeitos de maneira mais intensa. Os mecanismos pelos quais estes efeitos da suplementação se manifestaram ficam por serem elucidados em trabalhos futuros.

5.4. Hemograma

5.4.1. Eritrograma

O eritrograma manteve-se relativamente inalterado, como era de se esperar em infecções por nematóides não hematófagos como os de gênero *Cooperia* sp (ARMOUR *et al.*, 1987).

Os valores de hematócrito, número de hemácias e concentração de hemoglobina oscilaram quase sempre dentro dos valores considerados normais. No entanto, em alguns momentos, variações significativas foram notadas.

Os animais infectados de ambos os tratamentos nutricionais apresentaram do 35^o DAI em diante, uma queda no hematócrito, no número de hemácias circulantes, e mais tardiamente (46^o DAI), na concentração de hemoglobina.

Devido a escassez de dados na literatura referentes a infecções por *Cooperia* sp. que tenham durado o tempo deste experimento, e também devido ao fato da série vermelha não ser normalmente avaliada em infecções por nematóides deste gênero, ficamos sem material para comparação deste resultado. É possível que esta queda seja um reflexo do momento do início do processo de expulsão dos parasitas, que segundo DOBSON *et al.* (1990) e BARNES & DOBSON (1990), ocorre cerca de uma a duas semanas após ser observada uma queda na produção de ovos, o que estaria de acordo com a dinâmica populacional apresentada no decorrer deste experimento. Na lesão determinada pelo processo inflamatório em curso, ocorre a geração uma grande quantidade de radicais oxigênio reativos, os quais, além de participarem no processo de expulsão dos

parasitos, também levarão a destruição celular no tecido atingido, o que pode ter contribuído para perdas de eritrócitos observada.

5.4.2. Leucograma

Trabalhos com infecções experimentais por nematóides, onde hemogramas completos tenham sido realizados não são abundantes na literatura. A grande maioria dos autores se concentra na resposta eosinofílica, que é onde centraremos também nossa discussão, não só pela real importância deste tipo celular na resposta às infecções por nematóides gastrointestinais, mas também pela maior disponibilidade de literatura para comparação de resultados.

Mesmo os trabalhos realizados com modelos experimentais utilizando animais de biotério raramente realizam um hemograma completo. E quando o fazem, também não reportam significativas oscilações na população de leucócitos circulantes, exceção feita à resposta eosinofílica, como no caso de ENERBÄCK *et al.* (1985) com o *Nippostrongylus brasiliensis* e YONG & DOBSON (1984) e KAMIS *et al.* (1992) com *Angiostrongylus* sp.

Os dados referentes ao número total de glóbulos brancos e a participação percentual dos neutrófilos na resposta leucocitária seguiram uma tendência similar, com quedas expressivas nos 14^o e 35^o DAI. Estes momentos coincidem primeiramente com o auge da patogenia larvar, e depois com o início da expulsão dos vermes adultos. O recrudescimento da resposta inflamatória nestes momentos seria responsável por uma maior taxa de migração para os tecidos, levando assim a diminuições nas populações circulantes destas células.

Os números de monócitos e linfócitos circulantes não apresentaram qualquer variação significativa.

Como já dito, o ponto de interesse do estudo da resposta leucocitária no sangue circulante foi a resposta eosinofílica. Ressaltamos aqui o termo “no sangue circulante”, pois é opinião comum a vários autores que a eosinofilia (isto é o aumento do número de linfócitos circulantes) e a migração destas células para os tecidos lesados, é um processo de “duas etapas”, ainda que o aumento do número de células circulantes pareça ser um melhor indicador de resistência que o número de células na mucosa intestinal (UPTON *et al.*, 1987; ROTHWEEL *et al.*, 1993; HOHENHAUS & OUTTERIDGE, 1995; WOOLASTON *et al.*, 1996).

Claramente, tivemos uma resposta no número de eosinófilos circulantes tanto para a infecção, como para o tratamento nutricional, sendo que os animais pertencentes ao grupo Basal infectado foram os que apresentaram as maiores contagens.

A eosinofilia é citada em diversos artigos como, junto com a mastocitose tecidual, uma resposta comum a diversos parasitos e em diversos hospedeiros (MACKENZIE & SPRY, 1983; CHEEMA & SCOFIELD, 1985, ROTHWEEL, 1989; SMITH & BRYANT, 1989; HOHENHAUS & OUTTERIDGE, 1995; STEAR *et al.*, 1995; PATTERSON *et al.*, 1996; WINTER *et al.*, 1997; SUAREZ *et al.*, 1999).

O fato do grupo que recebeu um menor teor de proteína em sua dieta ter respondido aparentemente melhor, isto é, com um maior número de eosinófilos circulantes, é aparentemente contraditório. ISRAF *et al.* (1996) trabalhando em infecções por *Nematodirus battus*, não encontraram diferenças entre animais mantidos em dietas com alta ou baixa proteína. Infelizmente, qualquer comparação feita entre esta situação e o presente trabalho, fica prejudicada pela discrepância entre os níveis nutricionais

utilizados, sendo que os maiores teores adotados por aqueles autores (13,2 % e 18,3 % de PB na MS) e também a proximidade entre os tratamentos devem ter contribuído para que as diferenças entre alto e baixo teores de proteína não se traduzissem em diferentes respostas eosinofílicas. Obviamente, diferenças entre as espécies envolvidas devem ser consideradas.

Este resultado aparentemente superior dos animais mantidos na dieta basal não é facilmente correlacionável com os achados histopatológicos, onde os animais do grupo Suplementado infectado apresentaram maior exuberância nas lesões determinadas pela resposta inflamatória, e com os dados de performance (ganho de peso e composição corporal).

O próprio papel dos eosinófilos na eliminação da infecção parasitária é assunto altamente controverso. Existem evidências, oriundas de experimentos *in vitro*, de que estas células tem papel direto na destruição dos parasitas (SMITH & BRYANT, 1989; ROTHWEEL, 1989). No entanto, HERNDON *et al.* (1992), trabalhando com infecções por *Trichinella spiralis* onde a ativação de eosinófilos foi suprimida pelo tratamento dos animais experimentais com anticorpos monoclonais contra o fator de ativação interleucina IL-5, postula que estas células não são essenciais para a expulsão destes parasitas. Por outro lado, parece bem estabelecido que a eosinofilia tem alta correlação com o número de mastócitos e leucócitos globulares na mucosa, e com a presença de plasmócitos produtores de IgA (STEAR *et al.*, 1995), tendo sido usada inclusive como critério para a seleção de animais resistentes ao parasitismo (WINDON *et al.*, 1980; WINDON & DINEEN, 1981; HOHENHAUS & OUTERIDGE, 1995; PATTERSON *et al.*, 1996; WOOLASTON *et al.*, 1996).

É interessante apontar aqui os resultados obtidos por UPTON *et al.* (1987) em infecções mistas por *N. brasiliensis* e *Eimeria nieschulzi*, onde a presença deste coccídeo provocou uma diminuição no número de eosinófilos

circulantes, se comparadas a animais infectados exclusivamente pelo nematóide. Os autores observaram que, nos grupos onde a eosinofilia foi menos expressiva, a patência foi prolongada. De maneira semelhante, DORCHIES *et al.* (1997) observaram que a infecção concomitante por *Oestrus ovis* (que elevou os níveis de eosinófilos circulantes) auxiliou no controle de infecções por *Haemonchus contortus*.

Ressaltamos porém, que se da análise dos dados referentes ao número de eosinófilos circulantes for excluído o animal 27 (que teve um padrão de resposta atípico para todas as células examinadas, bem como para outros parâmetros), a diferença entre os tratamentos diminui consideravelmente.

Fica portanto em aberto o real significado desta discrepância no número de eosinófilos circulantes entre os dois tratamentos nutricionais. Mas assumindo, baseados nos resultados apresentados para parâmetros de desempenho como a avaliação da carcaça e composição corporal, que os animais submetidos a dieta basal apresentaram uma menor eficiência na elaboração da resposta local, o maior número de eosinófilos circulantes apresentados por estes animais poderia ser eventualmente explicado por deficiências na produção de fatores quimiotáticos que efetivassem a transposição destas células para as áreas lesadas, resultando assim num maior estoque circulante.

5.5. Composição Corporal - Estudos com a água tritiada

Observou-se uma redução na ACT dos animais infectados de ambos os tratamentos nutricionais, sendo que somente para aqueles pertencentes ao grupo Basal infectado encontrou-se diferença estatisticamente significativa na comparação entre as medições realizados nos períodos pré e pós-infecção.

Tal achado vai na direção oposta a tudo o que tem sido relatado na literatura até hoje. HOLMES (1987) afirma que a retenção de líquidos e o aumento da ACT são uma constante nas infecções parasitárias. Diversos autores fazem semelhante afirmação (VIEIRA-BRESSAN *et al.*, 1992; MACLEAN *et al.*, 1992; POMPEU *et al.*, 1997), sendo que apenas GENNARI *et al.* (1997) descreveram um aumento na ACT, e apenas em um dos grupos experimentais utilizados.

Todos estes autores supracitados trabalharam com nematóides abomasais, não existindo até o momento trabalhos que tenham utilizado a técnica do trítio com parasitas intestinais, para que uma comparação mais direta fosse possível. Em sua maioria, as atenções tem se mantido em nematóides como *Ostertagia* sp e *Haemonchus* sp, parasitos do abomaso, que também causam diarreia severa e desequilíbrios do metabolismo hídrico, mas que, possivelmente tenham efeitos distintos dos determinados por *C. punctata* sobre estes parâmetros, em função dos diferentes locais de parasitismo.

Ocorreu uma redução na meia vida biológica da água tritiada em função da infecção. O tratamento nutricional influenciou este fenômeno, uma vez que, novamente, resultados estatisticamente significativos para a comparação antes e depois só foram encontrados nos animais do grupo Basal infectado. Este fato também foi observado por VIEIRA-BRESSAN *et*

al. (1992) e por POMPEU *et al.* (1997), sendo que estes últimos autores constataram um comportamento diferente com relação ao $T_{1/2}$ em função do nível do desafio parasitário - animais infectados com 1.000 L₃ de *H. placei* apresentaram redução na meia vida biológica do trítio na comparação antes e após a infecção, ao passo que os que receberam 2.000 L₃ deste mesmo parasita apresentaram um aumento deste parâmetro. Já GENNARI *et al.* (1997) relataram um aumento do $T_{1/2}$, sendo que os animais mantidos numa dieta com suplementação protéica apresentaram um menor aumento na comparação entre antes e após a infecção.

Houve uma clara tendência no sentido de um aumento na porcentagem de gordura presente nos animais experimentais, novamente só atingindo a significância estatística nos animais pertencentes ao grupo Basal infectado. Já na porcentagem de sólidos desengordurados, que são basicamente proteínas mais cinzas, ocorreu uma significativa redução decorrente da infecção, e que novamente, só foi estatisticamente significativa nos animais mantidos na dieta Basal. POMPEU *et al.* (1997) encontraram resultados semelhantes em bezerros infectados por *Haemonchus placei*. Demais estudos de composição não relatam este aumento na participação de gordura na carcaça (ENTROCASSO *et al.*, 1986b), o que aparentemente é um contra-senso. Talvez, esta observação possa ser explicada pela redução na ACT observada, que pode ter levado a um aumento na estimativa de gordura corporal. Já a redução na deposição de musculatura devido a infecção parasitária é um consenso na literatura (ENTROCASSO *et al.*, 1986b; HOLMES, 1987; VIEIRA-BRESSAN *et al.*, 1992; COOP & HOLMES, 1996), sendo resultado do desvio do fluxo de nitrogênio no animal parasitado de processos de crescimento e produção para os de reparo das lesões e combate à infecção.

Em resumo, o parasitismo por *Cooperia punctata* afetou, de forma semelhante aquela dos demais parasitos já estudados, a deposição de

proteína nos tecidos. Apresentou uma resposta particular no tocante à ACT e a porcentagem de gordura corporal.

Os animais mantidos na dieta Basal sofreram os efeitos da infecção parasitária de forma mais intensa, pois apresentaram maiores aumentos de gordura corporal, uma maior redução na deposição de proteína nos tecidos musculares, reduziram de forma mais brusca a quantidade de água em seus corpos, e a fizeram circular mais depressa no organismo.

Tal efeito benéfico da suplementação protéica sobre a composição corporal vem novamente reforçar a eficiência desta medida em aumentar a “resiliência” do animal frente ao desafio parasitário. Considerações e especulações sobre o “modus operandi” deste fenômeno serão feitas nas conclusões finais.

5.6. Aspectos Nutricionais

5.6.1. Digestibilidade da Matéria Seca

Infelizmente, são escassos na literatura dados referentes ao comportamento dos valores da digestibilidade aparente durante as infecções parasitárias. Mesmo entre os trabalhos que abordam a questão da suplementação protéica e seus efeitos sobre o curso das infecções por nematóides gastrointestinais, são raros os que apresentam uma descrição detalhada destes parâmetros.

Trabalhando com uma infecção mista por *T. colubriformis* e *O. circumcincta*, BOWN *et al.* (1991b) não encontraram alterações na digestibilidade aparente de matéria seca nos cordeiros infectados.

Dentre os autores que abordaram os efeitos da suplementação protéica, ABBOTT *et al.* (1985b) não encontraram qualquer alteração na digestibilidade aparente que pudesse ser atribuída a infecção por *H. contortus* ou aos diferentes teores de proteína oferecidos aos animais. Do mesmo modo, BOWN *et al.* (1991a) também não foram capazes de demonstrar mudanças neste parâmetro em animais infectados por *T. colubriformis* e que receberam infusões abomasais de caseinato de sódio como fonte adicional de proteína.

Contrariando estes relatos, SYKES *et al.* (1979) encontraram em ovelhas parasitadas por *Trichostrongylus vitrinus* uma redução significativa na digestibilidade aparente da matéria seca na comparação, e que foi atribuída a infecção parasitária.

PARKINS *et al.* (1990) trabalharam com bezerros e uma infecção mista por *O. ostertagi* e *Cooperia oncophora*, e relataram uma diminuição na digestibilidade da matéria seca nos animais infectados. Resultados semelhantes foram encontrados por ARMOUR *et al.* (1987) em infecções de bezerros somente por *C. oncophora*.

Do mesmo modo, no presente experimento a infecção por *Cooperia punctata* reduziu a digestibilidade aparente da matéria seca.

Tais discrepâncias nos relatos da literatura podem, talvez, serem explicadas por diferenças inerentes a patogenia das diferentes espécies de parasitas estudadas. O momento da infecção onde as medições são feitas, muito variável entre os experimentos, deve sem dúvida ter contribuído para diversidade de comportamentos observados.

Fica a título de sugestão, que maior atenção a estes estudos de digestibilidade (de execução relativamente fácil em delineamentos que

contemplem o alojamento dos animais em gaiolas metabólicas) seja dada em trabalhos realizados no futuro.

5.6.2. Digestibilidade da Proteína Bruta e Balanço de Nitrogênio

De um maneira geral, nos trabalhos onde foram descritas reduções na digestibilidade aparente da matéria seca em decorrência da infecção parasitária, também se fizeram presentes reduções na digestibilidade de proteína bruta.

Se encararmos a digestibilidade aparente como um indicador da eficiência de retenção do nitrogênio (o que se justifica pelo fato de que ela é calculada dividindo-se a diferença entre o consumido e o excretado pelo total consumido), observamos um indicativo muito forte da eficácia da suplementação protéica em aumentar a capacidade dos animais infectados em suportar melhor os efeitos adversos do parasitismo, em consonância com o conceito de “resilience” apresentado na introdução. Na comparação entre os períodos pré e pós-infecção, os animais mantidos na dieta basal apresentaram uma redução na digestibilidade aparente do nitrogênio da ordem 71,78% (índice obtido dividindo-se a digestibilidade pré pela pós-infecção), enquanto que aqueles que receberam a suplementação protéica demonstraram uma redução de apenas 20,09%, ou seja uma eficiência cerca de 3,6 vezes maior.

Reduções no balanço e na retenção de nitrogênio são relatos constantes, sendo bem aceitos como uma característica marcante das infecções por nematóides gastrointestinais. Estas alterações são resultantes da redução na ingestão de alimentos e aumento na excreção urinária de nitrogênio determinadas por estas infecções (PARKINS *et al.*, 1973; ROWE *et al.*, 1988; PARKINS & HOLMES, 1989; COOP & HOLMES, 1996).

As perdas de nitrogênio por via urinária, são tão maiores quanto maior for o desafio parasitários ao qual o animal foi exposto. STEEL *et al.* (1980) demonstraram que conforme a quantidade de larvas de *T. colubriformis* usadas no desafio aumentava, maiores eram as quantidades de nitrogênio perdidas na urina dos animais infectados. O mesmo grupo também relata que em infecções mistas por *T. colubriformis* e *O. circumcincta* a severidade na diminuição da retenção e perdas urinárias acompanhou o crescimento do número de larvas infectantes, sendo que os grupos infectados por apenas uma espécie destes parasitas demonstraram menor comprometimento destes parâmetros, demonstrando assim um efeito sinérgico entre as duas espécies quanto a sua patogenicidade para o hospedeiro (STEEL *et al.*, 1982).

Em estudos com bezerros, PARKINS *et al.* (1990) também relataram diminuição no balanço e na retenção, e aumento na excreção fecal e urinária de nitrogênio, em infecções mistas por *O. ostertagi* e *C. oncophora*. Em infecções exclusivas por *C. oncophora*, ARMOUR *et al.* (1987) descreveram o mesmo padrão de resposta: redução na retenção e aumento na excreção urinária. POMPEU *et al.* (1997), trabalhando com infecções por *Haemonchus placei*, observaram somente uma redução na ingestão de nitrogênio em decorrência da infecção, resultando em uma tendência de diminuição de retenção deste elemento.

ABBOTT *et al.* (1985b) observaram um efeito positivo da suplementação protéica sobre a ingestão e sobre a excreção fecal e urinária de nitrogênio em infecções por *H. contortus* em duas diferentes raças de ovinos.

Os dados aqui apresentados confirmam os relatos da literatura, tendo sido observados significativas reduções no balanço e na retenção de

nitrogênio na comparação entre controles e infectados mantidos em ambos os tratamentos nutricionais.

É interessante notar que um aumento significativo da excreção urinária de nitrogênio, só pôde ser observada nos animais pertencentes ao grupo suplementado.

ABBOT *et al.* (1985b) também trabalharam com suplementação protéica e infecções parasitárias, usando teores nutricionais semelhantes aos aqui empregados. Estes autores relatam valores para a excreção urinária de nitrogênio muito similares aos nossos.

Segundo ROWE *et al.* (1988) o aumento do nitrogênio urinário reflete um maior ritmo de catabolismo protéico por parte dos indivíduos parasitados, que apresentam um maior turnover. Fica aqui impossível de afirmarmos se esta observação deve-se ao fato dos animais mantidos na dieta suplementada, por terem um maior aporte nutricional de proteína, terem sido capazes de equacionar suas necessidades de nitrogênio para reparo das lesões, elaboração da resposta e crescimento através de uma maior mobilização tecidual (daí sua maior elevação nas perdas urinárias), mas que por contarem com esta maior disponibilidade de proteína puderam realizar esta tarefa de forma mais eficiente do que os mantidos na dieta basal, mantendo assim melhores parâmetros clínicos e produtivos. Outra possibilidade é a de que os animais mantidos nos grupos que receberam a dieta Basal tenham promovido alguma espécie de reabsorção ativa de nitrogênio, pois não dispunham de “excesso” deste elemento, e que este processo teria um custo metabólico alto que se refletiu no desempenho inferior destes animais. Todas estas especulações ficam por serem elucidadas em estudos posteriores, onde a utilização de animais canulados geraria dados indispensáveis sobre o trânsito de nitrogênio durante a infecção que possibilitariam uma maior compreensão destes fenômenos.

5.7. Dados Parasitológicos

5.7.1. Carga Parasitária

Os dados disponíveis na literatura sobre infecções experimentais com o gênero *Cooperia* sp. são escassos. Poucos são os trabalhos publicados, e em sua maioria estes se referem a espécie mais comum em climas temperados, a *C. oncophora*.

A taxa de estabelecimento de parasitos encontrada neste experimento foi algo em torno de 10%, o que, considerando-se o longo período experimental, é normal. COOP *et al.* (1979) infectaram bezerros com *C. oncophora* e os abateram 22 semanas após a infecção, encontrando então um estabelecimento de 0,5 a 1,5%. SATRIJA & NANSEN (1992) encontraram taxas de estabelecimento variando de 15,1 até 40,5% em infecções por *C. oncophora*, aos 28 dias após a infecção.

Diversos fatores exercem influência sobre a distribuição dos nematóides ao longo do trato gastrointestinal. Os mesmos SATRIJA & NANSEN (1992) demonstraram que a dose infectante utilizada e o esquema de administração (infecção única ou “trickle infections” – as infecções seriadas) alteram o local de estabelecimento de *C. oncophora*. Estes autores relatam que quanto maior o desafio, maior a tendência de deslocamento para regiões distais, e que o regime de administração gradual faz com que a maioria dos parasitas se fixem nas porções iniciais do intestino. Como a ingestão diária de pequenas quantidades de larvas é o esquema aceito como sendo o que melhor mimetiza as infecções que ocorrem naturalmente à campo, podemos assumir que as porções iniciais do intestino delgado são efetivamente o ponto de eleição para a fixação de espécimens do gênero *Cooperia* sp. Os já citados COOP *et al.* (1979) também relatam o início do

intestino delgado como sendo o ponto preferencial de fixação para esta espécie de parasita.

Sem dúvida a descrição mais detalhada da patogenia por *Cooperia oncophora* foi feita por ARMOUR *et al.* (1987). Estes autores fizeram necrópsias sucessivas, onde o curso da infecção pode ser acompanhado. Com 3 semanas de infecção, ou seja durante o auge da patogenia determinada pela fase larvar, a maioria absoluta dos vermes estava localizada no duodeno. Na sexta semana da infecção, a população tinha se deslocado para porções mais distais do intestino, “retornando” depois para o duodeno por volta da décima semana do processo.

É um consenso na literatura, que os teores nutricionais de proteína não afetam o estabelecimento da população de parasitas, e portanto a carga parasitária (ABBOTT *et al.*, 1985a; WALLACE *et al.*, 1995; COOP & HOLMES, 1996; ISRAF *et al.*, 1996; KYRIAZAKIS *et al.*, 1996a; 1996b; VAN HOUTERT & SYKES, 1996; WALLACE *et al.*, 1998; ISRAF *et al.*, 1998;). Somente COOP *et al.* (1995) trabalhando com suplementação na infecção por *O. ostertagi*, e ASH *et al.* (1985) em ratos mal nutridos em proteína e infectados por *Nippostrongylus brasiliensis*, reportaram alterações na carga parasitária atribuíveis a diferenças nos tratamentos nutricionais.

A luz do exposto até aqui, as alterações observadas na distribuição dos parasitas ao longo do trato gastrointestinal no presente experimento assumem especial interesse. Os animais suplementados foram capazes de deslocar a infecção para pontos distais do intestino delgado. Tal achado pode ser explicado pela maior intensidade da resposta inflamatória apresentada pelos animais suplementados (como demonstram os dados dos exames histopatológicos), que tornou a região normalmente preferencial para os parasitos em um local inadequado, forçando-os a buscar regiões mais distais, onde melhores condições facilitassem seu desenvolvimento.

Variações na dinâmica da resposta não podem ser descartadas como a fonte para esta variação: a resposta não seria essencialmente diferente, apresentando apenas um “delay” no tempo de ocorrência (ROTHWELL, 1989). No entanto, a ausência de diferenças marcantes no perfil das contagens de ovos por gramas de fezes quando comparamos os dois tratamentos nutricionais empregados fala contra a esta hipótese, uma vez que um primeiro sinal da resposta em andamento e proximidade da expulsão, é a queda de fecundidade dos parasitas. Um breve exame nas curvas de o.p.g. nos mostram diferenças de intensidade, sem qualquer efeito de “deslocamento temporal”.

5.7.2. Proporção machos/ fêmeas

Segundo WALLACE *et al.* (1995), alterações na proporção macho/fêmea dentro da população parasitária são evidências da ocorrência de uma resposta imune, uma vez que a longevidade é naturalmente diferente entre os sexos, e que as fêmeas de vida mais longa teriam assim maiores chances de serem atingidas pelos mecanismos efetores. Estes autores encontraram uma menor proporção de fêmeas entre os parasitos recolhidos de animais que receberam farelo de soja como fonte de suplementação protéica.

Em nossos dados, uma alteração significativa na proporção machos/fêmeas também foi encontrada, mas apenas dentro do grupo suplementado. Só que em nosso caso, a proporção de fêmeas foi maior que a dos machos.

Dados sobre a biologia e diferenças comportamentais entre machos e fêmeas de *Cooperia punctata* não estão disponíveis na literatura. É possível que fatores inerentes as diferentes espécies pesquisadas sejam responsáveis por essa aparente discrepância. Para confirmar que as

alterações populacionais foram devidas efetivamente a maior intensidade na resposta imune demandariam estudos da morfologia dos parasitos recolhidos, procurando dados como menor número de ovos por fêmeas, achatamento e lesões superficiais.

5.7.3. Comprimento dos Parasitos

No trabalho já citado de WALLACE *et al.* (1995), foram encontradas diferenças significativas para o comprimento dos parasitos que foram atribuídas aos diferentes tratamentos nutricionais oferecidos. COOP *et al.* (1995), trabalhando com suplementação em infecção por *O. circumcincta* também encontrou reduções no comprimento dos parasitos atribuídas à suplementação com caseinato de sódio.

A falta de alterações significativas no comprimento dos vermes que acompanhassem os achados para o perfil populacional quanto ao sexo, nos leva mais uma vez a supor que os mecanismos envolvendo a expulsão possuem variações de espécie para espécie. O fato de tratar-se de uma primo-infecção também não pode ser desprezado, pois os mecanismos relacionados a diminuição do tamanho dos parasitas e redução de fecundidade, estão associados a eventos IgA dependentes (STEAR *et al.*, 1995) e que só demonstram plena atuação em re-infecções.

5.7.4. Contagens de Ovos por Grama de Fezes

Os valores de pico para as contagens de ovos por grama de fezes são compatíveis com os descritos por COOP *et al.* (1979) e acima daqueles apresentados por SATRIJA & NANSEN (1992), ambos em infecções por *C.*

oncophora. YATSUDA & VIEIRA-BRESSAN (2000) demonstraram valores médios de pico de cerca de 1600 o.p.g. em infecções por *Cooperia punctata*. Os dados aqui apresentados estão de acordo com tais parâmetros.

Segundo a literatura levantada, as contagens de o.p.g. de fezes não sofrem efeitos da suplementação protéica (COOP & HOLMES, 1996; VAN HOUTERT & SYKES, 1996). No entanto, é interessante observar que os valores máximos apresentados foram encontrados em animais do grupo basal, atingindo quase o dobro dos valores de pico dos animais mantidos com suplementação protéica.

5.8. Histopatologia

As lesões encontradas ao exame dos cortes histológicos estão de acordo com as descrições apresentadas na literatura. Diversos autores apontaram como sendo características comuns das infecções por nematóides do gênero *Cooperia*, a atrofia e achatamento das microvilosidades intestinais (ARMOUR *et al.*, 1987; COOP *et al.*, 1979; PARKINS *et al.*, 1990). Cumpre ressaltar que todos os dados histopatológicos disponíveis se referem ao parasita *Cooperia oncophora*, e que não existem relatos de necrose determinada pela infecção por este parasita. Nesta infecção por *Cooperia punctata*, encontramos extensas áreas de necrose na extremidade das vilosidades de diversos animais experimentais, o que ressalta a diferença de patogenicidade entre estas duas espécies de parasitas do gênero *Cooperia*.

O tipo de infiltrado inflamatório constatado nos cortes estudados também seguiu o padrão descrito pelos autores supracitados. A presença de um grande número de plasmócitos e eosinófilos foi descrita para infecções

por *Cooperia* sp. (ARMOUR *et al.*, 1987; COOP *et al.*, 1979; PARKINS *et al.*, 1990), bem como para outros nematóides gastrointestinais (CHEEMA & SCOLFIELD, 1985; ROTHWELL, 1989; STEAR *et al.*, 1995; PATTERSON *et al.*, 1996).

A relativa ausência de mastócitos e neutrófilos nas áreas lesadas é um fato digno de nota. É relativamente bem aceito que as chamadas “Mucosal Mast Cells” (mastócitos de mucosa) possuem um papel determinante na expulsão dos nematóides gastrointestinais (HUNTLEY *et al.*, 1984; CHEEMA & SCOLFIELD, 1985; ROTHWELL, 1989; STEAR *et al.*, 1995), estando relacionadas com a resistência a estas infecções. Segundo STANKIEWICZ (1993), estas células estão entre as primeiras expostas aos parasitos, e migram para as extremidades dos vilos, onde sofrem degranulação, sendo responsáveis pela liberação dos mediadores da inflamação e pelo estímulo inicial para migração dos eosinófilos e demais células envolvidas no processo. Neste processo, os mastócitos se transformariam no tipo celular conhecido como leucócitos globulares (“globule leukocytes”) (HUNTLEY *et al.*, 1984; HUNTLEY *et al.*, 1992).

A despeito de não terem sido realizadas técnicas específicas que maximizassem a visualização de mastócitos, a ausência destas células chamou-nos a atenção. Este fato pode eventualmente ser explicado de dois modos: pelo estágio avançado da infecção (mais de 50 dias de curso), por ocasião da necrópsia dos animais experimentais; ou ainda pela sua transformação em leucócitos globulares, células desprovidas de granulações características e dificilmente identificáveis em preparações coradas pela hematoxilina - eosina.

Também a ausência de mastócitos nos leva a postular que os parasitos do gênero *Cooperia* possam eventualmente liberar fatores quimiotáticos para eosinófilos, fazendo com que a migração destas células

(abundantes no local da lesão) durante o processo inflamatório prescindida da presença de fatores mastócitos - dependentes.

O fato mais interessante observado ao exame histopatológico, foi sem dúvida o fato de que as áreas de necrose de extremidade de vilos, foram somente encontradas nos animais pertencentes ao grupo suplementado infectado.

A geração de radicais de oxigênio livres tem sido apontada como um importante fator de agressão aos parasitos durante a infecção por nematóides (SMITH & BRYANT, 1989; ROTHWELL, 1989), mas também constitui em determinante da lesão tecidual provocada, sobretudo via a ação destes radicais nas membranas das células em reações de peroxidação de lipídeos. SMITH & BRYANT (1989) mediram a produção de radicais livres no intestino de ratos infectados com *N. brasiliensis*, encontrando uma estreita relação entre a produção destes compostos e a expulsão dos parasitos. CHEEMA & SCOLFIELD (1985) dentro da mesma linha, determinaram a atividade de fosfolipases em diferentes níveis de desafio parasitário por *N. brasiliensis*, constatando que quanto maior a carga a que o animal era exposto, maior a lesão tecidual determinada e maiores os índices de atividade enzimática (peroxidases).

Correlacionando estes fatos com os demais dados aqui apresentados, podemos supor que os animais mantidos com teores mais altos de proteína neste experimento foram capazes de montar uma resposta local mais eficiente para expulsão dos parasitas (como demonstram os dados da distribuição dos parasitas ao longo do trato gastrointestinal), provavelmente por disporem de um maior aporte protéico para a síntese de células e mediadores envolvidos na resposta local, o que se traduziu por uma maior geração de radicais oxigênio e maior atividade enzimática, resultando assim em áreas com lesões mais expressivas. Experimentos adicionais são necessários para confirmar tal hipótese.

Conclusões

6. Conclusões

1) No presente trabalho ficou claramente demonstrado que existem diferenças marcantes na patogenicidade de *C. oncophora* e *C. punctata*, sendo esta última a que determina lesões mais graves para seus hospedeiros.

Uma rápida análise dos resultados referentes a sintomatologia clínica apresentada pelos animais experimentais aqui utilizados, bem como em nossos dados sobre as dosagens das proteínas plasmáticas, e a sua posterior comparação com os resultados apresentados na literatura para *C. oncophora* sustentam esta conclusão.

2) A suplementação protéica afetou positivamente o desenvolvimento das alterações fisiopatológicas determinadas pela infecção por *C. punctata*.

Na comparação com os animais infectados mantidos na dieta basal, os pertencentes ao grupo suplementado infectado apresentaram um quadro clínico menos severo durante a infecção, com menor intensidade de sintomas e uma recuperação abreviada durante o desenvolver da cooperiose.

Estes mesmos animais perderam menos peso durante o auge da fase larvar, ao redor da segunda e terceira semanas da infecção, e mesmo que o ganho total durante o período do desafio parasitário não tenha diferido entre

os tratamentos nutricionais, clara resposta positiva foi vista no rendimento de carcaça, sendo que os animais pertencentes ao grupo suplementado infectado apresentaram desempenho semelhante ao controles não infectados mantidos na dieta basal. Ficou assim demonstrado que a suplementação efetivamente “compensou” os efeitos deletérios do parasitismo, corroborando o conceito de “resilience” anteriormente apresentado.

A ausência de alterações significativas nas análises bromatológicas realizadas em amostras das carcaças dos animais experimentais parece reforçar que as alterações no curso da resposta do hospedeiro determinadas pela suplementação são foram altamente efetivas no sentido de manter a homeostase animal a despeito da infecção parasitária.

O cruzamento das informações obtidas nas análises de bioquímica sangüínea, eficiência no aproveitamento de nutrientes, lesões histopatológicas balanço de nitrogênio, e as diferenças encontradas no local de estabelecimento dos parasitas ao longo do TGI, revela que a suplementação possibilitou aos animais que a receberam, montar uma resposta mais eficiente ao desafio parasitário, novamente reforçando a tese acima apresentada. Os animais pertencentes ao grupo suplementado infectado apresentaram lesões teciduais mais exuberantes, que se refletiram nas maiores taxas de excreção urinária de nitrogênio, na “expulsão” dos parasitos para porções distais do TGI, em menores alterações nos níveis séricos de albumina (a despeito das maiores áreas lesadas - o que reforça a maior eficiência de retenção e reciclagem dos compostos nitrogenados, tão necessários a elaboração de uma resposta competente), e em uma eficiência de retenção de nitrogênio 3,6 vezes maior que os animais mantidos na dieta basal.

Fica assim demonstrado que a suplementação protéica também demonstra efeitos positivos sobre infecções por *Cooperia punctata*, a despeito das lesões provocadas por este parasita no intestino delgado, local onde ocorre a maior parte da absorção dos compostos nitrogenados no organismo animal.

Novos estudos são necessários para uma compreensão mais exata dos mecanismos envolvidos neste processo e de como o maior aporte protéico se traduz em efetivas vantagens para o animal que enfrenta o desafio parasitário. Posteriormente deve-se partir para estudos à campo, onde a viabilidade econômica de medidas nutricionais de apoio ao combate das parasitoses dos bovinos seria avaliada.

Referências Bibliográficas

7. Referências

ABBOTT, E.M., PARKINS, J.J. & HOLMES, P.H. Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection of *Haemonchus contortus*. **Res. Vet. Sci.**, v.38, p.6-13, 1985a.

ABBOTT, E.M., PARKINS, J.J. & HOLMES, P.H. Influence of dietary protein on the pathophysiology of ovine haemonchosis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection. **Res. Vet. Sci.**, v.38, p.54-60, 1985b.

ABBOTT, E.M., PARKINS, J.J. & HOLMES, P.H. The effect of dietary protein on the pathogenesis of acute ovine haemonchosis. **Vet. Parasitol.**, v.20, p.275-289, 1986a.

ABBOTT, E.M., PARKINS, J.J. & HOLMES, P.H. The effect of dietary protein on the pathophysiology of acute ovine haemonchosis. **Vet. Parasitol.**, v.20, p.291-306, 1986b.

ALICATA, J.E. & LYND, F.T. Growth rate and other signs of infections in calves experimentally infected with *Cooperia punctata*. **Am. J. Vet. Res.**, July, 704-706, 1961.

ALLONBY, E.W. Studies on *Haemonchus contortus* infections in merino sheep. Ph.D. Thesis. University of Glasgow. 1974

ARMOUR, J.; BAIRDEN, K.; HOLMES, P.H.; PARKINS, J.J.; PLOEGER, H.; SALMAN, S.K. & McWILLIAM, P.N. Pathophysiological and parasitological studies on *Cooperia oncophora* infections in calves. **Res. Vet. Sci.**, v.42, p.373-381, 1987.

ASH, C.P.J.; CROMPTON, D.W.T. & LUNN, P.G. Impact of *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda) on the serum albumin and amino acid concentrations of rats fed adequate or protein-deficient diets. **Parasitology**, v.90, p.157-168, 1985.

De acordo com:

AASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index medicus. Bethesda: NLM, 1997.

ASH, A.J. & NORTON, B.W. Studies with the Australian Cashmere Goat. II- Effects of dietary protein concentration and feeding level on body composition of male and female goats. **Aust. J. Agri. Res.**, v.38, p.971-982, 1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (USA) Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. Washington, D.C., USA, 1970.

BAILEY, W.S. Studies on calves experimentally infected with *Cooperia punctata* (v. Linstow, 1907) Ransom, 1907. **Am.J.Vet.Res.**, April, p. 119-129, 1949.

BARNES, E.H. & DOBSON, R.J. Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: mathematical model of worm fecundity. . **Int. J. Parasitol.**, v.20, nº 3, p.375-380, 1990.

BAWDEN, W.R. The relationships between *Oesophagostomum colombianum* infection and the nutritional status of sheep. **Aust. J. Agri. Res.**, v. 20, p. 589-599, 1969.

BIANCHIN, A.; HONER. M.R.; NASCIMENTO, Y.A. Epidemiology of helminths in nellore beef cattle in the Cerrados of Brazil. In: GUERREIRO, J.; LEANING, W.H.D. Epidemiology of bovine parasites in the Americas, WORLD BUIATRICS CONGRESS BY MSD AGVET, 16., Salvador, Bahia, 1990. Proceedings. p.41-47.

BLACKBURN, H.D.; ROCHA, J.L.; FIGUEIREDO, E.P.; BERNE, M.E.; VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.R. & ROSA, J.S. Interaction of parasitism and nutrition and their effects on production and clinical parameters in goats. **Vet. Parasitol.**, v.40, p.99-112, 1991.

BOWN, M.D.; POPPI, D.P. & SYKES, A.R. The effect of mixed infection on the site of plasm protein absorption in the small intestine. **Can. J. An. Sci.**, v.64, p.197-198, 1984.

BOWN, M.D.; POPPI, D.P. & SYKES, A.R. The effect of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in Lambs. **Aust. J. Agric. Res.**, v.42, p.253-267, 1991a.

BOWN, M.D.; POPPI, D.P. & SYKES, A.R. Nitrogen transactions along the digestive tract of lambs concurrently infected with *Trichostrongilus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta*. **Brit. J. Nutrition**, v.66, p.237-249, 1991b.

BREMNER, K.C. The pathophysiology of Parasitic gastro-enteritis of cattle. In: SYMONS L.E.A., DONALD, A. & DINEEN, J. (Eds.) Biology and control of endoparasites. Australia: Academic Press, 1982, p.277-289.

BRUNDSON, R.B. The effect of nutrition on the establishment and persistence of Trichostrongyle infection. **New Zeal. Vet. J.**, v. 12, p. 108-111, 1964.

CHEEMA, K.J. & SCOFIELD, A.M. The influence of level of infection of rats with *Nippostrongylus brasiliensis* on the Haematology and Phospholipase activity and mast cell numbers in the small intestine and colon. **Int. J. Parasitol.**, v.15, nº 1, p. 55-60, 1985.

COOP, R.L.; SYKES, A.R. & ANGUS, K.W. The pathogenicity of daily intakes of *Cooperia oncophora* larvae in growing calves. **Vet. Parasitol.**, v.5, p.261-269, 1979.

COOP, R.L.; SYKES, A.R. & ANGUS, K.W. The effect of three levels of larval intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on growth rate, food intake and body composition of growing lambs. **J. Agri. Sci.**, v.98, p.247-255, 1982.

COOP, R.L.; HUNTLEY, J.F. & SMITH, W.D. Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. **Res. Vet. Sci.**, v.59, p.24-29, 1995.

COOP, R.L. & HOLMES, P.H. Nutrition and parasite interaction. **Int. J. Parasitol.**, v.26, nº 4, p., 1996.

DOBSON, C. & BAWDEN, W.R. Studies on the immunity of sheep to *Oesophagostomum colombianum* : effects of low protein diet on resistance to infection and cellular reactions in gut. **Parasitol.**, v. 69, p. 239-255, 1974.

DOBSON, R.J.; WALLER, P.J. & DONALD, A.D. Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: the effect of infection rate on loss of adult parasites. . **Int. J. Parasitol.** v.20, nº 3, p.359-363, 1990

DORCHIES, P.; BERGEAUD, J.P.; VAN KHAN, N. & MORAND, S. Reduced egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils? **Parasitol. Res.**, v.83, p.727-730, 1997.

ENERBÄCK, LO.; LINDENGER, G.; LOO, T.L. & GRANERUS, G. Cellular repository for blood histamine in normal and nematode-infected rats. **Agents & actions**, v.16, nº 3/4, p. 87-90, 1985.

ENTROCASSO, C.M.; McKELLAR, Q.; PARKINS, J.J.; BAIRDEN, K.; ARMOUR, J. & KLOOSTERMAN, A. The sequential development of type I and type II ostertagiasis in young cattle with special reference to biochemical and serological changes. **Vet. Parasitol.**, v.21, p.173-188, 1986a.

ENTROCASSO, C.M.; PARKINS, J.J.; ARMOUR, J.; BAIRDEN, K.; & McWILLIAM, P.N. Production, parasitological and carcass evaluation studies in steers exposed to trichostrongyle infection and treated with a morantel bolus or febendazole in two consecutive grazing seasons. **Res. Vet. Sci.**, v.40, p.76-85, 1986b.

ENTROCASSO, C.M., 1987. Economic impact of gastrointestinal verminosis in temperate climate areas of South America, with special reference to Argentina. In: Proceedings of MSD AGVET Symposium "The Economic Impact of Parasitism in Cattle", pg. 53-58.

GENNARI, S.M.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. & ROGERO, J.R. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Vet. Parasitol.**, v.38, p.163-172, 1991.

GENNARI, S.M.; ABDALLA, A.L., VITTI, D.M.S.S., MEIRELLES, C.F.; LOPES, R.S. & VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. *Haemonchus placei* in calves: effects of dietary protein and multiple experimental infection on worm establishment and pathogenesis. **Vet. Parasitol.** , v.59, p.119-126, 1995.

GENNARI, S.M.; ABDALLA, L.A. LOUVANDINI, H. & VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. Influence of dietary protein on water metabolism in calves infected with *Haemonchus placei*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** , v.6, nº 2, p.133-138, 1997.

GUIMARÃES, M.P.; COSTA, H.M.A.; FREITAS, M.G.; COSTA, J.O. Intensidade parasitária por nematóides no tubo digestivo de bezerros em diferentes faixas etárias. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v.27, p. 67-72, 1975.

HERNDON, F.J. & KAYES, S.G. Depletion of eosinophils by anti-IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. **J. Immunol.** , v.149, p.3642-3647, 1992.

HOHENHAUS, M.A. & OUTERIDGE, P.M. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. **Br. Vet. J.** , v.151, p.119-140, 1995.

HOLMES, P.H. Pathophysiology of Nematode Infections. In: Proceedings of MSD AGVET Symposium "The Economic Impact of Parasitism in Cattle". 1987. pg. 29-34.

HONER, M.R.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. Nematóides de bovinos no Brasil – Situação da pesquisa – 1991. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.1, nº 1, p. 67-79, 1992.

HOUTERT, M.F.J.; BARGER, I.A. & STEEL, J.W. Dietary protein for young grazing sheep: interactions with gastrointestinal parasitism. **Vet. Parasitol.**, v. 60, p. 283-295, 1995.

HUNTLEY, J.F.; NEWLANDS, G.F.J. & MILLER, H.R.P. The isolation of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. **Parasite Immunol.** , v.6, p.371-390, 1984.

HUNTLEY, J.F. Mast cells and basophils: A review of their heterogeneity and function. **J. Comparative Pathol.**, v.14, p.429-440, 1992.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY/ FAO. Use of tritiated water in studies of production and adaptation in ruminants. Viena, IAEA, 1982. 218 p. (STI Publ. 576).

ISRAF, D.A.; COOP, R.L.; STEVENSON, L.M.; JONES, D.G.; JACKSON, F.; JACKSON, E.; MACKELLAR, A. & HUNTLEY, J.F. Dietary protein influences upon immunity to *Nematodirus battus* infection in lambs. **Vet. Parasitol.**, v.61, p.273-286, 1996.

ISRAF, D.A.; ZAINAL, M.J.; BEN-GHESHIR, M.A.; RASEDEE, A. SANI, R.A. & NOORDIN, M.M. Dietary protein influences on regulation of *Haemonchus contortus* populations in Dorsimal lambs. **J. Helmintol.**, v.72, p.143-146, 1998.

JONES, W.O. & SYMONS, L.E.A. Protein synthesis in the whole body, liver, skeletal muscle and kidney cortex of lambs infected by the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Int. J. Parasitol.** , v.12, n^o 4, p.295-301, 1982.

KAMBARA, T.; McFARLANE, R.G., ABELL, T.J., McANULTY, R.W. & SYKES, A.R. The effect of age and dietary protein on immunity and resistance in lambs vaccinated with *Trichostrongylus colubriformis*. **Int. J. Parasitol.**, v.23, n^o 4, p.471-476, 1993.

KAMIS, A.B.; AHMAD, R.A. & BADRUL-MUNIR, M.Z. Worm burden and leukocyte response in *Angiostrongylus malysiensis*-infected rats: the influence of testosterone. **Parasitol. Res.** , v.78, p.388-391, 1992.

KEITH, R.K. The pathogenicity of experimental infections of *Cooperia pectinata* (Ranson, 1907) in calves. **Aust. J. Agric. Res.**, v.18, p.861-864, 1967.

KEMPSTER, T.; AVIS, P.R.D.; CUTHBERTSON, A. & HARRINGTON, G. Prediction of the lean content of lamb carcasses of different breed types. **J. Agri. Sci.**, v.86, p. 23-24, 1976.

KIMAMBO, A.E.; Mac RAE, J.C.; WALKER, A.; WATT, C.F. & COOP, R.L. Effect of prolonged subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis* on the performance and nitrogen metabolism on growing lambs, **Vet. Parasitol.**, v.28, p. 191-203, 1988.

KYRIAZAKIS, I.; ANDERSON, D.H.; OLDHAM, J.D.; COOP, R.L. & JACKSON, F. Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. **Vet. Parasitol.** , v.61, p.297-313, 1996a.

KYRIAZAKIS, I.; ANDERSON, D.H.; COOP, R.L. & JACKSON, F. The pathophysiology and development of immunity during long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis* of sheep receiving different nutritional treatments. **Vet. Parasitol.**, v.65, p.41-54, 1996b.

LAURENCE, G.B.; GROENEWALD, J.W.; QUINN, J.L.; CLARK, R.; ORTLEPP, R.S. & BOSMAN, S.W. The influence of nutritional level on verminosis in Merino lambs. **Onders. J. Vet. Res.**, v. 25, p. 121-132, 1951.

LIMA, W.S. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State – Brazil. **Vet. Parasitol.** , v.74, p.203-214, 1998.

MACKENZIE, C.D. & SPRY, C.J.F. Selective localization of intravenously injected ¹¹¹indium-labelled eosinophils in rat tissues infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunol.** , v.5, p.151-163, 1983.

MACLEAN, J.M.; BAIRDEN, K.; HOLMES, P.H.; MULLIGAN, W. & McWILLIAM, P.N. Sequential in vivo measurements of body composition of calves exposed to natural infection with gastrointestinal nematodes. **Res. Vet. Sci.** , v.53, p.381-389, 1992.

MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION, MARKETING DEPARTMENT (1975) Instructions for assessment, photography, jointing, retail cutting and tissue separation of beef carcasses. Memo leaflet.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Sixth revised edition, National Academic Press, Washington, D.C., 1988.157 pgs.

PARKINS, J.J.; HOLMES, P.H. & BREMNER, K. The pathophysiology of ovine ostertagiasis: some nitrogen balance and digestibility studies. **Res. Vet. Sci.**, v. 14, p. 21-28, 1973.

PARKINS, J.J. & HOLMES, P.H. Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition. **Nutri. Res. Rev.** , v.2, p.227-246, 1989.

PARKINS, J.J.; TAYLOR, L.M.; HOLMES, P.H.; BAIRDEN, K.; SALMAN, S.K.; ARMOUR, J. Pathophysiological and parasitological studies on concurrent infections of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. **Res. Vet. Sci.**, v. 48, p. 201-208, 1990.

PATTERSON, M.S. & GREENE, R.C. Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsion. **Anal. Chem.**, v.37, p. 854-57, 1965.

PATERSON, D.M.; JACKSON, F.; HUNTLEY, J.F.; STEVENSON, L.M.; JONES, D.G.; JACKSON, E. & RUSSEL, A.J.F. The response of breeding does to nematodiasis: segregation into “responders” and “non-responders”. **Int. J. Parasitol.** v.26, nº 11, p.1295-1303, 1996.

PLOEGER, H.W.; KLOOSTERMAN, A.; RIETVELD, F.W. & BERGHEN, P. Weight gain and the course of some estimators of gastrointestinal nematode infection in calves during winter housing in relation to the level of exposure during the previous grazing season. **Vet. Parasitol.** , v.56, p.91-106, 1995.

POPPI, D.P.; Mac RAE, J.C.; & CORRIGALL, W. Nitrogen digestion in sheep infected with intestinal parasites. **Proceedings of Nutri. Soc.**, v.40, p.1164, 1981.

POPPI, D.P.; Mac RAE, J.C.; BREWER, A. & COOP, R.L. Nitrogen trasactions in the digestive tract of lambs exposed to the intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis*. **British. J. Nutri.**, v.55, p.593-602, 1986.

POPPI, D.P.; SYKES, A.R. & DYNES, R.A. The effect of endoparasitism on host nutrition – the implications for nutrient maniplulation. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.50, p.237-243, 1990.

POMPEU, J.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; ABDALLA, L.A. & GENNARI, S.M. Body water meatbolism, water and nitrogen balance in calves harboring different infection levels of *Haemonchus placei*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** , v.6, nº 2, p.123-132, 1997.

ROTHWELL, T.L.W. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. **Int. J. Parasitol.** , v.19, nº 2, p.139-168, 1989.

ROTHWELL, T.L.W.; WINDON, R.G.; HORSBURGH, B.A. & ANDERSON, B.H. Relationship between eosinophilia and responsiveness to infection with *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. **Int. J. Parasitol.** , v.23, nº 2, p.203-211, 1993.

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. **British J. Nutri.** , v.59, p.125-139, 1988.

SATRIJA, F.; NANSEN, P. Experimental infections with *Cooperia oncophora*. A study with two different larval dose levels and dosing regimens. **Acta Vet. Scand.**, v. 33, p. 229-236, 1992.

SHALM, O.W. Veterinary Hematology. Lia & Febiger - Philadelphia, 1975. 807 pgs.

SMITH, N.C. & BRYANT, C. Free radical generation during primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunol.**, v.11, p.147-160, 1989.

STANKIEWICZ, M.; JONAS, W.E.; DOUCH, P.C.G.; RABEL, B.; BISSET, S. & CABAJ, W. Globule leucocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. **J. Parasitol.**, v.79, n^o 6, p.940-945, 1993.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DOLIGALSKA, M.; DUNCAN, J.L.; HOLMES, P.H.; IRVINE, J.; McCRIE, L.; McKELLAR, Q.A.; SINSKI, E. & MURRAY, M. Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. **Parasite Immunol.**, v.17, p.643-652, 1995.

STEEL, J.W.; SYMONS, L.E.A. & JONES, W.O. Effects of level of larval intake on the productivity and physiological and metabolic responses of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **Aust. J. Agri. Res.**, v.31, p.821-838, 1980.

STEEL, J.W.; JONES, W.O. & SYMONS, L.E.A. Effects of a concurrent infection *Trichostrongylus colubriformis* on the productivity and physiological and metabolic responses of lambs infected with *Ostertagia circumcincta*. **Aust. J. Agri. Res.**, v.33, p.131-140, 1982.

SUAREZ, V.H.; LORENZO, R.M.; BUSETTI, M.R. & SANTUCHO, G.M. Physiological and parasitological responses to nematode infection of fattening cattle in the western pampas of Argentina. **Vet. Parasitol.**, v.81, p.137-148, 1999.

SYKES, A.R. & COOP, R.L. Intake and utilization of food by growing lambs with parasitic damage to the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. **J. Agri. Sci.**, v.86, p.507-515, 1976.

SYKES, A.R.; COOP, R.L. & ANGUS, K.W. The influence of chronic *Ostertagia circumcincta* infection on the skeleton of growing sheep. **J. Comp. Pathol.** , v.87, p.521-529, 1977.

SYKES, A.R.; COOP, R.L. & ANGUS, K.W. Chronic infection with *Trichostrongylus vitrinus* in sheep. Some effects on food utilization, skeletal growth and certain serum constituents. **Res. Vet. Sci.**, v.26, p.372-377, 1979.

SYMONS, L.E.A. & JONES, W.O. *Trichostrongylus colubriformis*: Changes of host body mass and protein synthesis in Guinea pigs with light to heavy infections. **Exp. Parasitol.** , v.44, p.7-13, 1978.

SYMONS, L.E.A. & HENNESSY, D.R. Cholecystikinin and anorexia in sheep infected by the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Int. J. Parasitol.** , v.11, p.55-58, 1981.

SYMONS, L.E.A. Anorexia: occurrence, pathophysiology and possible causes in parasitic infections. **Advances in Parasitology**, v 24, p 103-133, 1985.

TÁVORA, J.P.F. Hemograma de bovinos das raças Gir, Girolando e Holandesa criados no Estado de São Paulo : estabelecimento dos valores de referência e avaliação das influências de variabilidades raciais, etárias e sexuais. [São Paulo, 1997. 163 p. Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo, 1997.]

UPTON, S.J.; MAYBERRY, L.F.; BRISTOL, J.R.; FAVELA, S.H. & SAMBRANO, G.R. Suppression of peripheral eosinophilia by the coccidium *Eimeria nieschulzi* (Apicomplexa: eimeriidae) in experimentally infected rats. **J. Parasitol.** , v.73, n^o 2, p.300-308, 1987.

VAN HOUTERT, M.F.J. & SYKES, R.S. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal infections. **Int. J. Parasitol.**, v.26, n^o 11, p.1151-1168, 1996.

VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; GENNARI, S.M. & ABDALLA, A.L. Body composition of calves infected with *Haemonchus contortus* estimated by tritiated water technique. **Rev. Bras. Paras. Vet.**, v1, n^o 1, p.17-21, 1992.

VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; GENNARI, S.M.; SANTOS FILHO, J.P.; ROGERO, J.R. Pathophysiological observations on calves concurrently infected with *Cooperia punctata* and *Haemonchus placei*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, nº 1, p.53-64, 1995.

VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; GENNARI, S.M.; ABDALLA, A.L.; POMPEU, J. Body composition, water and nitrogen balance in calves infected with *Cooperia punctata*. **Rev. Bras. Paras. Vet.**, v.5, nº 2, p.123-132, 1996.

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.J. The influence of supplementation with dietary soyabean meal on resistance to haemonchosis in Hampshire down lambs. **Res. Vet. Sci.**, v.58, p.232-237, 1995.

WALLACE, D.S.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; ECKERSALL, P.D.; FISHWICK, G.; GILL, M.; HOLMES, P.H.; McKELLAR, Q.A.; MURRAY, M. & PARKINS, J.J. The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v.116, p.67-72, 1998.

WHITLOCK, H.V. Some modifications of the Mc Master helminth egg-counting technique and apparatus. **J. Counc. Sci. Ind. Res.**, v.21, p.177-180, 1948

WINDON, R.G. & DINEEN, J.K & KELLY, J.D. The segregation of lambs into "responders" and "non-responders": response to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae before the weaning. **Int. J. Parasitol.**, v.10, p.65-73, 1980.

WINDON, R.G. & DINEEN, J.K. The effect of selection of both sire and dam on the response of F1 generation lambs to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae. **Int. J. Parasitol.**, v.11, nº 1, p.11-18, 1981.

WINTER, M.D.; WRIGHT, C. & LEE, D.L. The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. **Parasitology**, v.114, p.189-193, 1997.

WOOLASTON, R.R.; MANUELI, P.; EADY, S.J.; BARGER, I.A.; LE JAMBRE, L.F.; BANKS, D.J.D. & WINDON, R.G. The value of circulating eosinophil count as a selection criterion for resistance of sheep to Trichostrongyle parasites. **Int. J. Parasitol.** , v.26, nº 1, p.123-126, 1996.

YAKOOB, A.; HOLMES, P.H. & ARMOUR, J. Pathophysiology of gastrointestinal trichostrongyles in sheep: plasma losses and changes in plasma pepsinogen levels associated with parasite challenge of immune animals. **Res. Vet. Sci.** , v.34, p.305-309, 1983.

YATSUDA, A.P. [São Paulo, 1999. 116 p. Tese de Mestrado da Universidade de São Paulo, 1999.]

YATSUDA, A.P. & VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. Dynamics of the humoral immune response of calves infected and re-infected with *Cooperia punctata*. **Vet. Parasitol.** , v.87, p.287-300, 2000.

YONG, W.K. & DOBSON, C. Peripheral blood white cell responses during *Angiostrongylus cantonensis* infection in rats. **Int. J. Parasitol.** , v.14, nº 2, p.207-211, 1984.