

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MURILO ANTÔNIO FERNANDES

Dinâmica do metabolismo do fósforo em cordeiros submetidos a
infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus*
colubriformis utilizando o ^{32}P

Piracicaba

2021

MURILO ANTÔNIO FERNANDES

Dinâmica do metabolismo do fósforo em cordeiros submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando o ^{32}P

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

Piracicaba

2021

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca – CENA/USP

Fernandes, Murilo Antônio

Dinâmica do metabolismo do fósforo em cordeiros submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando o ³²P / Murilo Antônio Fernandes; orientador Helder Louvandini. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

79 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

1. Biodisponibilidade 2. Desempenho animal 3. Helmintologia veterinária 4. Minerais 5. Nutrição animal 6. Ovinos 7. Parasitologia veterinária 8. Radioisótopos I. Título.

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais Antônio (*in memoriam*) e Nadir, pelo apoio em todas as etapas da minha vida, sem vocês nada disso seria possível. Aos meus irmãos Max e Marcelo pelo incentivo e pela amizade. A minha esposa Katiéle e minha filha Lívia, pelo apoio, confiança e incentivo, principalmente pela paciência durante toda essa caminhada, e por acreditarem incondicionalmente em minhas escolhas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, pelas oportunidades e ter permitido de chegar até aqui.

Aos meus pais e irmãos por tudo que fizeram para conseguir alcançar meus objetivos, por apoiarem e vibrarem a cada conquista. Amo vocês!

A minha esposa e minha filha, pelo carinho, amor, paciência e apoio, que foram muito importantes para não deixar de correr atrás e alcançar este objetivo. Amo vocês!

A Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela infraestrutura e apoio fornecidos para a realização desse estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Louvandini, pela orientação, confiança, paciência, oportunidades, amizade e ensinamentos passados. Com toda certeza o senhor contribuiu para o aprimoramento de meu conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, pela amizade, contribuição, oportunidades e ensinamentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão de bolsa de estudo e auxílio financeiro para suporte da pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal do CENA, Lécio Aparecido Castilho, Maria Regina Peçanha, Karinna Scotton e Francisco Adelino da Silva, pela paciência, amizade e suporte que sempre me deram.

Aos funcionários da Pós-Graduação e demais funcionários do CENA, que de alguma forma ajudaram no decorrer do doutorado.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Nutrição Animal e demais laboratórios, muito obrigado pelo apoio, e pelos momentos de convivência.

Aos alunos, estagiários que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento do experimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

Muito obrigado!

RESUMO

FERNANDES, M. A. **Dinâmica do metabolismo do fósforo em cordeiros submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando o ³²P**. 2021. 79 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

Os ovinos necessitam de suplementação nutricional, dentre os minerais o fósforo (P) apresenta destaque pela sua importância no metabolismo destes animais, e pelas pastagens que, durante períodos de estiagem não fornece a quantidade necessária deste mineral, com custo de suplementação elevado (esgotamento de suas jazidas) e ainda risco de contaminação ambiental pela eliminação nas fezes. Objetivou-se com este estudo determinar o desempenho e metabolismo do fósforo em cordeiros submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando a técnica da diluição isotópica com ³²P. Foram utilizados 20 ovinos da raça Santa Inês, com sete meses de idade e peso inicial médio de 30,8 ± 6,41 kg. Dez animais foram infectados com dose única de 30.000 larvas L3 de *T. colubriformis* + 10.000 larvas L3 de *H. contortus*, e dez animais não foram infectados. Distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Durante o período experimental foram coletadas amostras de sangue, fezes, urina, líquido ruminal, bem como as sobras e a dieta fornecida, e realizados testes de desempenho. Os animais também foram submetidos ao exame de tomografia computadorizada, em dois momentos, antes da infecção e ao final do experimento, com o objetivo de avaliarmos possíveis alterações na composição corporal. Também foi medida a produção de metano entérico dos animais. No 64º dia após a infecção experimental os animais receberam injeção intravenosa da solução de ³²P para determinar seu fluxo pelo organismo dos animais. Decorridos 7 dias, após a injeção do radioisótopo, os animais foram abatidos com colheita e armazenagem das amostras. A infecção mista acarretou menor desempenho dos animais, pois afetou o consumo de matéria seca, diminuiu o ganho em peso. Também, foi afetada a absorção do P, e conseqüentemente a sua disponibilidade biológica, comprometendo o metabolismo e a dinâmica do mineral no organismo, prejudicando o aproveitamento do nutriente pelo animal. Houve diminuição na contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito, proteínas totais e albumina no plasma, e aumento na contagem de eosinófilos e

plaquetas. Observou-se também alterações fermentativas ruminais, com alterações no perfil de produção de AGCC, com maior produção de metano nos animais infectados. Sendo assim, conclui-se que a infecção mista reduz o consumo de matéria seca com conseqüente prejuízo no desempenho destes animais. A menor biodisponibilidade do P da dieta nos ovinos infectados altera o metabolismo, reduzindo o fluxo para os tecidos, em especial, o ósseo com perda da sua densidade, bem como alterações fermentativas ruminais, prejudicando o metabolismo nutricional, e maior produção de metano pelos animais infectados.

Palavras-chave: Endoparasitas. Fósforo. Minerais. Ovinos. Radioisótopo. Metano.

ABSTRACT

FERNANDES, M. A. **Dynamics of phosphorus metabolism in lambs submitted to mixed infection of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* using ³²P**. 2021. 79 p. Tese (Doutorado em ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

Sheep require nutritional supplementation, among the minerals phosphorus (P) is highlighted by its importance in the metabolism of these animals, and for the pastures that, during periods of drought does not provide the necessary amount of this mineral, with high supplementation cost (depletion of its deposits) and also risk of environmental contamination by elimination in feces. The objective of this study was to determine the performance and metabolism of phosphorus in lambs submitted to mixed infection of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* using isotopic dilution with ³²P. Twenty Santa Inês sheep were used, with 7 months of age and average initial weight of 30.8 ± 6.41 kg. Ten animals were infected with a single dose of 30,000 L3 larvae of *T. colubriformis* + 10,000 L3 larvae of *H. contortus*, and ten animals were not infected. Using a completely randomized design (IHD). During the experimental period, blood, feces, urine, ruminal fluid, as well as leftovers and diet samples were collected, and performance tests were performed. The animals were also submitted to computed tomography examination, in two moments, before infection and at the end of the experiment, in order to evaluate possible changes in body composition. The animals' enteric methane production was also measured. On the 64th day after experimental infection the animals received intravenous injection of the ³²P solution to determine their flow through the organism of the animals. After 7 days, after radioisotope injection, the animals were slaughtered with sampling and storage. The mixed infection caused lower performance of the animals, because it affected the dry matter intake, decreased weight gain. It affected the absorption of P, and consequently its biological availability, compromising the metabolism and dynamics of the mineral in the body, impairing the utilization of the nutrient by the animal. There was a decrease in red blood cell count, hemoglobin and hematocrit, total proteins and albumin in plasma, and an increase in the count of eosinophils and platelets. Ruminal fermentative changes were also observed, with changes in the production profile of SCFA, with higher methane production in infected animals. Thus, it is concluded that

the mixed infection reduced the consumption of dry matter with consequent impairment in the performance of these animals. The lower bioavailability of diet P in infected sheep altered their metabolism by reducing the flow to tissues, especially bone tissues with loss of density. And ruminal fermentative changes, impairing nutritional metabolism, and higher methane production by infected animals.

Keywords: Endoparasites. Phosphorus. Minerals. Sheep. Radioisotope. Methane.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 Captura de tela do Osirix MD de imagem tomográfica do lado esquerdo dos cordeiros usada para medições (A). As linhas e pontos azuis nas imagens mostram as regiões medidas. B - região da 4ª costela, C – região da 12ª costela e D – região do fêmur. Os pontos azuis, os locais específicos que os dados foram coletados..... 40
- Figura 3.2 Esquema ilustrativo da técnica de diluição isotópica usando o ³²P na avaliação da cinética do P em ovinos..... 41
- Figura 3.3 Modelo da distribuição do fósforo adaptado de Fernandez (1995)..... 42
- Figura 3.4 Média de número de ovos por grama de fezes no animais infectados por *H. contortur* e *T. colubriformis*, durante o período experimental..... 43
- Figura 3.5 Consumo diário em gramas de matéria seca (MS), dos animais não infectados e intectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*. A partir do 26º após infecção houve diferença no consumo (*) ($P < 0,05$)..... 44
- Figura 4.1 Variáveis hematológicas em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. Contagem de eritrócitos (RBC), contagem de hemoglobina (HGB), e proporção de células vermelhas (HCT). (*) Houve diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$)..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Composição bromatológica dos ingredientes da dieta experimental, com base na matéria seca à 100° C	37
Tabela 3.2	Média de ganho em peso (g/animal/dia) dos animais não infectados e infectados por <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	45
Tabela 3.3	Densidade do tecido ósseo (g / cm ³) e escala de contraste de cor em Housfield (HU) dos tecidos muscular e adiposo, dos animais não infectados e infectados por <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	46
Tabela 3.4	Médias das variáveis relacionadas a dinâmica do fósforo (P), disponibilidade biológica e meia vida biológica, Pplasma dos animais não infectados e infectados por <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	48
Tabela 3.5	Médias das variáveis relacionadas a dinâmica do fósforo (P), dos animais não infectados e infectados por <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> , durante o período experimental. (EPM = erro padrão da média).....	49
Tabela 3.6	Concentração de fósforo presente nos tecidos moles e ósseo, dos animais não infectados e infectados por <i>H. contortus</i> e <i>T. colubriformis</i> , durante o período experimental. (EPM = erro padrão da média).....	50
Tabela 4.1	Composição bromatológica dos componentes da dieta experimental em g/kg de matéria seca (MS) à 100° C.....	61
Tabela 4.2	Média das variáveis sanguíneas, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular médio (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM), em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	66
Tabela 4.3	Média das plaquetas, em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	67

Tabela 4.4	Média das Leucograma diferencial (leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos) em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	68
Tabela 4.5	Média das Leucograma diferencial (eosinófilos, monócitos e basófilos) em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	69
Tabela 4.6	Parâmetros bioquímicos em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	70
Tabela 4.7	Produção de AGCC em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	72
Tabela 4.8	Emissões de metano entérico em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	73
Tabela 4.9	Síntese proteica microbiana por derivados de purina em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . (EPM = erro padrão da média).....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Hipóteses.....	19
1.2	Objetivo Geral	19
1.3	Objetivos Específicos	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Ovinocultura no Brasil.....	21
2.2	O fósforo no metabolismo animal	22
2.3	Análise do metabolismo do fósforo através a técnica da diluição isotópica ..	24
2.4	Modelagem.....	25
2.5	Parasitismo gastrointestinal e sua influência no metabolismo de fósforo	26
	Referências.....	28
3	Desempenho e metabolismo do fósforo em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i> utilizando a diluição isotópica com ³²P	34
3.1	Resumo.....	34
3.2	Introdução	35
3.3	Material e métodos.....	36
3.3.1	Local do experimento.....	36
3.3.2	Cultivo das Larvas	36
3.3.3	Delineamento e Manejo Experimental	37
3.3.4	Consumo Alimentar, Ganho em Peso, Contagem de OPG e Carga Parasitária	38
3.3.5	Tomografia Computadorizada	39
3.3.6	Técnica de Diluição Isotópica (³² P) e Amostragem.....	40
3.3.7	Modelagem.....	42
3.4	Análises estatísticas.....	43
3.5	Resultados	43
3.5.1	Contagem de OPG e Carga Parasitária	43
3.5.2	Consumo e Ganho em Peso.....	44
3.5.3	Tomografia computadorizada.....	45
3.5.4	Metabolismo do Fósforo.....	47
3.6	Discussão.....	50
3.7	Conclusão	53
	Referências.....	54

4	Alterações hematológicas, bioquímicas e produção de metano em ovinos submetidos a infecção mista de <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i>.	58
4.1	Resumo	58
4.2	Introdução	59
4.3	Material e métodos	60
4.3.1	Local do Experimento	60
4.3.2	Cultivo das Larvas	60
4.3.3	Delineamento e Manejo Experimental	61
4.3.4	Consumo Alimentar e Coletas de Sangue	62
4.3.5	Coleta de Líquido Ruminal e Metano Entérico	63
4.3.6	Coleta Urina e Determinação da Síntese de Proteína Microbiana	63
4.4	Análises estatísticas	64
4.5	Resultados	64
4.5.1	Contagem de Células Sanguíneas	64
4.5.2	Variáveis Bioquímicas	70
4.5.3	Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)	71
4.5.4	Quantificação do Metano Entérico	72
4.5.5	Síntese de Proteína Microbiana por Derivados de Purina	73
4.6	Discussão	73
4.7	Conclusão	76
	Referências	76
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um mercado incipiente no consumo de carne ovina, pois tradicionalmente o maior consumo concentra-se na carne bovina, suína e frango. Ressalta-se que a produção nacional não atende ao mercado consumidor interno, necessitando de importação. O país tem potencial para o desenvolvimento da ovinocultura e mesmo assim o número total de cabeças produzidas vem apresentando crescimento lento ao longo dos últimos anos.

A maior parte do rebanho de corte no país em sistemas de criação extensivo e semi-intensivo, tendo a pastagem como a principal fonte nutricional, apresentando um desempenho produtivo baixo. A maioria dos animais são mantidos em instalações que não permitem um manejo sanitário adequado, dificultando assim a prevenção e controle de doenças, apresentando elevado nível de contaminação por agentes infecciosos e parasitários. Além disso, há, baixo nível de adoção das medidas tecnológicas disponíveis, ou quando são empregadas, utilizam-nas de maneira inadequada.

Entre os fatores que interferem no desempenho produtivo dos animais em países tropicais e subtropicais, as parasitoses gastrintestinais estão entre as principais. A saúde do rebanho depende de controle parasitário efetivo para que se mantenha os animais saudáveis, caso contrário a criação torna-se inviável economicamente, devido à baixa produtividade, pois afeta a digestão e absorção de nutrientes. No Brasil, a ovinocultura tem como base a produção à pasto, que favorece a contaminação destes animais por endoparasitas, pois estes se mantêm endêmicos, pois o controle nas pastagens se torna difícil, devido a resistência do parasita no ambiente. Esta situação pode afetar todas as fases da produção, porém os animais jovens e as fêmeas no periparto são mais susceptíveis, sofrendo maiores danos, inclusive mortalidade.

Entre os parasitas gastrintestinais, os mais comuns são os pertencentes à família *Trichostrongylidae*, destacando-se o *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Ostertagia* spp. e *Nematodirus* spp. Nesse sentido, a maior importância ocorre nas infecções mistas pelo *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, devido principalmente a patogenicidade, prevalência e intensidade da

infecção causada por eles, e também pela população destes parasitas apresentarem resistência aos anti-helmínticos, que ocorrem de maneira predominante.

Nas verminoses gastrintestinais, os endoparasitas que ali se alojam podem interferir na ingestão voluntária de alimentos com quadro de inapetência e/ou interferindo na absorção dos nutrientes. Entre os nutrientes que pode apresentar redução de absorção podemos destacar o fósforo (P), macromineral essencial e de vital importância para o metabolismo animal, devido a sua participação em diversas vias metabólicas, seja na forma de ATP (energia), composição óssea, massa muscular (proteína), produção de leite etc. Esta falha na absorção de minerais pode provocar redução do crescimento do esqueleto, da densidade óssea e da mineralização.

Em ruminantes, o fósforo ocupa o segundo lugar entre os minerais presentes no organismo, sendo reconhecido como um dos principais nutrientes, provavelmente, o mais utilizado como suplemento para esses animais devido ao fato da dieta à pasto não suprir as necessidades nutricionais dos ruminantes para este mineral. Além disto, há grande interesse no estudo do metabolismo do P, não apenas com finalidade nutricional para o ruminante, mas com o objetivo de diminuir a contaminação do ambiente provocada pela intensificação da produção destes animais. Os excrementos representam importante fonte de contaminação, com resíduos ricos em P. A diminuição da absorção de P pode estar presente em animais infectados por *T. colubriformis*, pois estes estão localizados principalmente na porção inicial do intestino delgado, local onde ocorre a maior parte da absorção deste mineral.

Os elementos minerais como o P, após a absorção intestinal, circulam continuamente no sangue, linfa, órgãos e tecidos, e são eliminados. Vários métodos experimentais para a apresentação das exigências mínimas de P para determinada espécie animal estão descritos na literatura, porém, a eficiência destes métodos pode ser prejudicada, principalmente para animais parasitados por helmintos gastrintestinais. Objetivando aperfeiçoar estas técnicas para a determinação da dinâmica de P no organismo animal, alguns trabalhos utilizando a metodologia da diluição isotópica com o radioisótopo (^{32}P) como traçador para mapear a cinética do P nos diferentes tecidos em ruminantes foram realizados. Porém, trabalhos empregando a técnica de diluição isotópica e modelagem de P em ruminantes infectados por endoparasitas são poucos.

Sendo assim, a compreensão das alterações que ocorrem na fisiologia de animais infectados com endoparasitas é fundamental para auxiliar na tomada de decisão a respeito do controle de endoparasitas no indivíduo infectado, assim como ação preventiva do restante do rebanho e do pasto. Adicionalmente, compreender essas alterações fisiológicas pode representar uma ferramenta importante para evitar o fornecimento excessivo de nutrientes aos animais (perdas econômicas) e conseqüentemente à contaminação ambiental.

1.1 Hipóteses

A principal hipótese deste estudo é de que a ação patogênica da infecção mista, por *H. contortus* e *T. colubriformis*, afeta a capacidade absorptiva do fósforo no animal infectado, prejudicando assim o fluxo do mineral através do organismo, a sua utilização pelos tecidos, comprometendo o seu metabolismo.

A infecção mista por *H. contortus* e *T. colubriformis* prejudica o consumo e o aproveitamento da dieta em cordeiros parasitados, acarretando baixo desenvolvimento e desempenho. Promovendo também alterações hematológicas e bioquímicas no organismo animal.

1.2 Objetivo Geral

Objetivou-se com este estudo determinar o desempenho e metabolismo do fósforo em cordeiros submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando a diluição isotópica com ^{32}P .

1.3 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da infecção mista na absorção e fluxo do P entre os tecidos.
- Avaliar as perdas do fósforo pelas fezes em decorrência da infecção por endoparasitas.
- Avaliar a influência da infecção mista nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em ovinos parasitados.
- Estudar a influência da infecção mista na emissão de metano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura no Brasil

A produção de carne ovina no Brasil é uma atividade que vem se desenvolvendo gradativamente no país nos últimos anos. Porém, a produção ainda é insuficiente para atender à demanda interna do mercado consumidor, que vem crescendo nos últimos anos, principalmente na região sudeste do país (SENAR, 2019). Essa situação demonstra que o país tem potencial para o desenvolvimento da ovinocultura e mesmo assim o número total de cabeças produzidas vem apresentando valores constantes ao longo dos últimos anos (ANDRADE, 2015).

Os sistemas de criação adotados pela maior parte dos produtores no Brasil contribuem para o desempenho produtivo baixo da ovinocultura nacional. A maioria dos animais são mantidos em instalações que não permitem manejo sanitário adequado, dificultando assim a prevenção e controle de doenças, apresentando elevado nível de contaminação por agentes infecciosos e parasitários. Além disso, há baixo nível de adoção das medidas tecnológicas disponíveis, ou quando são empregadas, utilizam-nas de maneira inadequadas (ALENCAR et al., 2010; BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2011).

As parasitoses gastrintestinais estão entre os principais problemas sanitários na produção de pequenos ruminantes, e os sistemas de criação a pasto, utilizado pela maioria dos produtores, favorecem a contaminação parasitária destes animais. A saúde do rebanho depende de controle parasitário efetivo para que se mantenha os animais saudáveis, caso contrário a criação torna-se inviável economicamente, devido à baixa produtividade, pois afeta a digestão e absorção de nutrientes. Esta situação pode afetar todas as fases da produção, porém os animais jovens e as fêmeas no periparto são mais susceptíveis, sofrendo maiores danos, inclusive mortalidade (AMARANTE; DA SILVA; RAGAZO, 2014; TEIXEIRA; CAVALCANTE; VIEIRA, 2015).

2.2 O fósforo no metabolismo animal

O fósforo (P) apresenta as mais variadas funções, sendo um dos principais elementos estruturais do organismo animal. Além da sua grande importância na formação do tecido ósseo, onde 80 a 85% do total de P está localizado no tecido ósseo (LOUVANDINI et al., 2008), também faz parte do metabolismo de aminoácidos, proteínas e lipídeos e está envolvido na produção de energia (COX; NELSON, 2008). O fósforo participa ainda, na manutenção e integridade celular, na regulação do equilíbrio acidobásico e da pressão osmótica (ENSMINGER; OLDFIELD; HEINEMANN, 1990). Em ruminantes, o fósforo também é essencial ao metabolismo e desenvolvimento da microbiota ruminal (BREVES; SCHRÖDER, 1991), devido à sua função tamponante contra o baixo pH do rúmen, e de fazer parte da nutrição da microbiota ruminal (VITTI; KEBREAB, 2010).

Em ruminantes, o fósforo ocupa o segundo lugar entre os minerais presentes no organismo animal, sendo reconhecido como um dos principais nutrientes. A maior parte das pastagens apresenta níveis de fósforo abaixo das necessidades mínimas dos animais (VITTI; KEBREAB, 2010). Sendo assim, é o macromineral mais caro e utilizado como suplemento para esses animais (GOFF, 2018; WU et al., 2001). Além disso, há grande interesse no estudo do metabolismo do P, não apenas com finalidade econômica e nutricional para a produção de ruminantes, mas também com o objetivo de diminuir a contaminação ambiental provocada pela intensificação da produção destes animais. Os excrementos representam importante fonte de contaminação, com resíduos ricos em P, tendo em vista que a rota de excreção deste mineral nos ruminantes é feita via fezes (TAMMINGA, 2003).

A deficiência de minerais, particularmente a de P, é um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade dos rebanhos brasileiros, representando perdas econômicas aos produtores. A deficiência não é incomum, principalmente devido ao alto custo da suplementação de P, pois há escassez das reservas naturais. O suprimento adequado de fósforo de P evita gastos desnecessários no caso de uso em excesso do mineral e também contribui para um melhor desempenho do rebanho (DE SOUSA et al., 2018; GOFF, 2018).

O P é ingerido pelo animal na forma de fosfatos orgânicos ou compostos inorgânicos. Nas rações fornecidas aos animais, a fonte mais comum utilizada de P tem origem rochosa, devido a maior viabilidade de compra e palatabilidade, sendo a mais usada o fosfato bicálcico (DIAZ GONZALEZ; OSPINA; BARCELLOS, 1998). A concentração ruminal de P é constituída pelo P da dieta, e pelo P endógeno, proveniente da secreção salivar, que representa uma importante via de reciclagem de P, e representa 50 a 70% do P presente no rúmen, e de vital importância para a homeostase ruminal (VITTI; KEBREAB, 2010).

Em comparação aos animais monogástricos, os ruminantes apresentam algumas particularidades no que diz respeito à regulação da homeostase do mineral, que pode ser considerada uma interação combinada entre a absorção, excreção, retenção, secreção e reciclagem gastrintestinal, a mobilização óssea, e a excreção renal para manter as concentrações fisiológicas ideais no sangue (WILKENS; MUSCHER-BANSE, 2020). A absorção do P pode ocorrer em todas as porções do rúmen, e nos intestinos delgado e grosso, sendo a maior parte absorvida no duodeno e jejuno (GOFF, 2018; REINHARDT; HORST; GOFF, 1988). O P não absorvido em ruminantes é excretado via fezes em ruminantes, contrastando aos animais não ruminantes, nos quais os rins constituem o principal mecanismo de controle do metabolismo do P (VITTI; ABDALLA; CLETO DA SILVA FILHO, 1991).

Uma vez absorvido no trato gastrintestinal, o P chega ao sangue, que é considerado um “pool” central de reservas minerais prontamente metabolizáveis, uma vez que estão prontos para ser utilizado e retido pelos órgãos e tecidos, principalmente o armazenamento no tecido ósseo, considerado o grande reservatório de P (LOUVANDINI; VITTI, 1996). O fluxo de P entre o sangue e o osso é contínuo, ocorrendo retenção ou absorção óssea, que está intimamente correlacionada aos níveis plasmáticos de P, garantindo a homeostase de P para o organismo animal (REINHARDT; HORST; GOFF, 1988; WILKENS; MUSCHER-BANSE, 2020).

Segundo Louvandini et al. (2008) nos ruminantes fatores como a idade, estágio fisiológico, condições nutricionais e hígidez são responsáveis pela grande variação que ocorre entre as trocas bioquímicas do fósforo nos tecidos e seus fluidos. Teores inadequados desse mineral no organismo podem resultar da sua falta na dieta ou de uma absorção prejudicada. Nas verminoses os endoparasitas se alojam no sistema

digestório e podem atuar reduzindo a ingestão de alimento com quadro de inapetência e/ou interferindo no processo de absorção dos nutrientes.

2.3 Análise do metabolismo do fósforo pela técnica da diluição isotópica

Os ensaios de metabolismo são importantes na nutrição animal para melhor compreensão das necessidades de nutrientes e fluxos em todo o organismo animal. Em estudos minerais, as técnicas mais comuns aplicadas são o uso de dietas livres de nutrientes, dietas múltiplas utilizando níveis crescentes de nutrientes ou marcadores de nutrientes (COELHO DA SILVA; LEÃO, 1979). Para todas essas técnicas, quando o estudo visa determinar o metabolismo mineral, os animais precisam ser abatidos para avaliar a concentração desses nutrientes no ossos e tecidos moles, e determinar a dinâmica do sistema mineral (LOFGREEN; GARRETT, 1968; ROCHA et al., 2012).

Em relação aos estudos envolvendo marcadores para determinar o metabolismo, o radioisótopo é classificado como preciso para determinação do metabolismo sistêmico, a verdadeira eficiência de absorção e as perdas endógenas, considerando que o isótopo terá as mesmas propriedades químicas, físicas ou biológicas em comparação com o elemento estável (CANTONE; GIUSSANI, 2001). A técnica de diluição isotópica aplicada para determinar a dinâmica P envolve a incorporação de quantidade conhecida de ^{32}P (isótopo radioativo) como substância rastreadora aplicada no animal, após a condição isotópica de estado estável, são realizadas medições em todo o sistema (sangue, osso, tecido mole), trato gastrintestinal e excreções (fezes, urina) (VITTI; KEBREAB, 2010). Além disso, os elementos radioativos têm característica particulares (emissão de partículas ou ondas eletromagnéticas) capazes de serem detectadas e medidas.

Considerando estudos envolvendo a determinação do metabolismo P, Kleiber et al. (1951) utilizaram ^{32}P para determinar P endógeno fecal e digestibilidade total. Em ovinos, o pico máximo de excreção de ^{32}P nas fezes de ocorre 24 horas após a injeção intravenosa (VITTI; ABDALLA; SILVA FILHO, 1991), após o pico, o ^{32}P nas fezes diminuem em uma curva exponencial, esta expressão matemática é usada para determinar a perda endógena e a absorção real de P (COMAR et al., 1953).

A determinação da perda endógena de P foi aperfeiçoada por Kleiber et al. (1951), que possibilitou a disseminação da metodologia baseada no uso de ^{32}P . Através da técnica foi possível demonstrar que existe relação linear entre o consumo e a perda endógena de P (LOUVANDINI, 1995). Outros estudos foram realizados utilizando o ^{32}P e ^{45}Ca para determinar a cinética desses minerais no organismo animal (BOMPADRE et al., 2021; BUENO; VITTI, 1999; DIAS et al., 2007; LOUVANDINI; VITTI, 2007; SILVA et al., 2018).

2.4 Modelagem

Em decorrência da grande disponibilidade de informações e do conhecimento científico gerado nos amplos ramos da ciência, os cientistas têm se voltado a simular e desenvolver modelos matemáticos que possam se ajustar aos fenômenos biológicos. Esses modelos podem ser estocásticos, envolvendo componentes obtidos de forma casualizada, ou determinísticos, podendo, nas duas situações, representarem descrições de grupos populacionais dentro de um espaço de tempo ou tratar de processos dinâmicos (COULSON; BROWN; ROTHERY, 1995).

No estudo de sistemas biológicos, a análise compartimental tem sido bastante usada para sintetizar modelos mais simples, que simulam o comportamento da cinética do traçador analisado. A resolução final do problema requer uma compreensão de cada reação ou processo envolvido com o traçador. Grace (1981) destaca que os compartimentos não podem ser definidos em termos anatômicos, porém, estão, provavelmente, relacionados aos processos metabólicos. Relata ainda, que é importante a hipótese estabelecida no modelo de que seja constante o fluxo de entrada e de saída de fósforo nos compartimentos.

Schneider et al. (1985) destacaram que em estudo com modelos compartimentais devem ser estabelecidas as seguintes suposições ordenadas: primeiro, as cinéticas do sistema são lineares, ou seja, a quantidade do mineral absorvido é proporcional à concentração do mineral presente no sistema; segundo, o traçador mistura-se uniformemente no *pool* lábil associado; terceiro, o metabolismo do animal permanece em equilíbrio. Alguns modelos têm sido propostos para

representar o metabolismo de P no organismo animal, que diferem basicamente pelo número de compartimentos utilizados (SILVA, 2017).

O modelo proposto por Fernandez (1995) foi construído para o estudo do metabolismo de cálcio e fósforo, através da combinação de resultados de absorção, balanço e cinética dos minerais, considerando o fluxo em três compartimentos, o trato gastrintestinal, sangue e tecido ósseo. Com a introdução de um quarto compartimento, os tecidos moles, Lopes et al. (2001) adaptaram o modelo, permitindo melhor avaliação dos fluxos de Ca e P no organismo animal.

2.5 Parasitismo gastrintestinal e sua influência no metabolismo de fósforo

Entre os parasitas gastrintestinais em ovinos, os mais comuns são os pertencentes à família *Trichostrongylidae*, destacando-se o *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Ostertagia* spp. e *Nematodirus* spp. (AMARANTE; DA SILVA; RAGAZO, 2014). Neste sentido, a maior importância ocorre nas infecções mistas pelo *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, devido principalmente a patogenicidade, prevalência e intensidade da infecção causada por eles, e pela população destes parasitas apresentarem resistência aos anti-helmínticos, que ocorrem de maneira predominante (ARSENOPOULOS et al., 2021; CARVALHO et al., 2021; CHAGAS et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2018).

Nas verminoses gastrintestinais, os endoparasitas que ali se alojam podem interferir na ingestão voluntária de alimentos com quadro de inapetência e/ou interferindo na absorção dos nutrientes (MÉNDEZ-ORTÍZ et al., 2019). Entre os nutrientes que pode apresentar redução de absorção podemos destacar o fósforo (P). Esta falha na ingestão e absorção de minerais pode provocar redução do crescimento do esqueleto, da densidade óssea, da mineralização e desempenho de ovinos infectados (CARDIA et al., 2011; CARVALHO et al., 2021; FOX, 1997).

Com o objetivo de avaliar o metabolismo do P pela técnica do ^{32}P , Louvandini et al. (2009a; 2009b) realizaram dois experimentos em bezerros infectados com *C. punctata*, um com infecção única e outro com infecção seriada. A infecção única, apesar de não diminuir o apetite dos bezerros determinou redução do peso vivo, teor de P no plasma e retenção do mineral, com maior excreção do P nas fezes.

Na infecção seriada, houve redução na ingestão da dieta indicando sobreposição do efeito inapetência e infecção que resultaram em redução da absorção de P e perda em peso desses animais, agravando ainda mais o quadro clínico dos bezerras.

O *H. contortus* é um parasita hematófago, encontrado no abomaso de ruminantes, sendo a principal espécie que acomete ovinos criados em regiões tropicais e subtropicais. Em decorrência da espoliação sanguínea e hemorragias abomasais causadas pelas lesões na mucosa do órgão (TAYLOR; COOP; WALL, 2017), bem como o fator hemolítico (FETTERER; RHOADS, 1998), a principal característica desta enfermidade é a anemia que, principalmente em cordeiros, pode ser fatal (ARSENOPOULOS et al., 2021). A ingestão voluntária de alimentos por animais parasitados por *H. contortus* pode ser comprometida pela presença do parasita no abomaso, que promove a liberação de gastrina e pepsinogênio, diminuindo o apetite (FOX, 1997; MÉNDEZ-ORTÍZ et al., 2019), podendo assim afetar o consumo de nutrientes importantes como o P.

O *T. colubriformis* após a infecção do hospedeiro, as larvas em estágio L3, para completarem o seu desenvolvimento, penetram entre as glândulas epiteliais da mucosa duodenal, formando túneis entre o epitélio e a lâmina própria. Ao retornarem à luz intestinal para continuar seu desenvolvimento até adultos, ocorre ruptura da mucosa, com edema, exsudação e hemorragia. As vilosidades intestinais tornam-se achatadas e sinuosas, diminuindo a superfície de absorção (BOWMAN, 2010; TAYLOR; COOP; WALL, 2017). Segundo Poppi et al. (1985), a infecção por *T. colubriformis* reduz a absorção e metabolismo de P e aumentando a sua perda endógena, provocando a sua deficiência metabólica sistêmica do mineral.

Os principais sinais clínicos da tricostrongilose seriam a diarreia, em função do quadro de enterite e a diminuição do crescimento em decorrência da baixa deposição de proteína, gordura, cálcio e P (BOWN; POPPI; SYKES, 1989). Sykes e Coop (2001) relataram uma redução de 38 % no ganho em peso, 50 % na deposição de gordura, 77 % na deposição de proteína e 99 % na deposição de cálcio em animais parasitados com *T. colubriformis* em níveis subclínicos, quando comparados com animais livres de helmintos.

Em estudos recentes, Silva et al. (2018) em infecção seriada, e Bompadre et al. (2021), em infecção única com *T. colubriformis* em cordeiros Santa Inês, utilizando a técnica da diluição isotópica com ^{32}P , observaram que a infecção afetou a absorção do P, e conseqüentemente redução do P no sangue, na secreção salivar, retenção nos tecidos moles e no osso. Houve, também, aumento da concentração de P nos animais infectados.

Referências

ALENCAR, Sylvana Pontual; MOTA, Rinaldo Aparecido; COELHO, Maria Cristina Oliveira Cardoso; NASCIMENTO, Sergio Alves; ABREU, Silvio Romero de Oliveira; CASTRO, Roberto Soares. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambucano. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 131–140, 2010. DOI: 10.5216/cab.v11i1.4051.

AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini Do; DA SILVA, Bruna Fernanda; RAGAZO, Alessandra M. A. **Os parasitas de ovinos**. 1. ed. São Paulo: Ed. da UNESP, 2014. DOI: 10.7476/9788568334423.

ANDRADE, Samantha. **Produção de carne ovina pode ser mais rentável que a bovina**. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, 2015. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/producao-de-carne-ovina-pode-ser-mais-rentavel-que-a-bovina/>. Acesso em: 12 set. 2021.

ARSENOPOULOS, Konstantinos V.; FTHENAKIS, George C.; KATSAROU, Eleni I.; PAPADOPOULOS, Elias. Haemonchosis: A challenging parasitic infection of sheep and goats. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–29, 2021. DOI: 10.3390/ani11020363.

BERCHIELLI, Telma Teresinha; PIRES, Alexandre Vaz; OLIVEIRA, Simone Gisele De. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011.

BOMPADRE, Thiago F. V.; LORIGADOS, Carla A. B.; FONSECA-PINTO, Ana Carolina B. C.; SAKITA, Gabriel Z.; ABDALLA, Adibe L.; HANIGAN, Mark D.; LOUVANDINI, Helder. *Trichostrongylus colubriformis* infection negatively impacted phosphorus metabolism of lambs. **Small Ruminant Research**, v. 202, art. 106462, 2021. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2021.106462.

BOWMAN, Dwight D. **Georgis parasitologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BOWN, M. D.; POPPI, D. P.; SYKES, A. R. The effects of a concurrent infection of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* on calcium, phosphorus and magnesium transactions along the digestive tract of lambs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 101, n. 1, p. 11–20, 1989. DOI: 10.1016/0021-9975(89)90072-8.

BREVES, Gerhard; SCHRÖDER, Bernd. Comparative Aspects of Gastrointestinal Phosphorus Metabolism. **Nutrition Research Reviews**, v. 4, n. 1, p. 125–140, 1991. DOI: 10.1079/NRR19910011.

BUENO, Mauro Sartori; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt. Níveis de fósforo para caprinos: perda endógena fecal e exigência líquida para manutenção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 678–681, 1999. DOI: 10.1590/S0100-204X1999000400020.

CAMPBELL, A. W.; BAIN, W. E.; McRAE, A. F.; BROAD, T. E.; JOHNSTONE, P. D.; DODDS, K. G.; VEENVLIET, B. A.; GREER, G. J.; GLASS, B. C.; BEATTIE, A. E.; JOPSON, N. B.; McEWAN, J. C. Bone density in sheep: Genetic variation and quantitative trait loci localisation. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 540–548, 2003. DOI: 10.1016/S8756-3282(03)00228-X.

CANTONE, M. C.; GIUSSANI, A. **Isotopic tracers in bio-medical applications**. Garching, Germany: NUPECC, 2001. (Report of Working Group in Life Sciences – Biology). Disponível em: <http://www.nupecc.org/iai2001/report/B43.pdf>.

CARDIA, D. F. F.; ROCHA-OLIVEIRA, R. A.; TSUNEMI, M. H.; AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 248–258, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.017.

CARVALHO, Nadino; NEVES, José Henrique Das; PENNACCHI, Caio Santos; CASTILHOS, Andre Michel De; AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini Do. Performance of lambs under four levels of dietary supplementation and artificially mix-infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 1, 2021. DOI: 10.1590/s1984-29612021010.

CHAGAS, Ana Carolina de Souza; OLIVEIRA, Márcia Cristina de Sena; FERNADES, Lauriston Bertelli; MACHADO, Rui; ESTEVES, Sérgio Novita; SALES, Rodrigo Lima; JUNIOR, Waldomiro Barioni. **Ovinocultura: controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 15 p.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. São Paulo: Livroceres, 1979.

COMAR, C. L.; MONROE, R. A.; VISEK, W. J.; HANSARD, S. L. Comparison of two isotope methods for determination of endogenous fecal calcium. **The Journal of nutrition**, v. 50, n. 4, p. 459–467, 1953. DOI: 10.1093/jn/50.4.459.

COULSON, Tim; BROWN, D.; ROTHERY, P. Models in Biology: Mathematics, Statistics and Computing. **The Journal of Animal Ecology**, v. 64, n. 6, p. 793, 1995. DOI: 10.2307/5868.

COX, Michael; NELSON, David L. **Lehninger principles of biochemistry**. 5. ed. New York: W.H. Freeman, 2008.

DE ALMEIDA, Fabiana Alves; BASSETTO, César Cristiano; AMARANTE, Mônica Regina Vendrame; DE ALBUQUERQUE, Ana Cláudia Alexandre; STARLING, Renan Zappavigna Costa; DO AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini. Helminth infections and hybridization between *haemonchus contortus* and *haemonchus placei* in sheep from Santana do Livramento, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 3, p. 280–288, 2018. DOI: 10.1590/s1984-296120180044.

DE SOUSA, Sheila Vilarindo; DE ARAÚJO, Marcos Jácome; E SILVA, Tairon Panunzio Dias; MARQUES, Carlo Aldrovandi Torreão; DA COSTA TORREÃO, Jacira Neves; BEZERRA, Leilson Rocha; DE SOUSA LIMA, Isak Samir; GOTTARDI, Fernanda Patrícia. Dietary supplementation for Santa Inês hair ewes on pasture at pre- and postpartum periods: dry matter intake, digestibility, milk production, and mineral metabolism. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 8, p. 1903–1912, 2018. DOI: 10.1007/s11250-018-1643-2.

DIAS, R. S.; KEBREAB, E.; VITTI, D. M. S. S.; PORTILHO, F. P.; LOUVANDINI, H.; FRANCE, J. Phosphorus kinetics in lambs fed different levels of dicalcium phosphate. **Journal of Agricultural Science**, v. 145, n. 5, p. 509–516, 2007. DOI: 10.1017/S0021859607007150.

DIAZ GONZALEZ, F. H.; OSPINA, H.; BARCELLOS, J. O. J. **Nutrição mineral em ruminantes**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998.

ENSMINGER, M. E.; OLDFIELD, J. E.; HEINEMANN, W. W. **Feeds & nutrition**: formerly Feeds & nutrition, complete. Clovis, California: Ensminger Publisher, 1990.

FERNANDEZ, J. A. Calcium and phosphorus metabolism in growing pigs. III. A model resolution. **Livestock Production Science**, v. 41, p. 2255–2261, 1995.

FETTERER, R. H.; RHOADS, M. L. A hemolytic factor from *Haemonchus contortus* alters erythrocyte morphology. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 37–45, 1998. DOI: 10.1016/S0304-4017(98)00187-3.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: Recent developments. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 3-4, p. 285–297, 1997. DOI: 10.1016/S0304-4017(97)00102-7.

FOX, N. J.; SMITH, L. A.; HOUDIJK, J. G. M.; ATHANASIADOU, S.; HUTCHINGS, M. R. Ubiquitous parasites drive a 33% increase in methane yield from livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 13, p. 1017–1021, 2018. DOI: 10.1016/J.IJPARA.2018.06.001.

GOFF, J. P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2763–2813, 2018. DOI: 10.3168/jds.2017-13112.

GRACE, N. D. Phosphorus kinetics in the sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 367–374, 1981. DOI: 10.1079/BJN19810112.

KLEIBER, M.; SMITH, A. H.; RALSTON, N. P.; BLACK, A. L. Radiophosphorus (P³²) as tracer for measuring endogenous phosphorus in cow's feces. **The Journal of Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 253–263, 1951. DOI: 10.1093/jn/45.2.253.

LOFGREEN, G. P.; GARRETT, W. N. A system for expressing net energy requirements and feed values for growing and finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 27, n. 3, p. 793, 1968. DOI: 10.2527/jas1968.273793x.

LOPES, João Batista; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt; ABDALLA, Adibe Luiz; HADDAD, Marinéia de Lara; FIGUEIRÊDO, Agostinho Valente De; MORAES, Regina Célia Botéquio De. Modelo do fluxo biológico do fósforo de fontes de fosfato em suínos, usando o ³²P como marcador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 165–173, 2001. DOI: 10.1590/s1516-35982001000100024.

LOUVANDINI, Helder; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt. Phosphorus metabolism and estimation of phosphorus requirements for sheep. **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, p. 184–189, 1996. DOI: 10.1590/S0103-90161996000100027.

LOUVANDINI, Helder; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L.; McMANUS, C. M. Phosphorus kinetics in growing hair sheep. **Small Ruminant Research**, 2008. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2008.01.003.

LOUVANDINI, Helder. **Perda endógena de fósforo em ovinos suplementados com diferentes níveis do elemento na dieta**. 1995. 97 p. Tese (Doutorado) IPEN/CNEN, São Paulo, 1995.

LOUVANDINI, Helder; RODRIGUES, Renato; GENNARI, Solange; McMANUS, Concepta; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt. Phosphorus kinetics in calves experimentally submitted to a trickle infection with *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1–2, p. 47–51, 2009a. DOI: 10.1016/J.VETPAR.2009.04.021.

LOUVANDINI, Helder; RODRIGUES, Renato R.; GENNARI, Solange M.; McMANUS, Concepta M.; VITTI, Dorinha M. S. S. Phosphorus kinetics in calves submitted to single infection with *Cooperia punctata*. **Journal of Agricultural Science**, v. 1, n. 2, p. 58, 2009b. DOI: 10.5539/jas.v1n2p58. Disponível em: <https://ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/2596>. Acesso em: 27 set. 2021.

LOUVANDINI, Helder; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt. Cinética de fósforo com modelos matemáticos em ovinos adultos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, 2007. Doi: 10.1590/S0100-204X2007001000014

MÉNDEZ-ORTÍZ, F. A.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; VARGAS-MAGAÑA, J. J.; SARMIENTO-FRANCO, L.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; VENTURA-CORDERO, J. Impact of gastrointestinal parasitism on dry matter intake and live weight gain of lambs: A meta-analysis to estimate the metabolic cost of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 265, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.11.008.

POPPI, D. P.; MACRAE, J. C.; BREWER, A. C.; DEWEY, P. J. S.; WALKER, A. Calcium and phosphorus absorption in lambs exposed to *Trichostrongylus colubriformis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 95, n. 3, p. 453–464, 1985. DOI: 10.1016/0021-9975(85)90050-7.

REINHARDT, T. A.; HORST, R. L.; GOFF, J. P. Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 4, n. 2, p. 331–350, 1988. DOI: 10.1016/S0749-0720(15)31052-5.

ROCHA, Anilza Andréia da; PAULINO, Mário Fonseca; FERNANDES, Henrique Jorge; BARROS, Lívia Vieira de; LOPES, Sidnei Antonio; GALON, Leandro; SILVA, Aline Gomes da; ALMEIDA, Daniel Mageste de. Net requirements of energy, protein and macrominerals for weight gain of grazing beef cattle castrated at different ages, with and without supplementation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 407–413, 2012. DOI: 10.1590/S1516-35982012000200025.

SCHNEIDER, KM; TERNOUTH, JH; SEVILLA, CC; BOSTON, RC. A short-term study of calcium and phosphorus absorption in sheep fed on diets high and low in calcium and phosphorus. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 36, n. 1, p. 91–105, 1985. DOI: 10.1071/AR9850091.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL - SENAR. **Ovinocultura: Criação e manejo de ovinos de corte**. Brasília, DF, 2019. Disponível em: https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/265_Ovino_corte.pdf. Acesso em: 12 set. 2021.

SILVA, Tairon Pannunzio Dias e. **Modelagem de fósforo em cordeiros submetidos à infecção experimental com *Trichostrongylus colubriformis* com uso de ³²P**. 2017. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

SILVA, Tairon Pannunzio Dias e.; JIMENEZ, Carolina Rodriguez; IEDA, Egon Ion; ABDALLA, Adibe Luiz; LOUVANDINI, Helder. Phosphorus kinetics in lambs experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis* with the use of ³²P. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 13–20, 2018. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.03.011.

TAMMINGA, S. Pollution due to nutrient losses and its control in European animal production. In: LIVESTOCK PRODUCTION SCIENCE 2003, **Anais...** Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 101–111. DOI: 10.1016/j.livprodsci.2003.09.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301622603002306>. Acesso em: 15 fev. 2021.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TEIXEIRA, Marcel; CAVALCANTE, Antonio Cesar Rocha; VIEIRA, Luis da Silva. **Controle de verminose em caprinos e ovinos**. 1. ed. Sobral, CE.: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2015.

VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt; KEBREAB, E. **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals**. Wallingford, UK: CABI International, 2010.

VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt; ABDALLA, Adibe Luiz; CLETO DA SILVA FILHO, José. Avaliação da disponibilidade biológica do fósforo bicálcico e de fosfatos de rocha para ovinos com o uso do raiofósforo ^{32}P como traçador. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 8, p. 1113–1118, 1991.

WILKENS, M. R.; MUSCHER-BANSE, A. S. Review: Regulation of gastrointestinal and renal transport of calcium and phosphorus in ruminants. **Animal**, v. 14, p. S29–S43, 2020. DOI: 10.1017/S1751731119003197.

WU, Z.; SATTER, L. D.; BLOHOWIAK, A. J.; STAUFFACHER, R. H.; WILSON, J. H. Milk production, estimated phosphorus excretion, and bone characteristics of dairy cows fed different amounts of phosphorus for two or three years. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1738–1748, 2001. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74609-7.

3 Desempenho e metabolismo do fósforo em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* utilizando a diluição isotópica com ^{32}P

3.1 Resumo

O Fósforo é um dos principais minerais presentes no organismo animal, sendo necessária à sua suplementação em ruminantes. Um dos principais fatores que comprometem a sua metabolização pelos animais são as parasitoses gastrintestinais. Sendo assim, se objetivou com este estudo demonstrar o desempenho e o metabolismo do P, através da técnica de diluição isotópica usando o radioisótopo ^{32}P , de cordeiros com infecção mista com *H. contortus* e *T. colubriformis*. Foram utilizados 20 ovinos da raça Santa Inês, com 7 meses de idade e peso inicial médio de $30,8 \pm 6,41$ kg. Dez animais foram infectados com dose única de 30.000 larvas L3 de *T. colubriformis* + 10.000 larvas L3 de *H. contortus*, e dez animais não foram infectados. Utilizando-se delineamento inteiramente casualizado (DIC). Durante o período experimental foram coletadas amostras de sangue, fezes, urina, bem como as sobras e a dieta fornecida, e realizados testes de desempenho. Os animais também foram submetidos ao exame de tomografia computadorizada, em dois momentos, antes da infecção e ao final do experimento, com o objetivo de avaliarmos possíveis alterações na composição corporal. No 64º dia após a infecção experimental os animais receberam injeção intravenosa da solução de ^{32}P para determinar seu fluxo pelo organismo dos animais. Decorridos 7 dias, após a injeção do radioisótopo, os animais foram abatidos com colheita e armazenagem das amostras. A infecção parasitária comprometeu a absorção de fósforo, conseqüentemente interferindo em toda a metabolização do mineral. A menor biodisponibilidade do P da dieta nos ovinos infectados reduz o fluxo de P para os tecidos em especial o ósseo com perda da sua densidade, levando também ao baixo desempenho dos animais.

Palavras-chave: endoparasitas, fósforo, minerais, ovinos, radioisótopo, tomografia.

3.2 Introdução

A ação de parasitas gastrintestinais sobre o organismo infectado, levam falhas na digestão e absorção dos nutrientes para o metabolismo animal, entre eles o P (MAVROT; HERTZBERG; TORGERSON, 2015; MÉNDEZ-ORTÍZ et al., 2019). Os parasitas gastrintestinais mais comuns em ovinos são os pertencentes a família *Trichostrongylidae*, destacando-se as infecções mistas por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, devido a patogenicidade, prevalência e intensidade da infecção causada por eles (AMARANTE; DA SILVA; RAGAZO, 2014; CARVALHO et al., 2021; CHAGAS et al., 2007).

O fósforo (P) em ruminantes ocupa o segundo lugar entre os minerais presentes no organismo, sendo reconhecido como um dos principais nutrientes, provavelmente, o mais utilizado como suplemento para esses animais devido ao fato da pastagem não suprir as necessidades nutricionais para este mineral. Além disto, há grande interesse no estudo do metabolismo do P, não apenas com finalidade nutricional para o ruminante, mas com o objetivo de diminuir a contaminação do ambiente provocada pela intensificação da produção destes animais. Os excrementos representam importante fonte de contaminação, com resíduos ricos em P (TAMMINGA, 2003).

Os elementos minerais como o P, após a absorção intestinal, circulam continuamente no sangue, linfa, órgãos e tecidos, e posteriormente excretados, no caso dos ruminantes, via fezes. Vários métodos experimentais para a determinação do metabolismo do P estão descritos na literatura, porém, a eficiência destes métodos pode ser prejudicada, principalmente para animais parasitados por helmintos gastrintestinais (SILVA et al., 2018). Objetivando aperfeiçoar estas técnicas para a determinação da dinâmica de P no organismo animal, alguns trabalhos utilizando a metodologia da diluição isotópica com o radioisótopo (^{32}P) como traçador para mapear a cinética do P nos diferentes tecidos em ruminantes foram realizados (DIAS-SILVA et al., 2020; LOUVANDINI; VITTI, 2007; SILVA et al., 2018; VITTI et al., 2006) Porém, estudos empregando a técnica de diluição isotópica e modelagem de P em ovinos, submetidos à infecção mista por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* ainda não são descritos na literatura.

Objetivou-se com este estudo demonstrar o desempenho e o metabolismo do P, através da técnica de diluição isotópica usando o radioisótopo ^{32}P , de cordeiros com infecção mista com *H. contortus* e *T. colubriformis*.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Local do experimento

O experimento foi realizado, conforme a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Protocolo: 004/2015), nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.3.2 Cultivo das Larvas

As larvas utilizadas para a infecção dos animais experimentais foram obtidas a partir das fezes de ovinos doadores previamente preparados. Foram utilizados quatro animais, sendo dois para larvas de *H. contortus* e dois para *T. colubriformis*, tratados com Monepantel 2,5% (Zolvix[®]), na dose de 2,5 mg/kg peso vivo, para garantir a inexistência de infecção cruzada e com o acompanhamento de exame coproparasitológico para confirmar a ausência de infecção parasitária prévia. Dois animais receberam, por via oral, 20.000 larvas L3 de *T. colubriformis* e outros 2 animais receberam 10.000 larvas L3 de *H. contortus*.

Após 21 dias do início da infecção os animais doadores foram monitorados a cada dois dias, por exame coproparasitológico quantitativos, pelo método McMaster modificado de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (LELAND, 1995). Assim que os primeiros ovos foram detectados, iniciou-se as coletas de fezes diretamente da ampola retal de cada animal, que foram utilizadas para o cultivo de ovos e consequentemente obtenção das larvas L3 por meio da coprocultura (UENO; GONÇALVES, 1998).

3.3.3 Delineamento e Manejo Experimental

Vinte ovinos da raça Santa Inês foram mantidos em ambiente controlado, desde o nascimento, para permanecerem livres de infecção por helmintos, e após o desmame aos 60 dias, foram mantidos com a mesma dieta base que foi utilizada durante o experimento. Esses animais foram monitorados através de exames de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) semanalmente.

O delineamento experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os animais divididos em dois grupos, não infectados (n=10) e infectados (n=10), e o peso inicial médio dos animais foi de $30,8 \pm 6,41$ kg, aos 7 meses de idade. Durante o experimento os animais foram mantidos em baias individuais (1,0 x 1,5m) providas de comedouro, bebedouro, e durante o experimento receberam água e alimento *ad libitum*.

A dieta (Tabela 3.1), composta por feno de Tifton (*Cynodon* spp.) triturado, concentrado (70% de milho e 30% farelo de soja) e suplemento mineral comercial, foi calculada utilizando-se a proporção de 60% de volumoso e 40% de concentrado, sendo fornecida a quantidade de 3% em relação ao peso vivo, segundo a recomendação do NRC (2007) para ganho em peso de 100 g/animal/dia. Durante o experimento, os animais recebiam primeiramente o concentrado juntamente com o sal mineral, e depois o feno.

Tabela 3.1 – Composição bromatológica dos ingredientes da dieta experimental, com base na matéria seca à 100° C

Ingredientes	MS	PB	FDN	FDA	P*	Ca
	(g/kg MS)					
Concentrado	886	248	443	131	3,89	1,3
Feno de Tifton	919	88	791	355	1,57	2,7
Mistura Mineral	974	-	-	-	76,37	128,6

MS – Matéria Seca, PB – Proteína Bruta, FDN – Fibra Detergente Neutro, FDA – Fibra Detergente Ácido, P – fósforo, Ca – Cálcio. Mistura Mineral: Magnésio 10g; Enxofre 35g; Sódio 120g; Cobre 0,756g; Manganês 2,180g; Zinco 2,8g; Iodo 0,056g; Cobalto 0,044g; Selênio 0,14 e Flúor 0,85g. (qsp – 1000g). *Fonte de P: Fosfato Bicálcico.

A infecção experimental ocorreu dez dias após o início do experimento. Dez animais (infectados) receberam, via oral, em dose única 30.000 larvas L3 de *T. colubriformis* + 10.000 larvas L3 de *H. contortus*, e dez animais não foram infectados (controle), e receberam água destilada com o objetivo de não haver diferença de manejo entre os dois grupos de animais.

3.3.4 Consumo Alimentar, Ganho em Peso, Contagem de OPG e Carga Parasitária

O experimento teve uma duração de 71 dias, e para a avaliação de desempenho os animais foram observados durante 56 dias, destes 10 dias de adaptação as condições experimentais e 46 dias foram após a infecção. O fornecimento do feno foi realizado *ad libitum*, garantindo sobras de no mínimo 10%, e o concentrado foi calculado e ajustado semanalmente conforme o peso dos animais. As sobras foram pesadas diariamente e o consumo diário foi calculado pela fórmula: consumo (g) = fornecido (g) – sobras (g). As sobras foram pesadas diariamente e o consumo diário foi calculado pela fórmula: consumo (g) = fornecido (g) – sobras (g). Durante o período experimental os animais foram pesados em jejum, com 5, 15, 25, 35 e 45 dias após a infecção e foi calculado o ganho médio diário em peso (GMDP), e o ganho em peso total no final do experimento.

Durante o experimento foram coletadas fezes, diretamente da ampola retal, de todos os animais para a realização do exame coproparasitológico, pela técnica de Gordon e Whitlock modificada de contagem de OPG. A determinação da carga parasitária foi feita através da contagem total de vermes, sendo que, durante o abate dos animais, o abomaso e o intestino delgado foram retirados e separados. Todo o conteúdo, de ambos os seguimentos, em separado, foram lavados com água corrente até obter-se o volume total de 2 litros. Em seguida obteve-se uma amostra em duplicada de cada compartimento, contendo 10% do material total, que foi conservada em formalina tamponada (10%), e realizada a contagem dos vermes adultos presente nos respectivos compartimentos.

3.3.5 Tomografia Computadorizada

Os cortes tomográficos foram realizados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, em São Paulo – SP, sendo dois exames por animal, um antes da infecção e o outro, 55 dias após a infecção. O equipamento de tomografia computadorizada utilizado foi um helicoidal, Modelo Mx 8000 da Philips Medical Systems.

Para a realização do exame os animais foram anestesiados (xilazina: 0,05 mg/kg PV; cetamina: 4,5 mg/kg PV, intravenoso) antes do procedimento. Para cada animal as imagens tomográficas foram adquiridas em um plano transversal, com três milímetros de espessura e 1,5 milímetros de incremento. Na sequência, foram selecionadas as imagens ao redor da 4ª costela, da 12ª costela e do fêmur do lado esquerdo das imagens para obtenção das medidas.

As imagens foram avaliadas utilizando o software Osirix MD (Pixmeo SARL – Swiss), em escala de contraste de cor utilizando-se unidades Hounsfield (HU). Foram medidos cinco pontos e o valor médio entre eles foi usado para análise estatística. O HU é o coeficiente de atenuação linear da água, sendo que a equação que representa HU descrito abaixo,

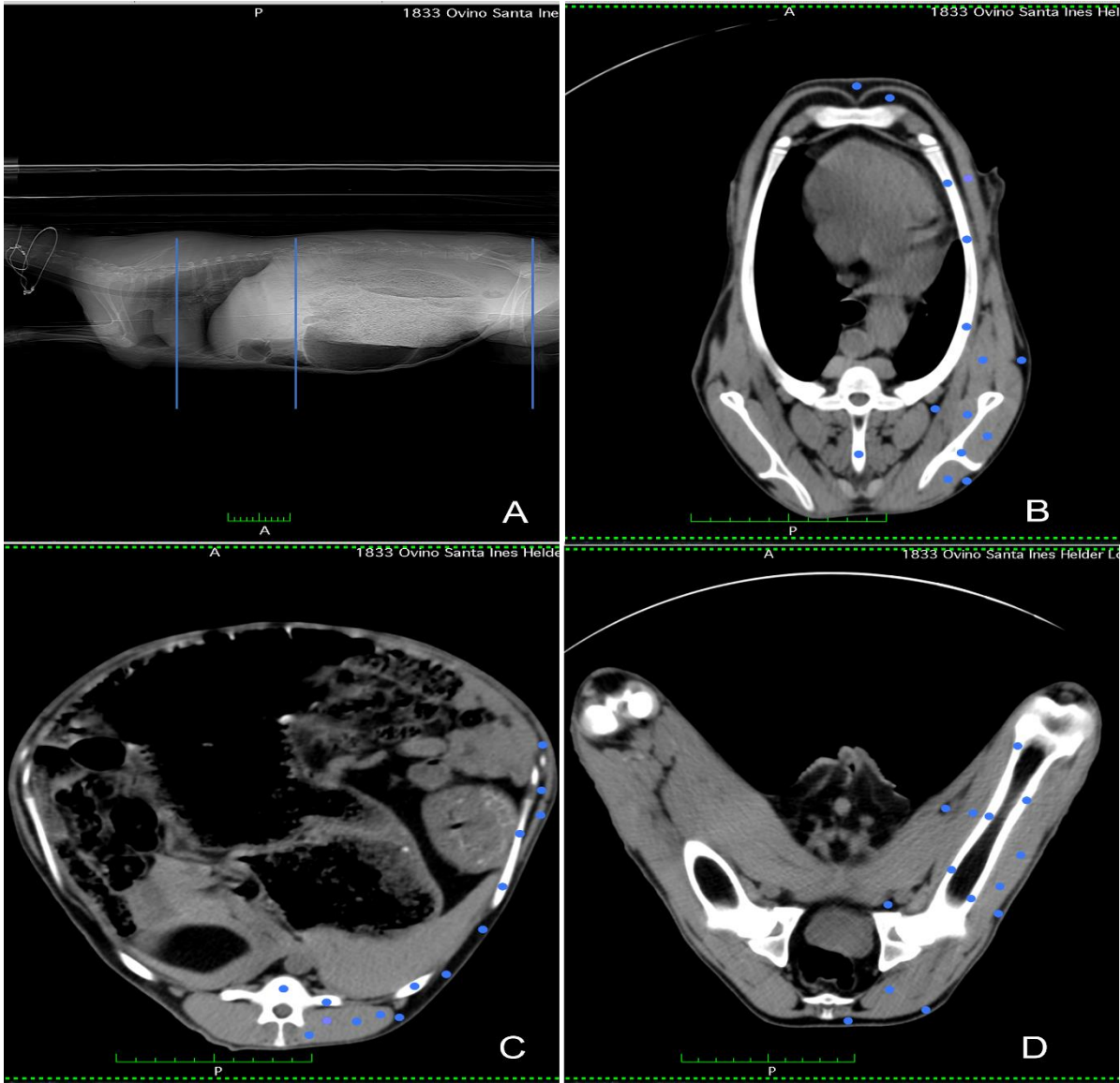
onde, HU é a escala de Housfield, μ é o coeficiente de atenuação linear dos tecidos, e μ_{H_2O} é o coeficiente de atenuação linear da água (água HU = 0) (SCHNEIDER; PEDRONI; LOMAX, 1996).

$$HU = 1000 * ((\mu - \mu_{H_2O}) / \mu_{H_2O})$$

A densidade óssea foi calculada pela equação descrita por Campbell et al., (2003) utilizando-se o HU dos ossos: Densidade óssea (g / cm³) = 1,0062 + 0,00106 * HU osso. Para o músculo e gordura utilizou-se a escala de contraste de cor em HU.

Na Figura 3.1 observa-se as imagens tomográficas com a localização dos cortes e os pontos onde foram feitas as medidas de escala de contraste cor em HU com o software ou programa Osirix MD.

Figura 3.1 – Captura de tela do Osirix MD de imagem tomográfica do lado esquerdo dos cordeiros usada para medições (A). As linhas e pontos azuis nas imagens mostram as regiões medidas. B - região da 4ª costela, C – região da 12ª costela e D – região do fêmur. Os pontos azuis, os locais específicos que os dados foram coletados



3.3.6 Técnica de Diluição Isotópica (^{32}P) e Amostragem

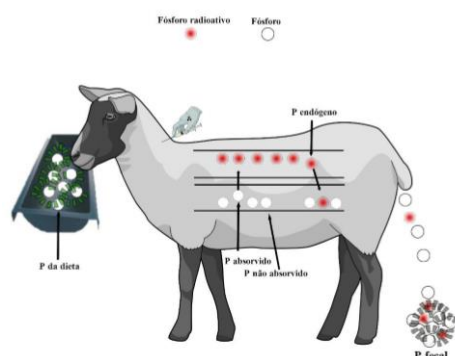
Ao 59º dia após a infecção experimental os animais foram colocados em gaiolas para estudo de metabolismo, onde foram coletadas amostras de fezes e urina para a determinação do P estável, e no 64º dia os animais receberam a injeção via endovenosa de solução contendo 7,4 MBq de fosfato de sódio com ^{32}P (Na_2HPO_4), livre de carregador, fornecida pelo instituto de Pesquisas Energéticas de São Paulo

(IPEN) na jugular esquerda. Amostras de sangue foram coletadas, 5 minutos e depois a cada 24 horas após a administração do radioisótopo, diariamente durante sete dias. O sangue foi centrifugado e o plasma reservado para análises. Para ocorrer a precipitação da proteína foi adicionado 9 mL de ácido tri-cloro acético em 1 mL de plasma e o P inorgânico foi determinado por colorimétrica (FISKE; SUBBAROW, 1925).

Ao final dos 71 dias após a infecção, os animais foram abatidos conforme o protocolo recomendado pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Amostras dos tecidos: fígado, coração, rins, músculos e osso da 12ª costela foram colhidos, limpas e moídas. Após a determinação do teor de matéria seca, o material foi submetido a pré-queima em chapa aquecedora com gotas de ácido nítrico 50%, seguindo para a obtenção de cinzas em processo de incineração à 500 °C. As cinzas foram solubilizadas em ácido clorídrico, e o teor de P determinado pelo método Vanadato-Molibdato (SARRUGE; HAAG, 1974). A detecção da radioatividade de ^{32}P nos tecidos foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida por efeito Cerenkov (NASCIMENTO FILHO; LOBÃO, 1977).

A Figura 3.2 mostra o esquema de diluição isotópica usando o ^{32}P para determinar o P endógeno e a absorção real.

Figura 3.2 – Esquema ilustrativo da técnica de diluição isotópica usando o ^{32}P na avaliação da cinética do P em ovinos

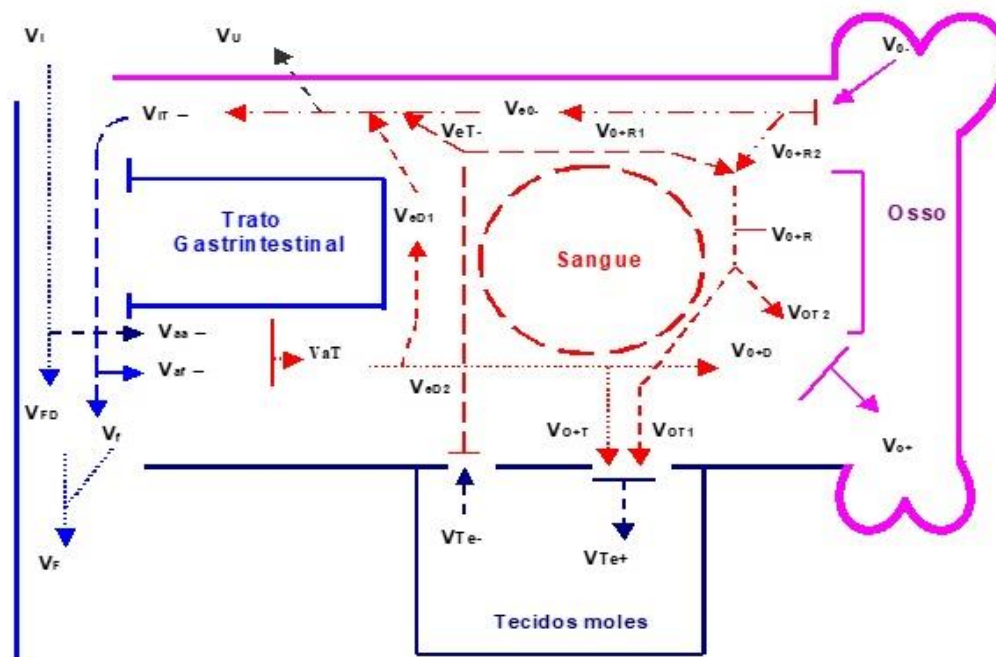


Fonte: VITTI; KEBREAB (2010), adaptado por Silva (2017).

3.3.7 Modelagem

O modelo (Figura 3.3) utilizado foi o proposto por Fernandez (1995), com adaptado por Lopes et al. (2001). Neste modelo são considerados quatro compartimentos: sendo o compartimento C1 o trato gastrintestinal, o C2, o plasma, o C3, os ossos e o C4, os tecidos moles (fígado coração, rim e músculo) estudados em conjunto. O plasma foi caracterizado como compartimento ou *pool* central, em função de centralizar o intercâmbio de fósforo entre os demais compartimentos. Segundo Louvandini et al. (2008) o uso deste modelo possui vantagens sobre os outros, pois avalia a distribuição do mineral no organismo animal, detalhando as trocas entre tecidos e as várias rotas, sendo o mais indicado para o estudo da cinética do P em ovinos.

Figura 3.3 – Modelo da distribuição do fósforo adaptado de Fernandez (1995)



Legenda: V_I – quantidade de P ingerido; V_F – perdas totais de P nas fezes; V_f – perdas de P endógeno fecal; V_{FD} – perdas de P nas fezes de origem dietética; V_{aa} – P absorvido de origem alimentar; V_{IT} – P de origem endógena, que chega ao trato gastrintestinal (TGI); V_{af} – P endógeno reabsorvido no TGI; V_{aT} – total de P absorvido; V_{O+} - P incorporado no osso; V_{O-} - P reabsorvido do osso; V_{O+R2} - P do osso reciclado para o osso e demais tecidos; V_{eO-} - P reabsorvido do osso, que retorna ao TGI; V_{O+D} - P do V_{aT} incorporado no osso; V_{Te+} - P incorporado no tecido; V_{Te-} - P reabsorvido do tecido; V_{O+R1} - P do tecido reciclado para osso e demais tecidos; V_{O+R} - total de P reciclado para o osso e demais tecidos; V_{eT-} - P reabsorvido dos tecidos, que retorna ao TGI; V_{O+T} - P do V_{aT} incorporado nos tecidos; V_{eD1} - P do V_{aT} que retorna para o TGI; V_{eD2} - P do V_{aT} distribuído para o osso e demais tecidos; V_{OT1} - P do V_{O+R} reincorporado nos tecidos; V_{OT2} - P do V_{O+R} reincorporada nos ossos.

3.4 Análises estatísticas

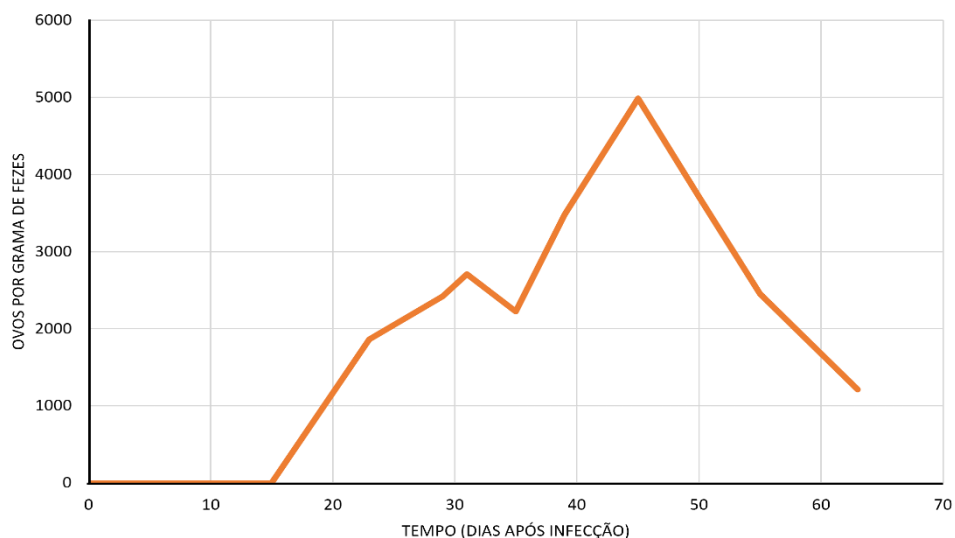
A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa SAS v. 9.3® (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Nas variáveis estudadas, foram realizadas análises de variância, considerando 5% o nível de probabilidade. Os dados com medidas repetidas no tempo foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED.

3.5 Resultados

3.5.1 Contagem de OPG e Carga Parasitária

Os animais infectados apresentaram durante o período uma contagem média de 2785 ovos por grama de fezes (OPG), atingindo a média máxima de 4985 OPG aos 45 dias após a infecção, como podemos observar na Figura 3.4. Não se verificou presença de ovos de helmintos nas fezes nos animais não infectados durante o período avaliado. A média de vermes adultos recuperados foram 998 de *H. contortus* no abomaso, correspondendo a 9,98% das larvas infectantes que os animais receberam, e 5652 adultos de *T. colubriformis* no intestino delgado, que corresponde 18,8% das larvas infectantes.

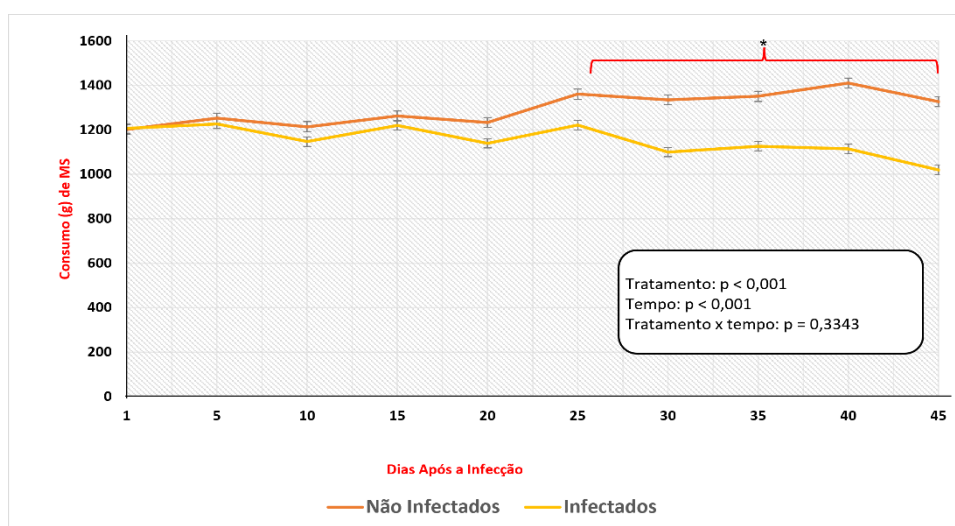
Figura 3.4 - Média do número de ovos por grama de fezes nos animais infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*, durante o período experimental



3.5.2 Consumo e Ganho em Peso

Durante este estudo, os animais não infectados apresentaram consumo diário de matéria seca superior aos infectados ($P < 0,05$), a partir do 26º dia após a infecção (Figura 3.5)

Figura 3.5 - Consumo diário em gramas de matéria seca (MS), dos animais não infectados e infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*. A partir do 26º após infecção houve diferença no consumo (*) ($P < 0,05$)



Os não infectados apresentaram ganho em peso diário superior aos infectados (Tabela 3.2), havendo diferença entre os grupos após o 15º de infecção ($P < 0,05$), sendo que 7 animais infectados (70%) apresentaram ganho em peso negativo ao final do experimento. Houve interação significativa entre tempo x tratamento ($P < 0,05$). No final do experimento os não infectados apresentaram ganho total em peso de $6,4 \pm 1,6$ Kg, superior aos animais infectados que foi de $1,8 \pm 2,7$ kg ($P < 0,05$).

Tabela 3.2 - Média de ganho em peso (g/animal/dia) dos animais não infectados e infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*

Dias após infecção	Tratamentos		EPM	Efeitos		
	Não infectados	Infectados		T	D	TxD
5	117 ^{Aa}	128 ^{Aa}		**	ns	**
15	150 ^{Aa}	33 ^{Bb}				
25	131 ^{Aa}	17 ^{Bb}	46,3			
35	113 ^{Aa}	14 ^{Bb}				
45	145 ^{Aa}	-55 ^{Cb}				

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância (**). (ns = não significativo, $p > 0,05$)

3.5.3 Tomografia computadorizada

Houve diminuição da densidade óssea (tabela 3), diferença observada na região da 12^a costela, sendo menor nos infectados ($P < 0,05$) aos 55 dias após a infecção. Nas demais medidas, apesar dos valores obtidos estarem menores nos animais infectados aos 55 dias, não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 3.3 - Densidade do tecido ósseo (g / cm^3) e escala de contraste de cor em Housfield (HU) dos tecidos muscular e adiposo, dos animais não infectados e infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Tecido	Região	Dias	Tratamentos		EPM	Valor de P		
			Não Inf	Inf.		T	D	TxD
Ósseo (g/cm^3)	4ª Costela	0	1,38	1,43	0,04	ns	ns	ns
		55	1,52	1,46		ns	ns	ns
	12ª Costela	0	1,52	1,47	0,03	ns	ns	ns
		55	1,54 ^a	1,43 ^b		**	ns	ns
	Fêmur	0	1,49	1,47	0,04	ns	ns	ns
		55	1,52	1,46		ns	ns	ns
Muscular (HU)	4ª Costela	0	58,0	58,10	3,78	ns	ns	ns
		55	60,0	54,85		ns	ns	ns
	12ª Costela	0	59,67	58,57	3,08	ns	ns	ns
		55	56,33	56,57		ns	ns	ns
	Fêmur	0	60,5	57,14	4,53	ns	ns	ns
		55	61,0	56,14		ns	ns	ns
Adiposo (HU)	4ª Costela	0	-93,67	-99,14	7,90	ns	ns	ns
		55	-100,50	-100,86		ns	ns	ns
	12ª Costela	0	-94,50	-90,28	10,14	ns	ns	ns
		55	-100,83	-94,57		ns	ns	ns
	Fêmur	0	-82,17	-82,28	9,15	ns	ns	ns
		55	-105,33	-99,14		ns	ns	ns

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância (**). (ns = não significativo, $p > 0,05$)

3.5.4 Metabolismo do Fósforo

Os resultados das variáveis obtidas para a determinação do metabolismo do P nos animais infectados e não infectados estão descritos nas Tabelas 3.4 e 3.5. Não houve diferença no consumo total de P (V_I) entre os animais, porém os infectados apresentaram maior perda de P de origem alimentar nas fezes (V_{FD}) ($P < 0,05$), e menor absorção do P de origem alimentar (V_{aa}) e endógena (V_{af}) pelo trato gastrintestinal ($P < 0,05$). Os não infectados apresentaram maior quantidade do P de origem endógena chegando ao trato gastrintestinal (V_{IT}), e maior perda do P de origem endógena nas fezes (V_f) ($P < 0,05$). Com relação perdas totais do P nas fezes (V_F) não houve diferença entre os animais infectados e não infectados ($P > 0,05$).

A disponibilidade biológica do P foi menor nos animais infectados ($P < 0,05$), como também a concentração plasmática de P ($P < 0,05$). A meia vida biológica foi mais elevada nos infectados ($P < 0,05$). As variáveis V_{O+D} , V_{O+} , V_{O-} , V_{O+R} , V_{eO-} e V_{OT2} apresentaram valores menores nos animais infectados ($P < 0,05$).

Tabela 3.4 - Médias das variáveis relacionadas a dinâmica do fósforo (P), disponibilidade biológica e meia vida biológica, Pplasma dos animais não infectados e infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Variáveis (mg/kg PV)	Tratamentos		EPM	Valor de P
	Não Infectados	Infectados		
P consumido (V_i)	113,73	110,37	5,19	0,669
Perdas de P dietético nas fezes (V_{FD})	45,16	62,96	5,27	0,036
P endógeno total que chega no TGI (V_{IT})	119,31	59,91	18,01	0,010
P absorvido de origem endógena (V_{af})	74,36	28,45	13,71	0,009
P endógeno excretado nas fezes (V_f)	44,95	31,46	4,67	0,033
Perdas totais de P nas fezes (V_F)	90,11	94,43	3,90	0,459
Balanço de P (Ba)	23,59	15,88	5,20	0,318
P absorvido de origem alimentar (V_{aa})	68,57	47,41	7,31	0,032
P total absorvido (V_{aT})	142,94	75,86	20,15	0,009
Disponibilidade biológica do P (%)	60,55	44,06	3,98	0,016
Meia vida biológica do ^{32}P (horas)	58,0	72,14	4,44	0,035
P plasmático (mg/100 mL)	6,35	5,21	0,37	0,021
P saliva	0,15	0,10	0,086	0,001
P do V_{aT} que retorna ao TGI (V_{eD1})	24,45	13,60	4,95	0,125
P do V_{aT} distribuído para o osso e demais tecidos (V_{eD2})	118,49	62,25	15,63	0,003
P do V_{aT} incorporado nos tecidos moles (V_{O+T})	4,33	2,81	0,71	0,131
P do V_{aT} incorporado no osso (V_{O+D})	114,15	59,45	15,95	0,003

Tabela 3.5 - Médias das variáveis relacionadas a dinâmica do fósforo (P), dos animais não infectados e infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*, durante o período experimental. (EPM = erro padrão da média)

Variáveis (mg/kg PV)	Tratamentos			Valor de P
	Não Infectados	Infectados	EPM	
P incorporado no osso (V_{O+})	574,52	316,89	57,63	0,001
P reabsorvido do osso (V_{O-})	552,30	301,87	56,64	0,001
Balanço de P no osso	22,73	15,19	4,99	0,307
P reabsorvido do osso que retorna ao TGI (V_{eO-})	91,43	44,25	13,13	0,004
P do osso reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R2})	460,37	257,28	46,63	0,001
P dos tecidos moles reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R1})	16,52	12,47	2,02	0,165
Total de P reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R})	476,89	269,76	47,59	0,001
P do V_{O+R} reincorporado aos ossos (V_{OT2})	463,94	257,28	46,88	0,001
P do V_{O+R} reincorporado aos tecidos moles (V_{OT1})	16,52	12,48	2,02	0,166
P incorporado nos tecidos moles (V_{Te+})	20,85	15,27	2,55	0,126
P reabsorvido dos tecidos moles (V_{Te-})	19,99	14,58	2,45	0,122
Balanço de P nos tecidos moles	0,86	0,69	0,25	0,658
P reabs. dos tecidos moles que retorna ao TGI (V_{eT-})	3,47	2,11	0,56	0,087

Também se observou no presente experimento que os animais infectados apresentaram maior concentração de fósforo nos tecidos hepático ($P < 0,05$), e menor concentração no tecido ósseo ($P < 0,05$) (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Concentração de fósforo presente nos tecidos moles e ósseo, dos animais não infectados e infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*, durante o período experimental. (EPM = erro padrão da média)

Tecido	Concentração Fósforo (g/kg MS)		EPM	Valor de P
	Não Infectados	Infectados		
Fígado	8,64	10,66	0,43	0,012
Rim	11,22	11,32	0,23	0,511
Músculo	7,25	7,41	0,18	0,658
Coração	8,18	8,67	0,19	0,229
Osso	95,59	88,96	1,67	0,044

3.6 Discussão

A infecção mista por *H. contortus* e *T. colubriformis* obtida no experimento pode ser classificada como severa. Segundo Ueno e Gonçalves (1998), contagens de OPG > 500 para infecções mistas com a presença de *H. contortus* são consideradas severas, pois a presença dele agrava a patogenia da doença parasitária. Infecções envolvendo *T. colubriformis* e *H. contortus*, são bastante comuns nos sistemas de produção extensivos e semi-intensivos, tendo a pastagem como a principal fonte nutricional, prejudicando o desempenho produtivo dos animais infectados (AMARANTE; DA SILVA; RAGAZO, 2014).

Neste trabalho foi observado que a infecção mista reduziu o consumo da dieta, estando de acordo com os resultados encontrados por Carvalho et al. (2021), que estudaram diferentes dietas em animais infectados por *H. contortus* e *T. colubriformis*, e observaram diminuição no consumo da dieta nos parasitados. Segundo Méndez-Ortíz et al. (2019), em estudo usando meta-análise, os helmintos gastrintestinais afetam negativamente o consumo, existindo uma correlação negativa entre a ingestão de alimento e a carga parasitária, prejudicando o aproveitamento dos nutrientes, que conseqüentemente afetam o desempenho destes animais.

A redução do consumo na presença de parasitas abomasais, têm sido associadas as concentrações aumentadas de gastrina no sangue com a liberação de gastrina e pepsinogênio no abomaso, levando inibição do apetite (FOX, 1997).

Já a diminuição na ingestão de alimento causada pelo *T. colubriformis* está relacionada ao processo inflamatório desencadeado na mucosa intestinal e ao desconforto produzido pelas lesões causada pelos parasitas (CARVALHO et al., 2021; SYKES; COOP, 2001).

Em trabalhos envolvendo infecção seriada (SILVA et al., 2018), e única (BOMPADRE et al., 2021) com *T. colubriformis* observaram que a parasitose não interferiu no consumo dos animais avaliados nos experimentos. Porém, nestes estudos houve apenas uma espécie de parasita envolvida, já no presente trabalho com infecção mista por *H. contortus* e *T. colubriformis*, pode ter potencializado a gastroenterite (AMARANTE et al., 2014; CHAGAS et al., 2007), evidenciando-se a redução na ingestão de alimento.

O menor consumo de matéria seca dos ovinos infectados interferiu negativamente no desempenho destes animais com menor ganho em peso diário em relação aos não infectados após 15 dias de infecção. Estudos demonstraram que a infecção por helmintos gastrintestinais acarreta baixo desempenho em ovinos parasitados, principalmente em animais em crescimento, provocando prejuízos aos sistemas de produção, pois estão relacionados à baixa eficiência nutricional (MAVROT et al., 2015; DIAS; SILVA et al., 2019; MÉNDEZ-ORTÍZ et al., 2019) e absorção de nutrientes (LOUVANDINI et al., 2008; PATHAK et al., 2013), como consequência da patogenia da doença. Aos 26 dias de infecção até o fim do experimento o consumo de MS dos infectados permaneceu menor em relação aos ovinos não infectados, impondo redução no ganho em peso total de 4,6 kg para os infectados, comprometendo o seu desempenho produtivo.

Como a redução no consumo foi observada na ingestão do feno da dieta e não no concentrado onde foi fornecida a suplementação de P, a ingestão de P (V_i) foi semelhante entre os ovinos dos dois tratamentos. Aspecto relevante, pois as diferenças encontradas no metabolismo do mineral foi em decorrência dos endoparasitas. Os animais infectados apresentaram menor proporção de P consumido absorvido (V_{aa}) no trato gastrintestinal e menor absorção total de P (V_{aT}), com maior concentração do P consumido presente nas fezes (V_{FD}), em relação aos não infectados, demonstrando assim falha na absorção do P consumido na dieta, associado principalmente ao *T. colubriformis*.

A quantidade total de P presente nas fezes é constituído pelos fósforos de origem alimentar e endógena, e a diferenciação foi possível através da utilização da técnica da diluição isotópica. No presente estudo, não foi observada diferença na quantidade de P total presente nas fezes (V_F), porém houve diferença na origem deste. Os animais infectados apresentaram maior quantidade de P da dieta nas fezes (V_{FD}), já os animais não infectados apresentaram maior quantidade de P endógeno nas fezes (V_i), demonstrando que a infecção reduziu a capacidade de absorção do P da dieta, alterando o metabolismo do mineral conforme relatado anteriormente. Estes resultados corroboram com Silva et al. (2018) que, utilizando ^{32}P para avaliar o metabolismo e a cinética do P em cordeiros infectados experimentalmente somente com *T. colubriformis*, observaram que a infecção comprometeu a absorção do P.

Nos ovinos infectados a menor absorção e disponibilidade de P refletiu menor P no plasma para ser excretado via saliva e $T_{1/2}$ mais lenta e por consequência menor P endógeno fecal. Os animais não infectados apresentaram maior absorção do P da dieta do que os animais infectados, promovendo com isso maior quantidade de P endógeno chegando no trato gastrintestinal (V_{IT}), uma vez que nos animais infectados a absorção do P foi comprometida e o organismo diminuiu a reciclagem do mineral.

A diminuição na capacidade absorptiva do P, demonstrada no presente estudo, em decorrência da parasitose, afetou a utilização do mineral pelo animal, ou seja, a disponibilidade biológica do P foi reduzida nestes animais, comprometendo importantes funções que são desempenhadas pelo P no metabolismo animal, demonstrando que a infecção mista provocou alterações na cinética do mineral. Sendo assim, a dinâmica do P nos tecidos foi comprometida nos animais infectados, com menor P absorvido distribuído para o osso e demais tecidos (V_{eD2}), menor P do osso reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R2}) e menor P total reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R}), comprometendo a disponibilidade do mineral para o metabolismo dos tecidos.

O osso é uns principais tecidos envolvidos no metabolismo de P (LOUVANDINI et al., 2008), funcionando como reserva importante para a manutenção do mecanismo de homeostase do mineral no organismo animal (VITTI; KEBREAB, 2010), logo, nos animais infectados, o tecido ósseo foi o mais prejudicado, pois apresentaram redução do P total absorvido (V_{aT}) incorporado no osso (V_{O+D}), como também nos fluxos V_{O+} , V_{O-} , V_{eO-} , V_{O+R2} , V_{O+R} e V_{OT2} .

No presente estudo se observou, através da tomografia computadorizada, diminuição da densidade óssea na região da 12^a costela nos animais infectados, em decorrência da infecção parasitária. Como descrito anteriormente, a absorção do P foi comprometida nestes animais, que resultou na diminuição do P plasmático, ativando o mecanismo compensatório de reabsorção do mineral armazenado no tecido ósseo, em consequência reduzindo a densidade do tecido, corroborando com o observado por Bompadre et al. (2021).

Entretanto, não houve diferenças no balanço do P no osso e nos demais tecidos entre os grupos, isto pode estar relacionado ao tempo de infecção, que não levou ao desbalanço, semelhante ao encontrado por Silva et al. (2018). Porém se observou que os animais infectados apresentaram maior concentração de P nos tecidos hepático, demonstrando um desvio na dinâmica do mineral no organismo parasitado. O aumento na concentração no tecido hepático que pode estar relacionado à maior atividade dos hepatócitos, maior requerimento de ATP pelas células, devido ao processo de combate aos catabólitos decorrentes do processo inflamatório instalado. O fígado é o principal órgão metabólico e de desintoxicação no corpo, funcionando como um importante tampão entre o conteúdo do trato gastrointestinal e circulação sistêmica. Ele também desempenha um papel muito importante na resposta imunológica, através da síntese de proteínas importantes para o sistema imunológico (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

3.7 Conclusão

A infecção mista por *H. contortus* e *T. colubriformis* reduziu o consumo de matéria seca com consequente queda no ganho em peso dos ovinos. A menor biodisponibilidade do P da dieta nos ovinos infectados alterou o seu metabolismo reduzindo o fluxo para os tecidos em especial o ósseo com perda da sua densidade.

Referências

AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do; DA SILVA, Bruna Fernanda; RAGAZO, Alessandra M. A. **Os parasitas de ovinos**. 1. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2014. DOI: 10.7476/9788568334423.

BOMPADRE, Thiago F. V.; LORIGADOS, Carla A. B.; FONSECA-PINTO, Ana Carolina B. C.; SAKITA, Gabriel Z.; ABDALLA, Adibe L.; HANIGAN, Mark D.; LOUVANDINI, Helder. Trichostrongylus colubriformis infection negatively impacted phosphorus metabolism of lambs. **Small Ruminant Research**, v. 202, art. 106462, 2021. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2021.106462.

CAMPBELL, A. W. et al. Bone density in sheep: Genetic variation and quantitative trait loci localisation. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 540–548, 2003. DOI: 10.1016/S8756-3282(03)00228-X.

CARVALHO, Nadino; NEVES, José Henrique Das; PENNACCHI, Caio Santos; CASTILHOS, Andre Michel De; AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini Do. Performance of lambs under four levels of dietary supplementation and artificially mix-infected with Haemonchus contortus and Trichostrongylus colubriformis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 1, 2021. DOI: 10.1590/s1984-29612021010.

CHAGAS, Ana Carolina de Souza; OLIVEIRA, Márcia Cristina de Sena; FERNADES, Lauriston Bertelli; MACHADO, Rui; ESTEVES, Sérgio Novita; SALES, Rodrigo Lima; JUNIOR, Waldomiro Barioni. **Ovinocultura: controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 15 p.

DIAS-SILVA, Tairon Pannunzio; FILHO, Adibe Luiz Abdalla; KATIKI, Luciana Morita; DO AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini; ABDALLA, Adibe Luiz; LOUVANDINI, Helder. Trichostrongylus Colubriformis infection in santa inês lambs: Impact on feed digestibility, blood markers, and nitrogen balance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 2, 2020. DOI: 10.1590/s1984-29612020026.

DIAS E SILVA, Tairon Pannunzio; BOMPADRE, Thiago Francisco Ventoso; DANASEKARAN, Dinesh Kumar; SAKITA, Gabriel Zanuto; ABDALLA FILHO, Adibe Luiz; JIMENEZ, Carolina Rodrigues; PINTO, Ana Carolina Brandão de Campos Fonseca; AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do; McMANUS, Concepta; LOUVANDINI, Helder. Trichostrongylus colubriformis infection: Impact on digesta passage rate and lamb performance. **Veterinary Parasitology**, v. 272, p. 17–22, 2019. DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.06.018.

FERNANDEZ, J. A. Calcium and phosphorus metabolism in growing pigs. III. A model resolution. **Livestock Production Science**, v. 41, p. 2255–2261, 1995.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375–400, 1925.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: Recent developments. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 3-4, p. 285–297, 1997. DOI: 10.1016/S0304-4017(97)00102-7.

LELAND, Stanley E. Monospecific nematode infections of donor calves with *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 1–2, p. 111–118, 1995. DOI: 10.1016/0304-4017(94)00744-W.

LOPES, João Batista; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt; ABDALLA, Adibe Luiz; HADDAD, Marinéia de Lara; FIGUEIRÊDO, Agostinho Valente De; MORAES, Regina Célia Botéquio De. Modelo do fluxo biológico do fósforo de fontes de fosfato em suínos, usando o ³²P como marcador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 165–173, 2001. DOI: 10.1590/s1516-35982001000100024.

LOUVANDINI, Helder; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt. Phosphorus metabolism and estimation of phosphorus requirements for sheep. **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, p. 184–189, 1996. DOI: 10.1590/S0103-90161996000100027.

LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L.; McMANUS, C. M. Phosphorus kinetics in growing hair sheep. **Small Ruminant Research**, 2008. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2008.01.003.

LOUVANDINI, Helder; RODRIGUES, Renato; GENNARI, Solange; McMANUS, Concepta; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt. Phosphorus kinetics in calves experimentally submitted to a trickle infection with *Cooperia punctata*. **Veterinary parasitology**, v. 163, n. 1–2, p. 47–51, 2009a. DOI: 10.1016/J.VETPAR.2009.04.021.

LOUVANDINI, Helder; RODRIGUES, Renato R.; GENNARI, Solange M.; MCMANUS, Concepta M.; VITTI, Dorinha M. Phosphorus Kinetics in Calves Submitted to Single Infection with *Cooperia punctata*. **Journal of Agricultural Science**, v. 1, n. 2, p. p58, 2009b. DOI: 10.5539/jas.v1n2p58.

LOUVANDINI, Helder; VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt. Cinética de fósforo com modelos matemáticos em ovinos adultos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, 2007. DOI: 10.1590/S0100-204X2007001000014

MAVROT, Fabien; HERTZBERG, Hubertus; TORGERSON, Paul. Effect of gastrointestinal nematode infection on sheep performance: A systematic review and meta-analysis. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-1164-z.

MÉNDEZ-ORTÍZ, F. A.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; VARGAS-MAGAÑA, J. J.; SARMIENTO-FRANCO, L.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; VENTURA-CORDERO, J. Impact of gastrointestinal parasitism on dry matter intake and live weight gain of lambs: A meta-analysis to estimate the metabolic cost of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 265, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.11.008.

NASCIMENTO FILHO, V. F.; LOBÃO, A. O. **Detecção de P-32 em amostras de origem animal e vegetal por efeito Cerenkov, cintilação líquida e detector GM**. Piracicaba: CENA/USP, 1977. 25 p. (Boletim Científico, 48).

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants**. Danvers, MA: National Academies Press, 2007. DOI: 10.17226/11654.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. Origin of Plasma Fatty Acids in Lactating Cows Fed High Grain or High Fat Diets. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 7, p. 1025–1033, 1971. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(71)85966-0.

PATHAK, A. K.; DUTTA, Narayan; BANERJEE, P. S.; PATTANAIK, A. K.; SHARMA, K. Influence of dietary supplementation of condensed tannins through leaf meal mixture on intake, nutrient utilization and performance of haemonchus contortus infected sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 10, p. 1446–1458, 2013. DOI: 10.5713/ajas.2013.13066.

ROBINSON, N. W.; HARMON, C.; O'FARRELLY, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 13, n. 3, p. 267–276, 2016. DOI: 10.1038/CMI.2016.3.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974. p. 6–58: Determinação colorimétrica de fósforo.

SCHNEIDER, KM; TERNOUTH, JH; SEVILLA, CC; BOSTON, RC. A short-term study of calcium and phosphorus absorption in sheep fed on diets high and low in calcium and phosphorus. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 36, n. 1, p. 91–105, 1985. DOI: 10.1071/AR9850091..

SCHNEIDER, Uwe; PEDRONI, Eros; LOMAX, Antony. The calibration of CT Hounsfield units for radiotherapy treatment planning. **Physics in Medicine and Biology**, v. 41, n. 1, p. 111–124, 1996. DOI: 10.1088/0031-9155/41/1/009

SILVA, Tairon Pannunzio Dias e. **Modelagem de fósforo em cordeiros submetidos à infecção experimental com Trichostrongylus colubriformis com uso de 32P**. 2017. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

SILVA, Tairon Pannunzio Dias e; JIMENEZ, Carolina Rodriguez; IEDA, Egon Ion; ABDALLA, Adibe Luiz; LOUVANDINI, Helder. Phosphorus kinetics in lambs experimentally infected with Trichostrongylus colubriformis with the use of 32P. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 13–20, 2018. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.03.011.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Interaction between nutrition and gastrointestinal parasitism in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, n. 6, p. 222–226, 2001. DOI: 10.1080/00480169.2001.36236.

TAMMINGA, S. Pollution due to nutrient losses and its control in European animal production. **Livestock Production Science**, v. 84, n. 2, p. 101–111, 2003. DOI: 10.1016/j.livprodsci.2003.09.008.

UENO, Hakaru; GONÇALVES, Pedro Cabral. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo, Japan: JICA, 1998.

VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt; KEBREAB, E. **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals**. Wallingford: CABI International, 2010.

VITTI, Dorinha Miriam Silber Schmidt; ROQUE, Ana Paula; DIAS, Raquel Souza; LOPES, João Batista; BUENO, Ives Cláudio Da Silva; BUENO, Mauro Sartori; NOZELLA, Eduardo Fernando. Metabolismo de cálcio em ovinos em crescimento sob suplementação com diferentes fontes de cálcio: Aplicação e comparação de dois modelos matemáticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2487–2495, 2006. DOI: 10.1590/S1516-35982006000800039.

4 Alterações hematológicas, bioquímicas e produção de metano em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*

4.1 Resumo

A grande preocupação atualmente é sustentabilidade na produção de ruminantes. Sendo assim, se objetivou demonstrar as alterações hematológicas, bioquímicas e a produção de metano em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. Foram utilizados 20 ovinos da raça Santa Inês, com 7 meses de idade e peso inicial médio de $30,8 \pm 6,41$ kg. Dez animais foram infectados com dose única de 30.000 larvas L3 de *T. colubriformis* + 10.000 larvas L3 de *H. contortus*, e dez animais não foram infectados. Utilizando-se delineamento inteiramente casualizado (DIC). Durante o período experimental foram coletadas amostras de sangue e líquido ruminal, bem como as sobras e a dieta fornecida. Também foram mensurados a produção de metano entérico dos animais ao final do experimento. A infecção parasitária afetou o consumo de matéria seca, diminuição na contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito, e aumento na contagem de eosinófilos e plaquetas. Diminuição proteínas totais e albumina no plasma. Observou-se também alterações fermentativas ruminais, com alterações no perfil de produção de AGCC, com maior produção de metano nos animais infectados. Sendo assim, conclui-se que a infecção mista reduziu o consumo de matéria seca do volumoso com consequente prejuízo no desempenho destes animais, alterações hematológicas e fermentativas ruminais, prejudicando o metabolismo nutricional com maior produção de metano pelos animais infectados.

Palavras-chave: endoparasitas, ovinos, hematologia, AGCC, metano.

4.2 Introdução

Os helmintos gastrintestinais têm grande importância na ovinocultura mundial, pois causam grandes prejuízos na produção animal, com elevados gastos com a prevenção e o tratamento das doenças causadas por eles, sendo problema maior em regiões tropicais e subtropicais, ou seja, de clima quente onde o controle é mais prejudicado (ARSENOPOULOS et al., 2021). Devido a patogenicidade, prevalência e intensidade da infecção causada por endoparasitas pertencentes à família Trichostrongylidae, o *Haemonchus contortus* e o *Trichostrongylus colubriformis* destacam-se como as parasitoses gastrintestinais mais comuns na ovinocultura. (AMARANTE; DA SILVA; RAGAZO, 2014; DE ALMEIDA et al., 2018).

O *H. contortus* é um parasita hematófago, encontrado no abomaso de ruminantes, sendo a principal espécie que acomete ovinos criados em regiões tropicais e subtropicais. Em decorrência da espoliação sanguínea e hemorragias abomasais, a principal característica desta enfermidade é a anemia que, principalmente em cordeiros, podendo ser fatal (BOWMAN, 2010; TAYLOR; COOP; WALL, 2017). O *T. colubriformis* após a infecção do hospedeiro, as larvas em estágio L3, para completarem o seu desenvolvimento, penetram entre as glândulas epiteliais da mucosa duodenal, formando túneis entre o epitélio e a lâmina própria. Ao retornarem à luz intestinal para continuar seu desenvolvimento até adultos, ocorre ruptura da mucosa, com edema, exsudação e hemorragia. As vilosidades intestinais tornam-se achatadas e sinuosas, diminuindo a superfície de absorção (BOWMAN, 2010; TAYLOR; COOP; WALL, 2017).

Portanto, além de causar prejuízos a pecuária ovina através da redução da capacidade de digestão e absorção de nutrientes, a infecção por helmintos gastrintestinais, principalmente em animais em crescimento e gestantes, acarreta também em perdas produtivas devido à redução de ingestão de alimento relacionada a carga parasitária animal (MAVROT; HERTZBERG; TORGERSON, 2015; MÉNDEZ-ORTÍZ et al., 2019). Os possíveis efeitos das parasitoses ao meio ambiente, causados pelos sistemas de produção pecuária, são outro ponto importante, pois as alterações digestivas podem interferir nas emissões de metano (CH₄) entérico pelos ruminantes, que constituem uma das mais importantes fontes de gases de efeito estufa (GEE) antropogênicos e representam uma questão importante em relação aos impactos da

agricultura sobre as mudanças climáticas e do meio ambiente (EISLER et al., 2014; GROSSI et al., 2019). A maioria dos trabalhos analisando as emissões de CH₄ estão relacionadas com o manejo alimentar dos animais. Estudos relacionando produção de GEE em animais parasitados por helmintos gastrintestinais são raros na literatura.

Neste trabalho se objetivou demonstrar as alterações hematológicas, bioquímicas e a produção de metano em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Local do Experimento

O experimento foi realizado, conforme a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (protocolo: 004/2015), nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

4.3.2 Cultivo das Larvas

As larvas utilizadas para a infecção dos animais experimentais foram obtidas a partir das fezes de ovinos doadores previamente preparados. Foram utilizados quatro animais, sendo dois para larvas de *H. contortus* e dois para *T. colubriformis*, previamente tratados com vermífugos comerciais vão querer o nome e doses para garantir a inexistência de infecção cruzada e com o acompanhamento de exame coproparasitológico para confirmar a ausência de infecção parasitária prévia. Dois animais receberam, por via oral, 20.000 larvas L3 de *T. colubriformis* e outros 2 animais receberam 10.000 larvas L3 de *H. contortus*.

Após 21 dias do início da infecção os animais doadores foram monitorados a cada dois dias, por exame coproparasitológico quantitativos, pelo método McMaster modificado de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (LELAND, 1995). Assim que os primeiros ovos foram detectados, iniciou-se as coletas de fezes diretamente da ampola retal de cada animal, que foram utilizadas para o cultivo de ovos e consequentemente obtenção das larvas L3 por meio da coprocultura (Ueno e Gonçalves, 1998).

4.3.3 Delineamento e Manejo Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os animais divididos em dois grupos, não infectados (n=10) e infectados (n=10) com peso inicial de $30,8 \pm 6,41$ kg, aos 7 meses de idade. Durante o experimento os animais foram mantidos em baias individuais (1,0 x 1,5m) providas de comedouro, bebedouro, e durante o experimento receberam água e alimento *ad libitum*.

A dieta (Tabela 1) era composta por feno de Tifton (*Cynodon spp.*) triturado, concentrado (70% de milho e 30% farelo de soja) e suplemento mineral comercial, foi calculada utilizando-se a proporção de 60% de volumoso e 40% de concentrado, sendo oferecida a quantidade de 3% em relação ao peso vivo, segundo a recomendação do NRC (2007) para um ganho em peso de 100 g/animal/dia. Durante o experimento, os animais recebiam primeiramente o concentrado juntamente com o sal mineral, e depois o feno. A dieta de volumoso era sempre ajustada para que houvesse 10% de sobras, representando gravetos e talos, que são naturalmente rejeitados pelos ovinos.

Tabela 4.1 – Composição bromatológica dos componentes da dieta experimental em g/kg de matéria seca (MS) à 100° C

Ingredientes	MS	PB	FDN	FDA	MM	EE
Concentrado	886	248	443	131	34	29
Feno de Tifton	919	88	791	355	70	14
Mistura Mineral	974	-	-	-	892	-

PB – Proteína Bruta; FDN – Fibra Detergente Neutro; FDA – Fibra Detergente Ácido; MM – Matéria Mineral; EE – Extrato Etéreo.

A infecção experimental ocorreu dez dias após o período de adaptação de 10 dias. Dez animais (infectados) receberam, via oral, em dose única 30.000 larvas L3 de *T. colubriformis* + 10.000 larvas L3 de *H. contortus*, e dez animais (não infectados) não foram infectados, e receberam água destilada com o objetivo de não haver diferença de manejo entre os dois grupos de animais.

4.3.4 Consumo Alimentar e Coletas de Sangue

O fornecimento do feno foi realizado *ad libitum*, garantindo sobras de no mínimo 10%, e o concentrado foi calculado e ajustado semanalmente conforme o peso dos animais. As sobras foram pesadas diariamente e o consumo diário foi calculado pela fórmula: consumo (g) = fornecido (g) – sobras (g).

Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 5, 15, 25, 35 e 45 após a infecção, através da punção venosa na veia jugular em tubos de Vacutainer® contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético), sendo variáveis hematológicas foram determinadas pelo analisador hematológico veterinário automatizado Sysmex pochH-100iVDiff®, e para a determinação da proteína total e albumina presentes no plasma, o sangue total, coletado com anticoagulante, foi centrifugado a 2000 x g por 10 minutos a 4º C (EIC Centra-7R – Thermo Scientific IEC – USA). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi pipetado e armazenado em tubos tipo eppendorf até a realização das análises com o uso de Kits comerciais Lab Test® e leitura em espectrofotômetro (JENWAY 7315 – Cole-Parmer, UK), seguindo as recomendações do fabricante.

Amostras de sangue total foram utilizadas para a obtenção de esfregaço sanguíneo destinado a contagem diferencial de leucócitos. Estes, após a secagem, foram corados utilizando-se o corante rápido do tipo Romanowsky (Panótico rápido – Labor Clin® Ltda, Pinhais, Paraná, Brasil). Em cada esfregaço sanguíneo foram diferenciados 100 leucócitos classificados e lidos em microscópio de aumento de 100x, de acordo com suas características morfológicas e tintoriais, em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

4.3.5 Coleta de Líquido Ruminal e Metano Entérico

As amostras do líquido ruminal foram obtidas com a utilização de uma sonda esofágica de silicone, de todos os animais, no dia 0, 42 e 62 pós infecção experimental, de quatro horas após o fornecimento da alimentação matinal, para a posterior realização da quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A concentração de AGCC foi quantificada de acordo com metodologia descrita por Palmquist & Conrad (1971), e adaptada por Lima et al. (2018) utilizando cromatógrafo gasoso após a determinação das curvas de calibração com concentrações conhecidas para cada AGCC.

As medições *in vivo* de metano (CH₄) dos animais foram realizadas entre o 49^o ao 54^o dia após a infecção, utilizando o sistema de câmaras, como descrito por Abdalla et al. (2012). Devido a disponibilidade de apenas 10 câmaras, as medições foram realizadas em duas etapas. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo procedimento para as medições de CH₄, sendo um dia para adaptação à câmara e dois para a coleta, totalizando um período de seis dias. Amostras de gás das câmaras foram coletadas em balões de 5 litros, revestidos com filme de alumínio usando uma bomba peristáltica (Ismatec IPC 12, Ismatec, Wertheim, Alemanha), então 10 mL e cada amostra foram transferidos para tubos de vácuo utilizando seringas de 20 mL (Becton-Dickson Indústria Cirúrgica Ltda, Curitiba, Brasil) e as análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu C-2010, Tóquio, Japão), utilizando as mesmas condições descritas por Lima et al. (2018).

4.3.6 Coleta Urina e Determinação da Síntese de Proteína Microbiana

Os animais foram, ao final do experimento, alocados em gaiolas para estudo de metabolismo de 1,2 x 0,6 m com mecanismo para separação de fezes e urina. A urina diária total produzida foi coletada em baldes plásticos contendo 100 mL de ácido sulfúrico a 10 % para acidificar a urina e evitar a volatilização da amônia. Uma amostra de 10% do volume total foi coletada e adicionada a um “pool” de urina de cada animal, e armazenada em freezer a -20^o C, para posterior análise de derivados de purina, para a determinação da síntese de proteína microbiana.

Para estimar a síntese de proteína microbiana, utilizou-se a metodologia de Makkar e Chen (2004) para quantificação dos derivados de purina na urina após extração seguindo metodologia de Abdalla Filho et al. (2017).

4.4 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa SAS v. 9.3[®] (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Nas variáveis estudadas, foram realizadas análises de variância, considerando 5% o nível de probabilidade. Os dados com medidas repetidas no tempo foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED.

4.5 Resultados

4.5.1 Contagem de Células Sanguíneas

Os animais infectados apresentaram redução no número de eritrócitos (RBC), teor de hemoglobina (HGB) e volume globular (HCT), sendo inferiores quando comparados aos animais não infectados ($p < 0,05$) após os 15 dias de infecção (Figura 4.1). Houve efeito do tempo em todas as variáveis sanguíneas ($p < 0,05$), e interação significativa entre tratamento x tempo ($p < 0,05$).

No volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular médio (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM) não foram encontradas diferenças dos valores ($p > 0,05$), no período avaliado (Tabela 4.2). Os animais infectados apresentaram maior quantidade de plaquetas ao final do experimento ($p < 0,05$) (Tabela 4.3).

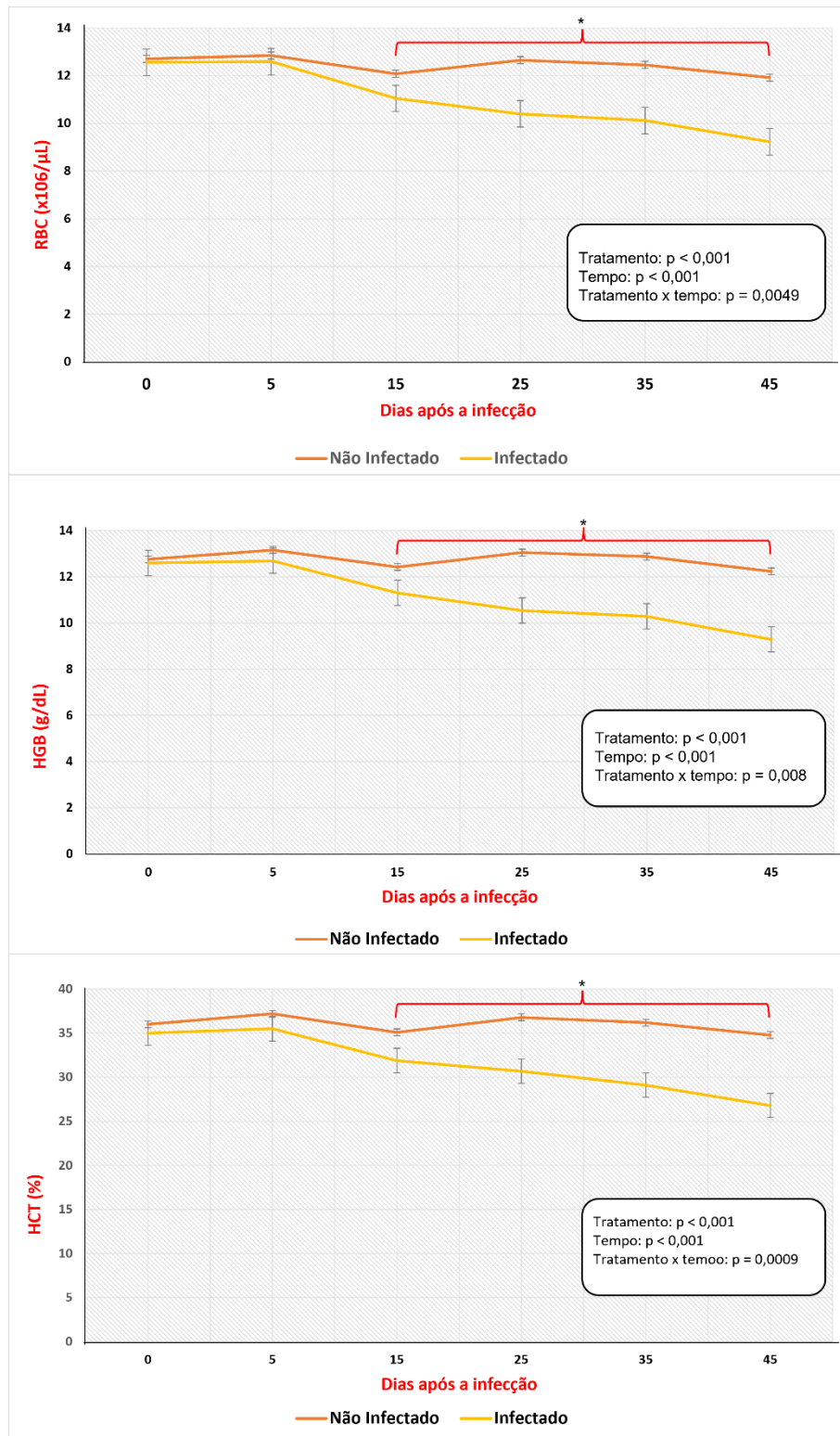


Figura 4.1 - Variáveis hematológicas em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. Contagem de eritrócitos (RBC), contagem de hemoglobina (HGB), e proporção de células vermelhas (HCT). (*) Houve diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$)

Tabela 4.2 - Média das variáveis sanguíneas, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular médio (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM), em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Variável	Dias	Tratamentos			Valor de P		
		Não Infectados	Infectados	EPM	T	D	TxD
VCM	0	28,45	27,93	0,654	ns	ns	ns
	5	28,87	28,30				
	15	29,20	29,01				
	25	29,14	29,61				
	35	29,15	28,87				
	45	29,31	29,01				
HCM	0	10,09	10,07	0,332	ns	ns	ns
	5	10,22	10,12				
	15	10,36	10,27				
	25	10,37	10,14				
	35	10,38	10,10				
	45	10,31	10,05				
CHVM	0	35,46	36,01	0,734	ns	ns	ns
	5	35,38	35,72				
	15	35,46	35,39				
	25	35,55	34,33				
	35	35,62	35,03				
	45	35,14	34,56				

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. ** 5 % de significância ($p < 0,05$). ns = não significativo ($p > 0,05$)

Tabela 4.3 - Média das plaquetas, em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Variável	Dias	Tratamentos		EPM	Valor de P		
		Não Infectados	Infectados		T	D	TxD
Plaquetas	0	347	288	76,5	**	ns	ns
	5	337	276				
	15	314	265				
	25	351	373				
	35	374	470				
	45	436	628				

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. ** 5 % de significância ($p < 0,05$). ns = não significativo ($p > 0,05$)

Na contagem de células brancas (Tabelas 4.4 e 4.5), os valores foram dentro do padrão de normalidade da espécie e idade dos animais (KRAMER, 2006). Os animais infectados apresentaram maior contagem total de leucócitos e neutrófilos no final do período avaliado ($p < 0,05$). A contagem total de eosinófilos foi maior nos animais infectados a partir do 5º dia após a infecção ($p < 0,05$). Não houve diferença na contagem de linfócitos, monócitos e basófilos ($p > 0,05$).

Tabela 4.4 - Média das Leucograma diferencial (leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos) em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Variável (x 10 ³ /μL)	Dias	Tratamentos		EPM	Valor de P		
		Não Infectados	Infectados		T	D	TxD
Leucócitos	0	9,63 ^{Aa}	10,07 ^{Aa}	0,758	**	**	**
	5	8,67 ^{Aa}	11,18 ^{Aa}				
	15	9,85 ^{Aa}	10,6 ^{Aa}				
	25	8,10 ^{Aa}	9,80 ^{Aa}				
	35	8,55 ^{Aa}	11,05 ^{Bb}				
	45	8,68 ^{Aa}	11,90 ^{Bb}				
Neutrófilos	0	1,58 ^{Aa}	2,04 ^{Aa}	0,586	**	**	**
	5	2,96 ^{ABa}	3,37 ^{Aa}				
	15	4,02 ^{Ba}	5,26 ^{Aa}				
	25	3,58 ^{ABa}	3,62 ^{ABa}				
	35	2,63 ^{ABa}	3,81 ^{Ba}				
	45	3,06 ^{Aa}	5,26 ^{Bb}				
Linfócitos	0	7,59	7,46	0,863	ns	ns	ns
	5	5,68	7,54				
	15	5,63	6,66				
	25	4,29	5,72				
	35	5,6	6,85				
	45	5,31	5,93				

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância (**). (ns = não significativo, p > 0,05)

Tabela 4.5 - Média das Leucograma diferencial (eosinófilos, monócitos e basófilos) em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Variável (x 10 ³ /μL)	Dias	Tratamentos		EPM	Valor de P		
		Não Infectados	Infectados		T	D	TxD
Eosinófilos	0	0 ^A	0 ^A	0,051	**	**	**
	5	0 ^{Aa}	0,180 ^{Bb}				
	15	0,0163 ^{Aa}	0,318 ^{Bb}				
	25	0 ^{Aa}	0,207 ^{Bb}				
	35	0 ^{Aa}	0,263 ^{Bb}				
	45	0,03 ^{Aa}	0,237 ^{Bb}				
Monócitos	0	0,3417	0,5709	0,1033	ns	ns	ns
	5	0,0152	0,0179				
	15	0,0967	0,1329				
	25	0,1027	0,0916				
	35	0,1060	0,0985				
	45	0,1512	0,1390				
Basófilos	0	0	0	0,0471	ns	ns	ns
	5	0,029	0,0144				
	15	0,1163	0,0519				
	25	0,0672	0,1237				
	35	0,1820	0,1653				
	45	0,1632	0,2080				

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância (**). (ns = não significativo, p > 0,05)

4.5.2 Variáveis Bioquímicas

Os animais infectados apresentaram menor concentração plasmática de proteínas totais e albumina ($p < 0,05$) (Tabela 4.6). Porém não houve diferença na concentração plasmática de glicose ($p > 0,05$). Houve efeito do tempo em proteínas totais e albumina ($p < 0,05$), e interação significativa entre tratamento x tempo ($p < 0,05$).

Tabela 4.6 - Parâmetros bioquímicos em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Variável	Dias	Tratamentos		EPM	Valor de P		
		Não Infectados	Infectados		T	D	TxD
Proteínas Totais (g/dL)	0	6,62 ^{Aa}	6,59 ^{Aa}	0,112	**	**	**
	5	6,80 ^{Aa}	6,10 ^{Bb}				
	15	6,96 ^{Aa}	5,45 ^{Cb}				
	25	6,83 ^{Aa}	5,32 ^{Db}				
	35	6,90 ^{Aa}	5,57 ^{Eb}				
	45	6,87 ^{Aa}	5,71 ^{Eb}				
Albumina (g/dL)	0	2,80 ^{Aa}	2,78 ^{Aa}	0,079	**	**	**
	5	2,85 ^{Aa}	2,31 ^{Bb}				
	15	2,88 ^{Aa}	2,18 ^{Bb}				
	25	2,85 ^{Aa}	2,10 ^{BCb}				
	35	2,88 ^{Aa}	2,34 ^{Db}				
	45	2,94 ^{Aa}	2,37 ^{Eb}				

continua

conclusão

Variável	Dias	Tratamentos			Valor de P		
		Não Infectados	Infectados	EPM	T	D	TxD
Glicose (mg/dL)	0	69	67	3,89	ns	ns	ns
	5	70	71				
	15	64	62				
	25	75	75				
	35	76	75				
	45	77	76				

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância (**). (ns = não significativo, $p > 0,05$)

4.5.3 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Na determinação dos AGCCs (Tabela 4.7) podemos observar que não houve diferença na produção dos AGCC totais ($p > 0,05$). Entretanto, os animais infectados apresentaram aumento na produção de propionato, diminuição de acetato e conseqüente diminuição na relação acetato/propionato no final do experimento ($p < 0,05$). Houve efeito do tempo no propionato e na relação acetato/propionato ($p < 0,05$).

Tabela 4.7 - Produção de AGCC em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

AGCC	Dias	Tratamentos		EPM	Valor de P		
		Não Infectados	Infectados		T	D	TxD
Totais (mmol/L)	0	156,90	156,65	7,891	ns	ns	ns
	42	160,89	161,62				
	62	152,14	148,25				
Acetado (%)	0	56,62 ^{Aa}	56,08 ^{Aa}	1,111	**	**	ns
	42	55,64 ^{Aa}	53,60 ^{Ba}				
	62	55,34 ^{Aa}	51,86 ^{Bb}				
Propionato (%)	0	15,70 ^{Aa}	15,76 ^{Aa}	0,547	**	**	ns
	42	16,00 ^{Aa}	17,14 ^{Aa}				
	62	16,16 ^{Aa}	18,51 ^{Bb}				
Acetado/Propionato	0	3,64 ^{Aa}	3,59 ^{Aa}	0,184	**	**	ns
	42	3,50 ^{Aa}	3,18 ^{Ba}				
	62	3,32 ^{Aa}	2,85 ^{Bb}				

Trat. = tratamento; Dias = coletas; T x D = interação tratamento e coleta. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância (**). (ns = não significativo, $p > 0,05$)

4.5.4 Quantificação do Metano Entérico

A infecção mista não alterou o total de metano/dia produzido ($p > 0,05$) (Tabela 4.8), porém quando comparamos os animais pela proporção de MS consumida, os infectados consumiram menor quantidade e produziram mais metano ($p < 0,05$), durante o período avaliado.

Tabela 4.8 - Emissões de metano entérico em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Parâmetros	Tratamentos		EPM	Valor de P
	Não Infectados	Infectados		
CMS	1139,17	863,37	68,78	0,0414
CH ₄ (g/dia)	7,80	8,42	0,88	0,6992
CH ₄ /CMS (g/kg MS)	6,75	10,72	0,99	0,0225

CMS = consumo total de matéria seca; CH₄ = Metano

4.5.5 Síntese de Proteína Microbiana por Derivados de Purina

A infecção mista por *H. contortus* e *T. colubriformis* não causou alteração na síntese proteica microbiana (Tabela 4.9), entre os animais estudados, durante o período experimental ($p > 0,05$).

Tabela 4.9 - Síntese proteica microbiana por derivados de purina em ovinos submetidos a infecção mista de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. (EPM = erro padrão da média)

Parâmetros	Tratamentos		EPM	Valor de P
	Não Infectados	Infectados		
DP (mmol/dia)	4,48	4,42	0,10	0,7725
PM absorvida ($\mu\text{mol}/\text{dia}/\text{kg}^{0,75}$)	342,50	376,75	19,87	0,4161
NM fornecido (g N/dia)	3,25	3,21	0,07	0,7715

DP = derivados de purina; PM absorvida = proteína microbiana absorvida. NM fornecido = nitrogênio microbiano fornecido.

4.6 Discussão

Em se tratando de uma infecção mista por *H. contortus* e *T. columbriformis*, se esperava que os efeitos patogênicos fossem potencializados. Apesar de ter ocorrido diminuição na quantidade de eritrócitos, hemoglobina e do volume globular, a partir de 15 dias após a infecção, os valores permaneceram dentro da normalidade para

espécie ovina, próximos ao limite inferior mínimo. Uma das principais características dos ovinos da raça Santa Inês, é a rusticidade e a resiliência perante as condições adversas, principalmente às verminoses gastrintestinais (AMARANTE et al., 2004; CARDIA et al., 2011), a gravidade deste processo é dependente do grau e do tempo da infecção, explicando assim, o não estabelecimento da anemia nos animais infectados, e as demais alterações hematológicas encontradas neste experimento. Esses resultados corroboram com Lima et al. (2019), em experimento com infecção mista por *T. colubriformis* e *H. contortus* em cordeiros, observaram alterações hematológicas a partir do 28º dia de infecção, com redução de hemácias, hemoglobina e hematócrito.

O início das alterações hematológicas observadas coincide com o período de desenvolvimento do parasita até o estabelecimento da infecção, e os valores permaneceram diminuindo em decorrência da ação do parasita adulto. A elevação na contagem de plaquetas observada nos animais infectados, ao final do período experimental, pode ter ocorrido em resposta à espoliação sanguínea e possíveis hemorragias abomasais devido à ação do *H. contortus* (ARSENOPOULOS et al., 2021). O aumento na contagem dos leucócitos e neutrófilos circulantes ao final do período experimental nos animais infectados, se justifica pela modulação do sistema imunológico destes animais. A presença maior dos eosinófilos circulantes nos animais infectados, observada desde os 5 dias após a infecção, é indicativo de uma resposta ativa do sistema imunológico em combate a infecção parasitária.

Os animais infectados apresentaram concentração plasmática de proteínas totais e de albumina abaixo dos padrões para a espécie. A hipoproteïnemia, bastante comum em infecções por helmintos gastrintestinais (AMARANTE; DA SILVA; RAGAZO, 2014), está relacionado a elevada exsudação de proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal pelo *T. colubriformis* (BARKER, 1973), e pela ação espoliativa do *H. contortus* (TAYLOR; COOP; WALL, 2017). O edema submandibular, sinal clínico bastante comum nos casos de hipoproteïnemia, no presente estudo foi observado em apenas dois entre os dez animais infectados, pois a maioria dos animais apresentaram a forma subclínica da parasitose.

A infecção mista resultou em diminuição na ingestão da dieta pelos ovinos, com menor consumo de feno, uma vez que todo o concentrado oferecido foi consumido independente dos tratamentos. Desta maneira, os animais infectados consumiram

maior proporção de concentrado em relação ao feno, levando assim as alterações fermentativas ruminais, demonstradas no perfil dos AGCC produzidos. Os AGCC são principal fonte de energia dos ruminantes, obtidos através da fermentação dos carboidratos pelos microrganismos presentes no rúmen (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2011). No presente estudo, ao final do experimento os animais infectados apresentaram diminuição no acetado, aumento no propionato, e conseqüentemente diminuição na proporção acetado/propionato, indicando mudança no padrão fermentativo ruminal, provavelmente pela redução do consumo do volumoso (feno) favorecendo a produção de propionato para os animais infectados, sendo este o principal substrato gliconeogênico, importante para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose (BERGMAN, 1990).

No entanto o aumento do propionato nos infectados não foi suficiente para reduzir a disponibilidade de H₂ para as bactérias metanogênicas na produção de metano (CH₄) entérico (CHUNG et al., 2012). Trabalhos recentes sinalizam que há maior emissão de metano em ovinos infectados por endoparasitas (FOX et al., 2018; LIMA et al., 2019), porém pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos.

Avaliando a microbiota ruminal em ovinos que receberam tanino condensado a dieta e infectados artificialmente por *T. colubriformis* e *H. contortus*, Corrêa et al. (2020), observaram que a infecção promoveu alterações no perfil de produção de AGCC, e mudanças estruturais do microbioma ruminal dos animais infectados, com a diminuição da abundância de microrganismos produtores de butirato. Em estudo não publicado ainda se utilizando os mesmos animais do presente experimento com a finalidade de avaliar a microbiota ruminal antes e depois da infecção verificou-se diminuição das bactérias metanotróficas, indicando assim, que a maior emissão de CH₄ nos ovinos infectados pode estar relacionado com a redução destas bactérias. Atualmente com o crescimento da preocupação com sustentabilidade na produção de ruminantes, compreender esses fatores ainda pouco explorados, tornam-se necessários.

4.7 Conclusão

A infecção mista de *H. contortus* e *T. colubriformis* diminuiu o consumo do feno, com alteração no perfil de AGCC. Além da redução nos parâmetros hematológicos, causando hipoproteinemia e albuminemia. Houve, ainda maior produção de metano associada a parasitose.

Referências

ABDALLA, Adibe Luiz; LOUVANDINI, Helder; SALLAM, Sobhy Mohamed Abdallah Hassan; DA BUENO, Ives Cláudio Silva; TSAI, Siu Mui; FIGUEIRA, Antonio Vargas Oliveira. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 5, p. 953–964, 2012. DOI: 10.1007/s11250-011-9992-0.

ABDALLA FILHO, A. L.; DINESHKUMAR, D.; BARREAL, M.; MCMANUS, C.; VASCONCELOS, V. R.; ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H. Performance, metabolic variables and enteric methane production of Santa Inês hair lambs fed *Orbignya phalerata* and *Combretum leprosum*. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, n. 3, p. 457–465, 2017. DOI: 10.1111/jpn.12561.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1–2, p. 91–106, 2004. DOI: 10.1016/j.vetpar.2003.12.004.

AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini Do; DA SILVA, Bruna Fernanda; RAGAZO, Alessandra M. A. **Os parasitas de ovinos**. 1. ed. São Paulo: Editora da UNESP, 2014. DOI: 10.7476/9788568334423.

ARSENOPOULOS, Konstantinos V.; FTHENAKIS, George C.; KATSAROU, Eleni I.; PAPADOPOULOS, Elias. Haemonchosis: A challenging parasitic infection of sheep and goats. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–29, 2021. DOI: 10.3390/ani11020363.

BARKER, I. K. A study of the pathogenesis of *Trichostrongylus colubriformis* infection in lambs with observations on the contribution of gastrointestinal plasma loss. **International Journal of Parasitology**, v. 3, n. 6, p. 743-757, 1973.

BERCHIELLI, Telma Teresinha; PIRES, Alexandre Vaz; OLIVEIRA, Simone Gisele De. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990. DOI: 10.1152/physrev.1990.70.2.567.

BOWMAN, Dwight D. **Georgis parasitologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

CARDIA, D. F. F.; ROCHA-OLIVEIRA, R. A.; TSUNEMI, M. H.; AMARANTE, A. F. T. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 248–258, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.017.

CHUNG, Y. H.; ZHOU, M.; HOLTSHAUSEN, L.; ALEXANDER, T. W.; McALLISTER, T. A.; GUAN, L. L.; OBA, M.; BEAUCHEMIN, K. A. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1419–1427, 2012. DOI: 10.3168/jds.2011-4552.

CORRÊA, Patricia Spoto; MENDES, Lucas William; LEMOS, Leandro Nascimento; CROUZOULON, Pierre; NIDERKORN, Vincent; HOSTE, Hervé; COSTA-JÚNIOR, Livio Martins; TSAI, Siu Mui; FACIOLA, Antonio P.; ABDALLA, Adibe Luiz; LOUVANDINI, Helder. Tannin supplementation modulates the composition and function of ruminal microbiome in lambs infected with gastrointestinal nematodes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 3, art. fiae024, 2020. DOI: 10.1093/femsec/fiae024.

DE ALMEIDA, Fabiana Alves; BASSETTO, César Cristiano; AMARANTE, Mônica Regina Vendrame; DE ALBUQUERQUE, Ana Cláudia Alexandre; STARLING, Renan Zappavigna Costa; DO AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini. Helminth infections and hybridization between *haemonchus contortus* and *haemonchus placei* in sheep from Santana do Livramento, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 3, p. 280–288, 2018. DOI: 10.1590/s1984-296120180044.

EISLER, Mark C.; LEE, Michael R. F.; TARLTON, John F.; MARTIN, Graeme B. Agriculture: Steps to sustainable livestock. **Nature**, v. 507, p. 32-34, 2014. DOI: 10.1038/507032a.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: Recent developments. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 3-4, p. 285–297, 1997. DOI: 10.1016/S0304-4017(97)00102-7.

GROSSI, Giampiero; GOGLIO, Pietro; VITALI, Andrea; WILLIAMS, Adrian G. Livestock and climate change: Impact of livestock on climate and mitigation strategies. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 69–76, 2019. DOI: 10.1093/af/vfy034.

KRAMER, J. W. Normal hematology of cattle, sheep, and goats. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. New York: Wiley – Blackwell, 2006.

LELAND, Stanley E. Monospecific nematode infections of donor calves with *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 1–2, p. 111–118, 1995. DOI: 10.1016/0304-4017(94)00744-W.

LIMA, P. M. T.; MOREIRA, G. D.; SAKITA, G. Z.; NATEL, A. S.; MATTOS, W. T.; GIMENES, F. M. A.; GERDES, L.; McMANUS, C.; ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H. Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using in vitro and in vivo bioassays in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 2, p. e669–e676, 2018. DOI: 10.1111/jpn.12810.

LIMA, Paulo de Mello Tavares; CROUZOUOLON, Pierre; SANCHES, Tamires Pinheiro; ZABRÉ, Geneviève; KABORE, Adama; NIDERKORN, Vincent; HOSTE, Hervé; AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do; COSTA-JÚNIOR, Livio Martins; ABDALLA, Adibe Luiz; LOUVANDINI, Helder. Effects of *Acacia mearnsii* supplementation on nutrition, parasitological, blood parameters and methane emissions in Santa Inês sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 207, art. 107777, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.107777.

MAKKAR, H. P. S.; CHEN, X. B. **Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purina derivates**. Dordrech: Springer Netherlands, 2004.

MAVROT, Fabien; HERTZBERG, Hubertus; TORGERSON, Paul. Effect of gastrointestinal nematode infection on sheep performance: A systematic review and meta-analysis. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-1164-z.

MÉNDEZ-ORTÍZ, F. A.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; VARGAS-MAGAÑA, J. J.; SARMIENTO-FRANCO, L.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; VENTURA-CORDERO, J. Impact of gastrointestinal parasitism on dry matter intake and live weight gain of lambs: A meta-analysis to estimate the metabolic cost of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 265, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.11.008.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. Origin of Plasma Fatty Acids in Lactating Cows Fed High Grain or High Fat Diets. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 7, p. 1025–1033, 1971. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(71)85966-0.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

UENO, Hakaru; GONÇALVES, Pedro Cabral. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo, Japan: JICA, 1998.

ZAISS, M. M.; HARRIS, N. L. Interactions between the intestinal microbiome and helminth parasites. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–11, 2016. DOI: 10.1111/PIM.12274.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente estudo, podemos observar que a infecção mista por *H. contortus* e *T. colubriformis*, bastante prevalentes entre os parasitas gastrintestinais em ovinos, interferiu no consumo de matéria seca dos cordeiros, comprometendo nutricionalmente esses animais, e conseqüentemente o desempenho. A infecção mista interferiu no processo fermentativo ruminal, alterando a produção de AGCC, importante fonte energética para os ruminantes.

Houve diminuição da capacidade absorptiva intestinal do P, interferindo em toda a dinâmica do mineral no organismo animal, comprometendo todo seu metabolismo, seja de aproveitamento ou armazenamento pelo organismo, e maior perda de P nas fezes, gerando perdas econômicas aos sistemas de produção. Demonstrando o agravamento da patogenicidade da associação destes dois parasitas, ainda pouco explorada em conjunto. A observação dessas alterações foi possível através da utilização da técnica da diluição isotópica com ^{32}P , juntamente com a modelagem.

Além dos prejuízos econômicos devido ao baixo desempenho dos cordeiros infectados, nosso trabalho reafirma o problema ambiental das parasitoses intestinais, pois causam aumento da excreção de P para o meio ambiente, contaminado solo e as águas. Juntando a isso, se observou que os animais infectados apresentaram maior produção de metano, importante gás responsável pelo aumento do efeito estufa, que ainda é pouco explorado pelas pesquisas científicas.