UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

TAIRON PANNUNZIO DIAS E SILVA

Modelagem de fósforo em cordeiros submetidos à infecção experimental com *Trichostrongylus colubriformis* com uso de ^{32}P

Piracicaba

2017

TAIRON PANNUNZIO DIAS E SILVA

Modelagem de fósforo em cordeiros submetidos à infecção experimental com *Trichostrongylus colubriformis* com uso de ^{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

2017

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

Silva, Tairon Pannunzio Dias e
Modelagem de fósforo em cordeiros submetidos à infecção experimental com *Trichostrongylus colubriformis* com uso de ^{32}P / Tairon Pannunzio Dias e Silva; orientador Helder Louvandini. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.
85 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.

1. Biodisponibilidade 2. Helmintologia veterinária 3. Hematologia veterinária 4. Metabolismo animal 5. Ovinos 6. Parasitologia veterinária 7. Radioisótopos I. Título

CDU 576.89 (591.11.15 + 621.039.85)

Aos meus pais, ***Vitória*** *e* ***Alcibias****, meus irmãos e à minha eterna namorada* ***Vanessa*** *que, de forma incondicional, acreditaram, apoiaram as escolhas e os caminhos percorridos e juntos visualizamos um amanhã melhor,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por conceder a capacidade de persistir e buscar meus objetivos, me reerguendo após os erros e me fortalecendo para torná-los virtudes, me fazendo refletir nos momentos mais difíceis e pela promessa que me fizeste há muitos anos.

A meu pai, **Alcibias Marques** e, em especial a minha mãe, **Vitória Dias**, que mesmo distante, ora por mim todos os dias, que chora na minha saída e na minha chegada e é por ela que nunca desisto.

Aos meus Irmãos, **Graciete, Lizandra, Ladmo, Neiviton e Marquezan** pela infância juntos e cada um com sua parcela de contribuição em minha vida.

A **Vanessa Vogado**, que dividiu comigo a felicidade do início, que durante esses três anos de Doutorado soube tudo o que aconteceu e que no final, à sua maneira, me ajudou a escrever a presente Tese. Assim, sabe o quanto eu busquei essa conquista, sabe o que busco para minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão da bolsa de Doutorado e pela reserva técnica (**Processo 2014/05023-1**) que foi significativamente importante para a realização deste Projeto de Tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pelo suporte financeiro no início do Doutorado.

Ao meu orientador, **Prof. Helder Louvandini**, pela oportunidade concedida, pela oportunidade de crescimento e por sua disponibilidade durante o Doutorado.

Ao **Prof. Adibe Luiz Abdalla**, pelo acolhimento no Laboratório de Nutrição Animal e sua disponibilidade para comigo.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio Aparecido Castilho, Joaquim Everaldo M. Santos, Aparecido Elpídio.

A toda equipe de alunos e amigos do Laboratório de Nutrição Animal, Dinesh Kumar, Adibe Filho, Egon Ieda, Paulo Tavares, Carolina Jimenez, Gabriel Sakita, Pierre Crouzoulon, Aline Schumann, Ana Claudia Koki, Juliano Issakowicz, Linander Campos, Thiago Bompadre, Érika Canova, Andressa Natel, Alessandra Romero, Patricia Righeto.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (**CENA**) e a Universidade de São Paulo (**USP**) por toda a estrutura física, didática e pedagógica fornecida para a realização do Doutorado. Ao Instituto de Zootecnia e ao Instituto de Biociências da Unesp pelo apoio secundário no desenvolvimento da Tese.

Ao Programa de Pós-Graduação e seus funcionários (Alzira, Cleide, Daiane, Daniel, Fábio, Gilson, Magali, Marcos, Neuda, Raquel, Sônia), pelo pronto atendimento durante o doutorado.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

SILVA, T. P. D. **Modelagem de fósforo em cordeiros submetidos à infecção experimental com *Trichostrongylus colubriformis* com uso de ^{32}P**. 2017. 85 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Objetivando-se avaliar variáveis hemato-bioquímicas, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho animal, assim como, o metabolismo e a cinética do fósforo (P) em cordeiros infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*, foram realizados dois experimentos. No primeiro estudo, foram utilizados 18 cordeiros machos, da raça Santa Inês, distribuídos em dois tratamentos experimentais: grupo infectado (I, n=9) e grupo controle (C, n=9) sem infecção. Os cordeiros do grupo I receberam aproximadamente 5000 L3, três vezes por semana, durante três semanas, totalizando 45000 L3 de *T. colubriformis*. O controle do consumo do alimento foi diário, utilizando a metodologia do tipo pair-fed (para eliminar efeito de consumo). Foram avaliados quinzenalmente, durante 75 dias, os dados de peso vivo, escore de condição corporal e amostras de sangue e fezes foram colhidas para determinação do hemograma, bioquímica sérica e contagem de ovos por grama de fezes (OPG), respectivamente. Também foi avaliado a digestibilidade aparente dos nutrientes e os parâmetros ruminais dos cordeiros. Os cordeiros apresentaram infecção moderada (OPG = 620,3 ± 594,98) com redução de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média e proteínas totais ($P < 0,1$). Por outro lado, houve aumento do número de plaquetas, bem como a quantidade de eosinófilos circulantes quando comparado aos cordeiros do grupo C ($P < 0,1$). Não houve alteração no consumo voluntário dos cordeiros I ($P > 0,05$), porém houve menor digestibilidade da MS ($P < 0,1$). Diante disso, conclui-se que a infecção por *T. colubriformis* alterou parâmetros hematológicos, bioquímicos, não interferindo no consumo de matéria seca, mas, reduzindo digestibilidade da MS em cordeiros infectados. No segundo estudo, objetivou-se avaliar o metabolismo e a cinética do P em cordeiros infectados experimentalmente com *T. colubriformis* utilizando a técnica de diluição isotópica e modelagem. Para tanto, foram utilizados 15 cordeiros distribuídos nos tratamentos infectado (I, n=8) e controle (C, n=7) como descrito acima. Após 66 dias da última inoculação foi injetado 6,6 MBq de ^{32}P/cordeiro para avaliar a cinética do mineral. Amostras de sangue, fezes e urina foram coletados nos sete dias seguintes, com abate dos cordeiros no último dia para colheita de amostras dos tecidos ósseo e moles (fígado, rim, coração e músculo). Para análises dos fluxos de P foi utilizado o modelo biomatemático descrito por Lopes et al. (2001). Foi verificado consumo semelhante de P (V_I) entre os cordeiros dos dois tratamentos ($P > 0,1$), menor absorção das frações do P endógeno (Vaf) e dietético (Vaa) bem como maior excreção do P de origem dietético (V_{FD}) nos cordeiros I ($P < 0,1$). Com a menor absorção (V_{aT}) de P em cordeiros I, houve, consequentemente, menor distribuição e menor incorporação de P nos ossos (V_{O+D}). Conclui-se que o metabolismo de P de cordeiros infectados por *T. colubriformis* foi alterado, com redução da sua absorção intestinal e biodisponibilidade, com aumento da perda fecal e redução do fluxo de P para ossos.

Palavras-chave: Desempenho. Endoparasitas. Hematologia. Ruminantes. Radiofósforo. Santa Inês

ABSTRACT

SILVA, T. P. D. **Phosphorus modelling in lambs submitted to experimental infection with *Trichostrongylus colubriformis* with the use of ^{32}P**. 2017. 85 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Aiming to evaluate hemato-biochemical variables, apparent digestibility and performance as well as the metabolism and kinetic of phosphorus (P) in lambs experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*, two experiments were conducted. At the first study, 18 male lambs were distributed in two experimental treatments: infected group (I, n=9) and control group (C, n=9) unaffected. Infected lambs received approximately 5000 *T. colubriformis* infective larvae (L3), three times per week, during three weeks, totalling 45 000 *T. colubriformis* L3. The control of daily feed intake was performed (pair-fed). Data of live weight, body condition score and samples of blood and faeces were collected fortnightly, during 75 days to analyze the hemogram, biochemical variables and faecal egg count (FEC), respectively. In addition, apparent digestibility and ruminal parameters of lambs were determined. Lambs presented moderate infection (FEC = 620.3 ± 594.98) with decreased erythrocytes, haemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration and total protein. On the other hand, increased platelets counts as well as the amount of circulating eosinophils when compared to the group C ($P < 0.1$). The voluntary intake of infected lambs was not altered, but there was lower dry matter digestibility. It was concluded that *T. colubriformis* infection altered haematological and biochemical parameters. It did not interfere in dry matter intake, but decreased digestibility in infected lambs. In the second study, the objective was to study the metabolism and kinetic of P in lambs experimentally infected with *T. colubriformis* using isotope dilution technique and modelling. For this, 15 lambs distributed in the infected treatment (I, n=8) e control (C, n=7) as described above were used. After 66 days of the last inoculation was injected 6.6 MBq of ^{32}P/lamb to evaluate the kinetics of the mineral. Blood, faeces and urine samples were collected in the following seven days and the slaughter of lambs was carried out on the last day in order to collect bone and soft tissues (Liver, kidney, heart and muscle) samples. To analyze P flows the biomathematical model described by Lopes et al. (2001) was used. Similar P intake between treatments was verified (V_I) ($P > 0.1$), lower absorption of endogenous (Vaf) and dietary P (Vaa) as well as higher excretion of dietary P (V_{FD}) in infected lambs ($P < 0.1$). With the lower absorption (V_{aT}) of P in infected lambs, there was, consequently, lower distribution and lower incorporation of P in the bones (V_{O+D}). It was concluded that P metabolism of lambs infected with *T. colubriformis* was altered, with reduced intestinal absorption and bioavailability, increased faecal loss and reduced P flow to bone.

Keywords: Endoparasites. Hematology. Performance. Radiophosphorus. Ruminants. Santa Inês

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compartimentos utilizados em modelos propostos para representar o metabolismo de fósforo em animais 35
Tabela 2 - Composição bromatológica dos ingredientes da dieta experimental com base na matéria seca 50
Tabela 3 - Variáveis hematológicas de cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* durante 75 dias 55
Tabela 4 - Variáveis bioquímicas de cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* 56
Tabela 5 - Consumo de matéria seca e desempenho de cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* 57
Tabela 6 - Digestibilidade aparente da dieta (%) em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* 58
Tabela 7 - Balanço de nitrogênio (N) em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* 59
Tabela 8 - Efeito da infecção induzida com *Trichostrongylus colubriformis* nos parâmetros ruminais e contagens de protozoários em cordeiros 59
Tabela 9 - Médias das variáveis relacionadas aos fluxos de fósforo (P) e disponibilidade biológica do elemento em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* 77
Tabela 10 - Médias das variáveis relacionadas aos fluxos de fósforo (P) em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* 78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da técnica de diluição isotópica usando o ^{32}P na avaliação da cinética do fósforo (P) em ovinos 33
Figura 2 - Média de ovos por grama de fezes nos cordeiros infectados com *Trichostrongylus colubriformis* durante o período experimental 54
Figura 3 - Escore de condição corporal de cordeiros controle e infectados no período experimental 58
Figura 4 - Modelo matemático do metabolismo do fósforo 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% percentagem

^{32}P fósforo radioativo

ADP adenosina difosfato

ATP adenosina trifosfato

BHB beta-hidroxibutírico

C tratamento controle

Ca cálcio

CA conversão alimentar

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ hidroxiapatita

$Ca_3(PO_4)_2$ fosfato de cálcio

cap capítulo

CHCM Concentração de hemoglobina corpuscular média

CMS consumo de matéria seca

CT calcitonina

CTMS consumo total de matéria seca

DA digestibilidade aparente

DCC dihidroxi-colicalciferol

dL decilitro

ECC escore de condição corporal

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA fibra em detergente ácido

FDN fibra em detergente neutro

g grama

GPMD ganho em peso médio diário

GTP ganho total em peso

H_2PO_4 diidrogenofosfato

H2SO4 ácido sulfúrico

H3BO3 ácido bórico

HCM hemoglobina corpuscular média

HPO_4 hidrogenofosfato

I tratamento infectado

kg kilograma

L1, L2, L3, L4, L5 estádios de desenvolvimento larval

MBq megabecquerel

MeV mega elétronvolt

Mg miligrama

mL mililitro

mm milímetro

MO matéria orgânica

MS matéria seca

N nitrogênio

NaOH hidróxido de sódio

N-NH3 nitrogênio amoniacal

OPG ovos por grama de fezes

P Fósforo

PB proteína bruta

PC peso corporal

pH potencial de hidrogênio

PO_4^- ácido fosfórico

PTH paratormônio

PV peso vivo

relação A/G relação albumina/globulina

TGI trato grastrintestinal

V_{0+} P incorporado no osso

V_{aa} P absorvido de origem alimentar

V_{af} P endógeno reabsorvido no TGI

V_{aT} total de P absorvido

VCM volume corpuscular média

V_{eD1} P do V_{aT} que retorna para o TGI

V_{eD2} P do V_{aT} distribuído para o osso e tecidos moles

V_{eO-} P reabsorvido do osso, que retorna ao TGI

V_{eT-} P reabsorvido dos tecidos moles, que retorna ao TGI

V_f P endógeno fecal

V_F perda total de P nas fezes

V_{FD} P nas fezes de origem dietética

V_I quantidade de P ingerido

V_{IT} P de origem endógena, que chega ao trato gastrintestinal - TGI

V_{O-} P reabsorvido do osso

V_{O+D} P do V_{aT} incorporado no osso

V_{O+R} total de P reciclado para o osso e tecidos moles

V_{O+R1} P dos tecidos moles reciclado para osso e tecidos moles

V_{O+R2} P do osso reciclado para o osso e tecidos moles

V_{O+T} P do V_{aT} incorporado nos tecidos moles

V_{T01} P do V_{O+R} reincorporado nos tecidos moles

V_{T02} P do V_{O+R} reincorporada no osso

V_{Te-} P reabsorvido dos tecidos moles

V_{Te+} P incorporado nos tecidos moles

V_U perda de P na urina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21
1.1. Hipóteses 22
1.2. Objetivos 22
2. REVISÃO DE LITERATURA 23
2.1. Fósforo no organismo animal 23
2.1.1. O fósforo nos ossos, sangue e tecidos moles 23
2.1.2. O fósforo no rúmen e na saliva 25
2.1.3. Fósforo nas fezes e urina 25
2.1.4. Perda endógena fecal de fósforo 26
2.1.5. Absorção de fósforo 26
2.1.6. Homeostase e controle hormonal do fósforo 27
2.2. Parasitismo por *Trichostrongylus colubriformis* 28
2.2.1. Biologia do nematoide 28
2.2.2 Sinais clínicos e efeitos em ovinos 29
2.2.3. Influência no metabolismo do fósforo em ovinos 31
2.3. Princípios básicos e uso da técnica de diluição isotópica 32
2.4. Modelagem aplicada ao estudo da cinética do fósforo 34
2.5. Uso da técnica de diluição isotópica e modelagem na avaliação do metabolismo de fósforo em ruminantes 36
REFERÊNCIAS 37
3. Variáveis hemato-bioquímicas, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de cordeiros infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* 46
3.1. Introdução 47
3.2. Material e métodos 48
3.2.1. Local do estudo 48
3.2.2. Cultivo de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* 48
3.2.3. Grupos experimentais, período experimental, dieta, regime alimentar e inoculação dos animais 49
3.2.4. Peso corporal, escore de condição corporal, contagem de ovos nas fezes e carga parasitária 50
3.2.5. Avaliação do consumo 51

3.2.6. Ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes 51
3.2.7. Parâmetros de fermentação ruminal 52
3.2.8. Balanço de nitrogênio 52
3.2.9. Variáveis hematológicas e bioquímicas 52
3.2.10. Análises estatísticas dos dados 53
3.3. Resultados 54
3.3.1. Ovos por grama de fezes, carga parasitária e sinais clínicos observados 54
3.3.2. Variáveis hematológicas e bioquímicas 55
3.3.3. Desempenho dos animais 56
3.3.4. Parâmetros de fermentação ruminal 59
3.4. Discussão 59
3.5. Conclusões 63
Referências 63
4. Cinética do fósforo em cordeiros infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* com o uso de ^{32}P 67
4.1. Introdução 68
4.2. Material e métodos 69
4.2.1. Descrição e tratamentos 69
4.2.2. Aplicação do fósforo radioativo e coletas de amostras 69
4.2.3. Definições e cálculos de determinação 71
4.2.3.1. Plasma 71
4.2.3.2. Fezes 71
4.2.3.3. Perda endógena fecal 72
4.2.3.4. Absorção real e biodisponibilidade 72
4.2.4. Modelo Lopes et al. (2001) 72
4.2.5. Análises estatísticas dos dados 76
4.3. Resultados 76
4.4. Discussão 78
4.5. Conclusões 81
CONSIDERAÇÕES FINAIS 82
Referências 83

1. INTRODUÇÃO

A essencialidade do fósforo (P) no organismo animal o torna um elemento central nos estudos de nutrição. Mineral integrante de várias funções metabólicas e biológicas, com intensa atuação no crescimento, manutenção e reparo de tecidos corporais, contribuindo para a homeostase.

A deficiência de P é uma das mais difundida e economicamente importante de todas as deficiências minerais em animais de produção, principalmente, mantidos em pastagens, com efeitos negativos sobre o consumo e desempenho animal, tornando-se necessária a realização da suplementação dietética de P na maioria dos sistemas de produção animal.

Um fator que pode comprometer a utilização do P proveniente da dieta em ruminantes é a helmintose gastrintestinal que, constitui um dos principais fatores limitantes para a produção de ovinos em todo o mundo (MAVROT; HERTZBERG; TORGERSON, 2015), especialmente para os mantidos em pastagens. As perdas causadas pelas verminoses gastrintestinais são determinadas não somente pelos efeitos agudos da doença, que, em muitos casos, resultam em morte do animal infectado, mas, principalmente, pelos danos indiretos causados por infecções crônicas, acarretando desenvolvimento corporal lento, perda em peso, redução na produção de carne e lã e aumento das despesas associadas ao controle de doenças (CHARLIER et al., 2014).

A ação desses parasitas sobre o organismo infectado provoca falha na absorção de minerais acarretando em redução do crescimento do esqueleto, da densidade e mineralização óssea (FOX et al., 1977). Segundo Poppi et al. (1985) a infecção por *Trichostrongylus colubriformis* reduz a absorção (WILSON; FIELD, 1983; BOWN; POPPI; SYKES, 1989) e o metabolismo do P dietético e aumenta a perda endógena, provocando a deficiência sistêmica desse elemento. Infecções crônicas, de caráter subclínico, induzem a deficiência marginal de P, sendo economicamente mais prejudicial, pois, pela ausência de sinais clínicos, nenhum cuidado é tomado para minimizar essas perdas e/ou aumentar o potencial de produtividade dos animais (FORBES et al., 2002). Além disso, o comprometimento da correta utilização do P pelos ruminantes infectados por endoparasitas, pode levar a excreção maior deste mineral para o ambiente, que representa risco de contaminação do solo e água, acelerando o processo de eutrofização e alterando a biodiversidade. Diante dessa situação, é importante determinar com exatidão a influência da tricostrongilose intestinal no aproveitamento do P de origem dietética, através da determinação da perda fecal endógena e dietética.

Usualmente, a determinação do aproveitamento de minerais pelos animais é feito pela sua absorção e retenção usando o balanço químico, que é representado pela diferença entre a quantidade consumida e a quantidade presente nas fezes (VITTI; KEBREAB, 2010). Como o P apresenta constante reciclagem para o trato gastrintestinal e perda endógena nas fezes, essa técnica não fornece informação exata sobre sua absorção, pois não é capaz de distinguir a fração não absorvida de origem dietética da fração não absorvida de origem endógena (SANDSTRÖM et al., 1993).

Nesse sentido, deve-se utilizar metodologias que eficientemente caracterizem o metabolismo do P em ovinos, combinando resultados de absorção, balanço e cinética do elemento com o uso de ^{32}P, para desenvolver modelos capazes de disponibilizar informações que contribuam para fundamentar o manejo nutricional e sanitário dos ovinos, sempre buscando o desenvolvimento sustentável, com respeito ao ambiente, produção ecologicamente equilibrada e economicamente viável.

1.1. Hipóteses

- A infecção por *Trichostrongylus colubriformis* em cordeiros afeta o consumo e a digestibilidade dos nutrientes.
- A infecção por *T. colubriformis* causa alterações hematológicas e bioquímicas em cordeiros.
- A infecção por *T. colubriformis* interfere na capacidade absortiva do fósforo em cordeiros.
- A infecção por *T. colubriformis* altera os fluxos de fósforo entre os tecidos corporais de cordeiros.

1.2. Objetivos

- Avaliar o efeito da infecção induzida com *T. colubriformis* sobre variáveis hemato-bioquímicas, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de cordeiros.
- Avaliar o metabolismo e a cinética do P em cordeiros infectados experimentalmente com *T. colubriformis* usando a técnica de diluição isotópica e modelagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fósforo no organismo animal

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais importantes da nutrição animal, atuando nos diversos processos metabólicos corporais, visando a homeostase. Também, apresenta-se como um dos principais componentes dos ossos e parte essencial dos ácidos nucléicos (ácidos desoxirribonucleico e ribonucleico), sendo indispensável para a transferência de informação genética.

Dentre suas funções metabólicas, está a participação no metabolismo energético (integrante das moléculas de ATP e ADP), sendo ainda componente essencial dos aminoácidos, proteínas e lipídeos (TERNOUTH, 1990; IQBAL et al., 2005). O P possui um maior número de funções metabólicas que o cálcio (WALKER; AL-ALI, 1987) e ainda é o elemento com funções biológicas mais conhecidas que qualquer outro mineral (NRC, 2001). Em ruminantes, o P exerce importante função no metabolismo, manutenção e crescimento da microbiota do rúmen (BREVES; SCHRÖDER, 1991).

Sendo um componente obrigatório da dieta de todas as espécies de animais, a deficiência de P é conhecida e economicamente importante em diversas regiões do mundo. Sendo considerado um mineral limitante, o correto balanceamento de P na dieta promove um melhor desempenho animal e reduz os custos com a suplementação (DIAZ GONZALEZ; OSPINA; BARCELLOS, 1998).

2.1.1. O fósforo nos ossos, sangue e tecidos moles

O P é um dos macros minerais que está em maior quantidade nos mamíferos, sendo que 80 % desse elemento estão presentes nos ossos e dentes. Na matriz óssea, o P participa da mineralização na forma de fosfato de cálcio - $Ca_3(PO_4)_2$ e hidroxiapatita - $Ca_{10}(PO_4)_6$ $(OH)_2$ que constituem a matriz inorgânica dos ossos, conferindo rigidez a estrutura e a sustentação para a musculatura. Dessa forma, no metabolismo do P, o osso atua como reservatório desse mineral, onde 40 % da demanda de P, em situações que ocorre deficiência do elemento, pode ser suprida através da reabsorção óssea (SEVILLA, 1985).

A nível sanguíneo (compartimento central de reserva de nutrientes), o P torna-se prontamente disponível para metabolização. Esse compartimento é ininterruptamente suprido com minerais pelo sistema digestivo, através do fornecimento dietético, órgãos e tecidos,

através da cinética dos elementos, ou seja, pela mobilização dos minerais em decorrência das necessidades do organismo, buscando a homeostase. Por outro lado, a eliminação dos minerais se dá pelos órgãos de excreção, carreados, em ruminantes, principalmente pelas fezes e em segundo plano (rota secundária) pela urina, em ambos os casos, com uma determinada taxa metabólica (ANNENKOV, 1982). No plasma sanguíneo, o P está sob as formas orgânica e inorgânica, sendo que em grande parte é constituído por frações orgânicas. Nesse compartimento, o P inorgânico está sob a forma de ácido fosfórico (PO_4^-), hidrogenofosfato (HPO_4) e diidrogenofosfato (H_2PO_4) (GEORGIEVSKII, 1982).

Em ovinos hígidos e sob condições normais, os valores de P estão entre 4 a 9 mg/100 mL de plasma (McDOWELL et al., 2003), sendo que valores acima de 9 mg P/100 mL de plasma podem indicar alterações dos fluxos entre compartimentos, buscando a homeostase desse elemento e valores de P plasmático abaixo de 4 mg/100 mL indicam deficiência do elemento (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Entretanto, existem controvérsias com relação ao teor de P plasmático. Ternouth e Sevilla (1990) afirmaram que existe uma correlação entre o P consumido e o P inorgânico plasmático. No entanto, várias pesquisas (BRAITHWAITE, 1984; CHALLA; BRAITHWAITE, 1988b; LOUVANDINI; VITTI, 1994; LOUVANDINI, 1995; PORTILHO et al., 2006) demonstraram não existir uma correlação entre o consumo de P e o P no plasma. O P inorgânico plasmático, é indicador do perfil do elemento no organismo animal, mas nem sempre o P sanguíneo reflete a realidade nutricional do animal com relação ao elemento, uma vez que, a cinética do P está em constante adaptação às diversas condições que afetam o status desse elemento no organismo animal. Por exemplo, a redução do consumo de alimentos causando um aumento na reabsorção óssea (BORTOLUSSI; TERNOUTH; MCMENIMAN, 1996), levando influxo de P na corrente sanguínea; verminoses que afetam a capacidade absortiva do elemento (WILSON; FIELD, 1983; LOUVANDINI et al., 2009a, 2009b); altos níveis de cálcio plasmático que promovem uma maior retenção e absorção de P (RAJARATNE; SCOTT; BUCHAN, 1994).

Nos tecidos, o P é fundamental no metabolismo energético, participando das ligações de alta energia, metabolismo de carboidratos, pela formação de coenzimas, assim como no metabolismo intermediário de proteína. O P presente nesses compartimentos (sangue e tecidos) representa os 20 % restantes do total corpóreo desse macro elemento (UNDERWOOD, 1981; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

2.1.2. O fósforo no rúmen e na saliva

O P presente no rúmen é de origem dietética e endógena. O P endógeno, ou seja, proveniente da reciclagem do P via saliva, representa cerca de 50 a 70 % do P presente no liquido ruminal (VALK et al., 2000; VITTI; KEBREAB, 2010). O P é constituinte das células microbianas, sendo fundamental para a nutrição e crescimento dos micro-organismos ruminais (BREVES; SCHRÖDER, 1991). A nível ruminal, o P está principalmente sob a forma inorgânica, proveniente da hidrólise de compostos orgânicos e da saliva.

O P presente na saliva participa do controle da homeostasia do ambiente ruminal. Esse elemento atua como agente tamponante, controlando o pH no rúmen, para que este não abaixe de 6 em decorrência da produção de ácidos orgânicos, mantendo-o em níveis adequados (6-7), permitindo ampla atividade microbiana.

Os valores normais de P na saliva de ovinos são entre 2 a 6 mg/100 mL (THOMPSON JUNIOR, 1978) com taxa diária de secreção de 5 a 10 g (SCOTT, 1988; BREVES; SCHRÖDER, 1991), com variação dependente do consumo de matéria seca e P, bem como do teor de fibra efetiva presente na dieta (CSIRO, 1990; VALK et al., 2000). A secreção salivar de P que, consequentemente, é incorporado aos microrganismos ruminais, representa aproximadamente 80 % do P endógeno reciclado para o trato gastrintestinal (VITTI; KEBREAB, 2010).

2.1.3. Fósforo nas fezes e urina

Em ruminantes a excreção do P ocorre, principalmente, pelas fezes. O P perdido por essa via apresenta duas frações: o P de origem dietética que, pode ser eliminado via fezes em consequência de não estar disponível para absorção, visto que no rúmen foi utilizado pelas bactérias e encontra-se conjugado a proteínas bacterianas, que escaparam da digestão abomasal ou está sob a forma de complexos minerais insolúveis. Por outro lado, mesmo que disponível para absorção, parte do P dietético, sob a forma inorgânica, passa pelo trato digestivo intacto em decorrência do atendimento das exigências ou condição fisiológica do animal (SPIEKERS et al., 1993).

A outra fração é do P endógeno que, é derivado das secreções salivares, dos sucos digestivos e, das células intestinais devido à descamação e renovação da camada interna do órgão (BRAVO et al., 2003b). A perda total de P via fezes é dependente do consumo do

elemento (TERNOUTH, 1990; LOUVANDINI; VITTI, 2007), podendo corresponder a 70 % do P consumido (BRAITHWAITE, 1985; VITTI et al., 1991; BRAVO et al., 2003b).

A excreção de P pela urina em ruminantes é considerada uma rota secundária, pelas pequenas quantidades excretadas, sendo que sob condições normais é inferior a 2 mg/Kg de peso vivo/dia (TERNOUTH, 1990), porém é considerada uma via que contribui para a homeostase do P em ruminantes (BRAVO et al., 2003a). As maiores concentrações podem ser observadas quando animais apresentam teor de P no plasma superior a 6 mg/100 mL (CHALLA; BRAITHWAITE, 1988a), uma vez que, alto teor de P no sangue excede a capacidade de reabsorção dos túbulos renais com consequente perda significativa por esta via (FIELD; WOOLLIAMS; DINGWALL, 1985).

2.1.4. Perda endógena fecal de fósforo

A perda endógena de P, tem sido definida como a quantidade de P que foi regularmente absorvida, metabolizada e excretada nas fezes (GEORGIEVSKII, 1982). Segundo Bravo et al. (2003b) os microrganismos ruminais que escapam à digestão gástrica (pós-ruminal), também são fontes de perda endógena fecal de P e que a saliva é a maior fonte de P endógeno (BRAVO et al., 2003b; VITTI; KEBREAB, 2010), sendo influenciada pelo consumo de matéria seca, a forma física em que a dieta é ofertada aos animais, assim como o teor de P presente na dieta (VALK et al., 2000).

No organismo animal, o nível de P endógeno pode apresentar alta variação dependendo das condições fisiológicas do animal (McDOWELL, 1992; VALK et al., 2000), sendo que, a relação do P endógeno fecal com a perda total de P é altamente variável (0,12 a 0,95) (BRAVO; MESCHY, 2003) e dependente da idade, dieta consumida e condições fisiológicas do animal (LOUVANDINI; VITTI, 2007).

2.1.5. Absorção de fósforo

No processo de absorção em ruminantes, o P a ser metabolizado é proveniente do alimento fornecido e do processo de reciclagem e disponibilização do elemento via saliva. O P dietético está sob a forma inorgânica (mono, di e tri fosfatos) e orgânica (fitatos, fosfolipideos e fosfoproteínas). O P inorgânico é solubilizado pela ação do suco gástrico. Contudo, grande parte do P orgânico (fitato) sofre ação dos microrganismos a nível ruminal (BRAVO; MESCHY, 2003).

O principal local de absorção do P é no intestino delgado (REINHARDT; HORST; GOFF, 1988; BREVES; SCHRÖDER, 1991). Estima-se que ovinos são capazes de absorver, aproximadamente, 4 g P/dia no intestino delgado (PFEFFER et al., 1989), sendo o duodeno o local de maior absorção, onde o pH é baixo o suficiente para realizar a formação de fosfatos solúveis (BEN-GHEDALIA et al., 1975). No entanto, a quantidade a ser absorvida é dependente de alguns fatores como a fonte de P, consumo, relação Ca:P, pH intestinal, a disponibilidade de outros elementos minerais, da idade, do estado fisiológico (BRAITHWAITE, 1984) e da genética animal (FIELD; WOOLLIAMS, 1984). O parasitismo gastrintestinal é outro fator que interfere na absorção do P (REVERON; TOPPS; GELMAN, 1974; SYKES; COOP, 1976; WILSON; FIELD, 1983; POPPI et al., 1985; TAYLOR et al., 2010; CARDIA et al., 2011) devido às extensas lesões na mucosa intestinal, provocando falhas na absorção de nutrientes (CANTACESSI et al., 2010).

Ainda em relação a absorção do P, a nível intestinal, este processo pode ocorrer de duas maneiras, ativa ou passiva. O processo passivo é predominante quando ocorre alta disponibilidade de P no lúmen intestinal, ou seja, está relacionado ao consumo do mineral (BRAITHWAITE, 1984). Por outro lado, o processo ativo ocorre quando a demanda de P pelo animal é alta, sendo dependente de sódio (HUBER, et al., 2002). Diversos autores têm relatado alta relação entre o consumo e a absorção de P (BRAITHWAITE, 1984; COATES; TERNOUTH, 1992; LOUVANDINI; VITTI, 1994; VITTI, 2000).

O P após ser absorvido é metabolizado e carregado via sangue aos diversos tecidos e órgãos, atuando efetivamente nos processos metabólicos do corpo (metabolismo energético - ATP e ADP, aminoácidos, proteínas e lipídeos) (TERNOUTH, 1990; IQBAL et al., 2005).

2.1.6. Homeostase e controle hormonal do fósforo

Homeostase ou homeostasia é definida como os mecanismos de regulação que o organismo animal possui para o equilíbrio de seu metabolismo em resposta a alterações dietéticas ou fisiológicas (CHALLA; BRAITHWAITE, 1988a). No caso particular do P, essa regulação é realizada por meio da absorção, excreção, retenção, reciclagem e secreção no trato digestivo, deposição e reabsorção óssea e, a importância de cada mecanismo depende do *status* do P no animal e da quantidade de P presente na dieta (LOUVANDINI, 1995).

Nesse processo, as glândulas salivares, os sítios de absorção do P no intestino, principalmente no duodeno (local de maior absorção) e, em determinadas situações, os rins atuam no controle e/ou promoção da homeostase do P em ruminantes (BRAVO et al., 2003a).

O Ca e o P apresentam uma estreita relação no organismo, sendo que seus metabolismos apresentam mecanismos biológicos, químicos e físicos semelhantes, interagindo no trato gastrintestinal, nos fluidos celulares e no sistema osso-sangue. O excesso ou carência de um desses elementos na dieta afeta diretamente o aproveitamento do outro, comprometendo sua homeostase (ANDRIGUETTO et al., 1990). A relação ótima de Ca e P na dieta é 2:1 permitindo a máxima taxa de absorção (SALVIANO; VITTI, 1996). São elementos que a manutenção da homeostasia também passa por controle hormonal, sendo o P submetido a um controle secundário ao Ca (SCHRÖDER et al., 1995).

Os hormônios envolvidos no controle da homeostasia do Ca e P são o paratormônio (PTH), calcitonina (CT) e o dihidroxi-colicalciferol (DCC). As glândulas paratireoides secretam o PTH em resposta à baixa concentração de cálcio (hipocalcemia) (CARE et al., 1980). A circulação de PTH estimula os rins a produzirem DCC e, juntos atuam estimulando a reabsorção óssea, com consequente disponibilização de Ca e P. Em outro mecanismo, o DCC atua a nível de parede gastrintestinal promovendo a absorção pelo intestino, buscando aumentar os níveis plasmáticos de Ca e P (TERNOUTH, 1990). Por outro lado, em resposta a altas concentrações de Ca plasmático, a glândula tireoide secreta a CT que atua buscando inibir as reabsorções óssea e renal e absorção intestinal diminuindo os níveis de Ca e P (MATSUI et al., 1984).

2.2. Parasitismo por *Trichostrongylus colubriformis*

2.2.1. Biologia do nematoide

Ovinos são parasitados por duas espécies de *Trichostrongylus*, as quais possuem diferentes locais de estabelecimento no trato gastrintestinal. *Trichostrongylus axei* é um nematóide que parasita o abomaso e sua ocorrência tem sido frequentemente registrada no Brasil, porém, com baixa intensidade de infecção (RAMOS et al., 2004). O *Trichostrongylus colubriformis* parasita o intestino delgado, apresenta alta ocorrência e ampla resistência a anti-helmínticos (AMARANTE; ROCHA; BRICARELLO, 2007; ALMEIDA et al., 2010). O nematoide adulto da espécie *T. colubriformis* apresenta pequeno porte (dificilmente visto a olho nu durante necropsias), com comprimento variando de 4 a 12 mm e vivem em túneis nas vilosidades (AMARANTE, 2015). Esse parasita possui corpo delicado, extremamente delgado com aspecto capilariforme (VICENTE et al., 1997).

Os parasitas machos possuem bolsa copuladora em forma de “arpão”, de coloração acastanhada, com gubernáculo navicular e espículos curtos e grossos. Já as fêmeas apresentam cauda curta e afilada. A vulva está localizada na metade posterior do corpo, com ausência de apêndices vulvares. As fêmeas de *T. colubriformis* chegam a eliminar entre 300 a 600 ovos por dia nas fezes (DOBSON; WALLER; DONALD, 1990; AMARANTE; ROCHA; BRICARELLO, 2007).

Parasitas do gênero *Trichostrongylus* apresentam ciclo de vida direto, não necessitando de hospedeiro intermediário e, com duas fases de vida distintas, uma fase de vida livre e outra parasitária. Parasitas adultos, no intestino delgado, realizam a postura dos ovos que são eliminados no ambiente via fezes. Após a eclosão, dá-se origem as larvas em primeiro estádio de desenvolvimento (L1), essas larvas mudam de cutícula entrando no segundo estádio de desenvolvimento (L2) que, posteriormente, originarão as larvas de terceiro estádio de desenvolvimento (L3), que são larvas infectantes e capazes de infectar um novo hospedeiro. A fase de vida livre tem duração aproximada de sete dias. As larvas L3 são ingeridas no momento em que os ovinos realizam o pastejo em pastagem contaminada e, completam o ciclo evolutivo (desenvolvimento para estádio 4 e estádio 5) no aparelho digestivo, originando machos e fêmeas adultas (AMARANTE, 2015). Segundo Wood et al. (1995), o período de pré-patência do *T. colubriformis* pode durar em média 21 dias, sendo que na fase de vida livre, larvas infectantes são capazes de sobreviver por longos períodos, mesmo sob condições adversas de frio ou dessecação em estado de anidrobiose (LETTINI; SUKHDEO, 2006).

2.2.2. Sinais clínicos e efeitos em ovinos

A sintomatologia clínica em animais com verminose é resultante da tripla interação desafio (número diário de larvas infectantes ingeridas) versus estabelecimento (número de parasitas estabelecidos no trato gastrintestinal) e resposta imune (eficiência da resposta imunológica do hospedeiro) (AMARANTE, 2015). Em consequência da eficiência da resposta imunológica do hospedeiro ser influênciada por vários fatores como taxa de infecção, tempo de exposição e nutrição, comumente é visto que um rebanho apresente ovinos susceptíveis, que são gravemente acometidos, ovinos resilientes, que são capazes de manter a produtividade mesmo infectados e, ovinos resistentes, nos quais poucos parasitas conseguem se estabelecer. Esse comportamento é denominado padrão de distribuição binomial negativo (STEAR; MURRAY, 1994), com poucos animais eliminando alta carga de ovos na pastagem para continuidade do ciclo do parasita.

Quando os ovinos são gravemente acometidos pela tricostrongilose e apresentam infecção severa há a ocorrência de enterites graves. A região de estabelecimento da infecção é o terço inicial (duodeno) do intestino delgado onde formam túneis provocando erosão de epitélio intestinal com atrofia generalizada de vilosidades e microvilosidades, hipertrofia de criptas intestinais, espessamento de mucosa, além da formação de infiltrados inflamatórios leucocitários (BARKER, 1973; BARKER, 1975a; TAYLOR et al., 2010; CARDIA et al., 2011). Os nematídes se alimentam do conteúdo das células epiteliais necrosadas (ANDRONICOS et al., 2012), líquidos tissulares e do quimo presente na luz do intestino delgado.

Essas alterações promovem aumento da permeabilidade vascular (BARKER, 1975b) prejudicando a motilidade gastrintestinal com redução do consumo de nutrientes (GREER et al., 2005), com alteração do fluxo da digesta ao longo do trato, com redução da digestão e absorção de nutrientes (COOP; ANGUS, 1975; SYKES; COOP, 1976; STEEL; SYMONS; JONES, 1980; JONES, 1983; GREGORY et al., 1985; CANTACESSI et al., 2010) e, consequente, redução da taxa de crescimento (STEEL; SYMONS; JONES, 1980). Os danos promovidos pelo *T. colubriformis* no duodeno (principal local de absorção de nutrientes), dependendo da carga parasitária e resposta imune do hospedeiro pode comprometer a capacidade absortiva dos minerais com consequente alterações no metabolismo desses elementos, principalmente Ca e P, minerais que atuam na regulação de diversos processos orgânicos (HORTON, 1977; POPPI et al., 1985).

Dados da literatura se mostram controversos em relação à causa da diminuição da produtividade em animais parasitados com *T. colubriformis*. Estudos apontam a anorexia induzida pelo parasita como causa das perdas produtivas (SYKES; COOP; ANGUS, 1979; BOWN; POPPI; SYKES, 1989; FOX et al., 1997; CANTACESSI et al., 2010). Porém, esse mecanismo responsável pela anorexia ainda permanece indefinido. Uma outra vertente, atribui à baixa eficiência na digestão e absorção dos nutrientes pelos ovinos infectados como causa da baixa produtividade (SYKES; POPPI; ELLIOT, 1988; COOP; KYRIAZAKIS, 1999; CARDIA et al., 2011). A diminuição da eficiência de utilização de nutrientes resulta tanto da não utilização (pela redução da capacidade absortiva) como do particionamento de nutrientes absorvidos que, antes seriam utilizados para a maximização do desempenho animal, são então, com o estabelecimento da infecção, direcionados para o reparo do trato gastrintestinal, reposição de proteínas perdidas em decorrência dos danos provocados à mucosa intestinal (TAYLOR et al., 2010), assim como fortalecimento da resposta imune do hospedeiro (COOP; SYKES, 2002).

A tricostrongilose geralmente manifesta-se em caráter subclínico, acarretando desenvolvimento corporal lento, perda em peso, redução na produção de carne e lã e aumento das despesas associadas ao controle da doença (ABRÃO et al., 2010) e, dependendo do nível de infecção, pode ocorrer elevada taxa de mortalidade em animais jovens (LEVINE, 1980; RADOSTITS et al., 2007; TAYLOR et al., 2007).

2.2.3. Influência no metabolismo do fósforo em ovinos

Efeitos no metabolismo do P podem levar a sérios danos ao crescimento ósseo e desempenho de ovinos (SYKES; COOP, 1976; 1977; SYKES; COOP; ANGUS, 1977; 1979). Poppi et al. (1985) avaliando ovinos infectados com 2500 larvas de *T. colubriformis* por dia, durante 14 semanas, verificaram que a infecção afetou vários aspectos do metabolismo do P, tais como, redução nas concentrações sanguíneas do elemento, amplo comprometimento da capacidade absortiva do P, redução do consumo de P (4,4 g/dia), sendo que cordeiros sadios consumiram 6,6 g P/dia. Os autores, também verificaram grande fluxo duodenal de P em cordeiros C, sugerindo alta taxa de reciclagem de P via saliva. Ainda foi verificado alto fluxo de P a nível de íleo em cordeiros I, indicando que, em decorrência do parasitismo e seu efeito, a capacidade absortiva do duodeno foi comprometida, com consequente tentativa de compensação do organismo infectado, mudando o local de absorção do P.

A infecção por *T. colubriformis* acarretou pronunciada redução no conteúdo de P no esqueleto de cordeiros infectados quando comparado aos submetidos ao consumo do tipo pair-fed ou *ad libitum* (SYKES; COOP; ANGUS, 1975; 1979; SYKES; COOP, 1976). Essa desmineralização pode ter ocorrido em consequência da depressão da capacidade de absorção de nutrientes (REVERON; TOPPS; GELMAN, 1974; SYKES; COOP, 1976; BOWN; POPPI; SYKES, 1989; FOX et al., 1997), provocada pelo *T. colubriformis* (BARKER, 1973; BARKER, 1975a; TAYLOR et al., 2010; CARDIA et al., 2011). Segundo Wilson e Field (1983), a possível razão para esse efeito no sistema ósseo é que o *T. colubriformis* induz uma deficiência mineral através da redução da absorção de Ca e P dietético e/ou aumento da perda endógena desses macros elementos. Esses autores verificaram que cordeiros infectados com 3000 larvas de *T. colubriformis* por dia, durante 8 semanas, reduziram em 30 % a absorção de P exógeno e aumento da perda endógena do elemento, causando deficiência de P. Dessa forma, houve uma redução da secreção de P salivar assim como uma redução da concentração do elemento no plasma (WILSON; FIELD, 1983).

Poucos são os estudos avaliando a suplementação de P em ovinos infectados com nematoides gastrintestinais e seus efeitos na capacidade de absorção e disponibilidade do elemento para os tecidos. Porém, Coop e Field (1983) mostraram que aumento na concentração de P na dieta, de 1,88 para 2,75 g P/kg MS, promoveu maior ganho em peso em cordeiros recebendo 2500 L3 de *T. vitrinus*/dia. A suplementação também reduziu a contagem de ovos por grama de fezes e a carga parasitária, sugerindo que o nível de P na dieta pode interferir no desenvolvimento da resistência durante uma infecção contínua.

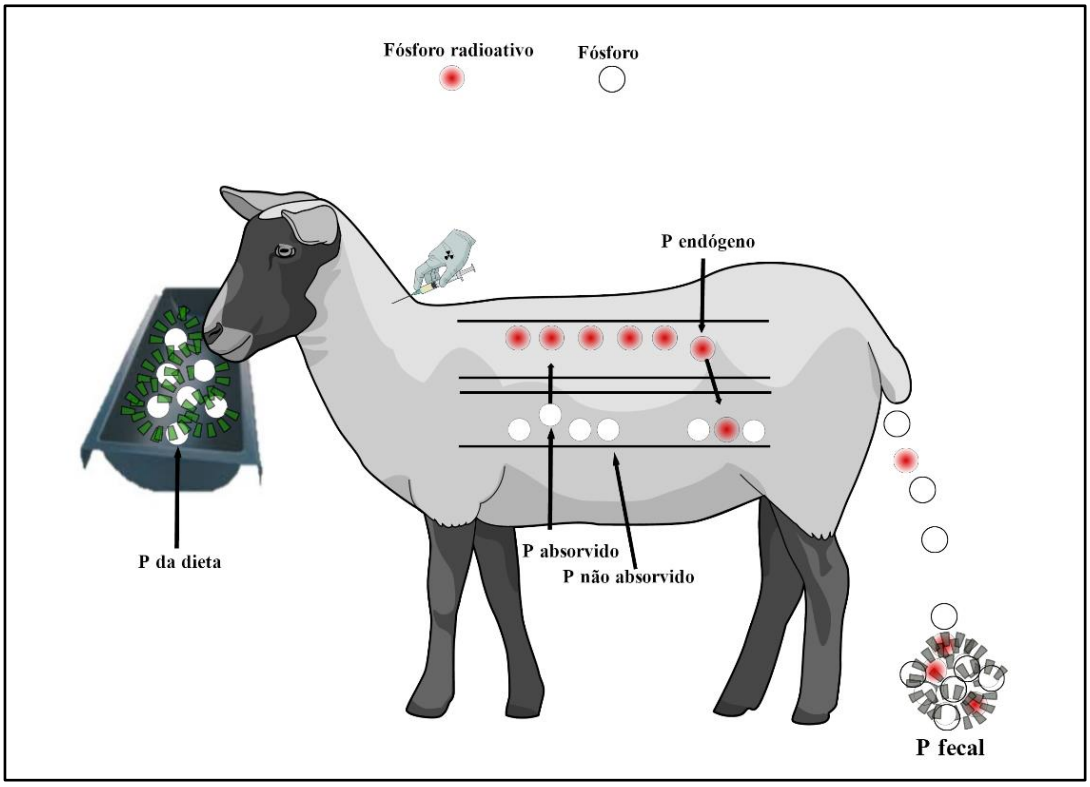
2.3. Princípios básicos e uso da técnica de diluição isotópica

Os primeiros estudos com o uso de um traçador radioativo foram conduzidos para determinação de chumbo em rochas (HEVESY; HOBBIE, 1932). O uso da técnica para determinar o P endógeno fecal e a digestibilidade verdadeira foi proposta por Kleiber et al. (1951) usando o ^{32}P. A técnica de diluição isotópica baseia-se no uso de uma quantidade conhecida do isótopo radioativo (traçador) de uma substância a ser avaliada em uma amostra ou sistema, que este se distribui homogeneamente, no caso de um sistema corpóreo, nos fluidos (plasma, líquidos intersticiais etc.), entendendo-se que a quantidade desse traçador nas fezes refere-se à fração endógena do elemento estudado.

Um traçador radioativo é considerado ideal quando apresenta propriedades químicas, físicas ou biológicas igual ao elemento a ser analisado, com alguma característica particular que o torna capaz de ser detectado (CANTONE; GIUSSANI, 2001). Isótopos são elementos que possuem as mesmas propriedades químicas, porém com diferentes massas atômicas condicionadas pelos diferentes números de elétrons. Assumindo que o traçador radioativo e o elemento não marcado estejam em total equilíbrio no sistema, o traçador irá seguir o movimento do elemento não marcado, sendo capaz de determinar a cinética desse elemento em um determinado sistema (VITTI; KEBREAB, 2010). A utilização do ^{32}P na avaliação do metabolismo do P em ruminantes é mundialmente difundida não somente por fornecer de forma precisa a cinética do elemento, mais também, por apresentar meia-vida de 14,3 dias (ideal para estudos de metabolismo) e, por emitir radiação do tipo β (com energia máxima de 1,71 MeV, radiação detectável por efeito Cerenkov).

A Figura 1 mostra o esquema de diluição isotópica usando o ^{32}P para determinar o P endógeno e a absorção real.

Figura 1 - Esquema ilustrativo da técnica de diluição isotópica usando o ^{32}P na avaliação da cinética do fósforo (P) em ovinos (Adaptado de Lofgreen e Kleiber (1954) e Vitti e Kebreab (2010))



A técnica de diluição isotópica baseia-se na conservação da massa após a diluição, sendo que a conservação da massa se manifesta pela conservação da atividade (FASSETT, 1995). Quando o ^{32}P é carreado do sangue para o trato digestivo, é misturado e diluído ao P dietético e segue o fluxo normal que culmina em sua excreção via fezes. Segundo Annenkov (1982), após a injeção do ^{32}P, rapidamente ele é detectado nas fezes. Sendo que em ovinos, a detecção máxima ocorre 24 horas após a injeção do ^{32}P no sangue (VITTI, 1989). Sendo assim, faz-se necessário calcular essa diluição para determinar a perda endógena e absorção real de P (COMAR et al., 1953):

Plasma:

- Atividade injetada (%) = $\frac{\text{Contagem por minuto da amostra}}{\text{Contagem por minuto na solução padrão}} \times 100$

- Atividade específicaca no plasma = $\frac{\text{Atividade injetada (\%)}}{\text{Plasma (mg P/mL)}}$

Fezes:

- Atividade específica nas fezes = $\frac{\text{Atividade injetada (\%)}}{\text{Fezes (mg P/g)}}$

- Perda endógena fecal de fósforo (%) = $\frac{\text{Atividade específica nas fezes}}{\text{Atividade específica no plasma}}$ x 100

- Total de fósforo endógena (g/dia) = Perda endógena fecal de fósforo (%) x total de fezes (g/dia)
- Absorção real (g/dia) = fósforo consumido – (fósforo fecal exógeno - fósforo fecal endógeno)

- Disponibilidade biológica de fósforo = $\frac{\text{Fósforo absorvido (g/dia)}}{\text{Fósforo consumido (g/dia)}}$ x 100

A determinação da perda endógena de P foi aperfeiçoada por Lofgreen e Kleiber (1954), possibilitando a disseminação da metodologia baseada no uso de ^{32}P. Assim, foi possível relatar que os ovinos quando submetidos a um baixo nível de P na dieta reduzem a perda endógena do elemento (YOUNG et al., 1966). Com o uso da técnica foi possível demonstrar que existe relação linear entre o consumo e a perda endógena de P (BRAITHWAITE, 1985; TERNOUTH, 1989; LOUVANDINI, 1995; BRAVO et al., 2003b; PORTILHO et al., 2006).

2.4. Modelagem aplicada ao estudo da cinética do fósforo

A modelagem do P é caracterizada por um conjunto de equações que simulam o comportamento de um sistema biológico (KEBREAB et al., 2004). Sendo uma importante ferramenta investigativa na nutrição animal. Com o uso de radionuclídeos, como o ^{32}P, é possível a formulação de modelos complexos que abordem, com precisão, a quantificação das variáveis inerentes ao modelo e consequentemente, se ajustar aos fenômenos biológicos, tais como absorção, incorporação, reabsorção, reciclagem e reincorporação do nutriente.

Dois tipos de modelos são descritos, o estocástico e o compartimental. Os modelos estocásticos envolvem componentes obtidos de forma casualizada ou determinística. Já a análise compartimental é muito utilizada na avaliação dos sistemas biológicos, sintetizando modelos mais simples que simulam o fluxo do traçador analisado

(BROWN; ROTHERY, 1993). Segundo Grace (1981), os compartimentos do modelo estão relacionados aos processos metabólicos e apresentam fluxo constante de entrada e saída de P.

Para estudos em modelos compartimentais as seguintes premissas devem ser estabelecidas: (1) a cinética do sistema é linear, ou seja, a quantidade do mineral absorvida é proporcional à sua concentração no sistema; (2) o marcador mistura-se totalmente ao elemento marcado; (3) o metabolismo do animal está em equilíbrio (SCHNEIDER et al., 1985).

Alguns modelos têm sido propostos para representar o metabolismo de P nos animais, os quais se diferenciam principalmente com relação ao número de compartimentos utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 - Compartimentos utilizados em modelos propostos para representar o metabolismo de fósforo em animais

Nº compartimentos	**Compartimentos**	**Autores**
2	TGI e plasma	Lofgreen e Kleiber (1953)
3	TGI, plasma e osso	Fernández (1995)
4	TGI, plasma, osso e tecidos moles	Vitti et al. (2000)
4	TGI, plasma, osso e tecidos moles	Lopes et al. (2001)
6	Rúmen, TGI, saliva, plasma, osso e tecidos moles	Vitti et al. (2000)
8	Sangue, tecidos moles, osso, rúmen, abomaso e intestino delgado superior, intestino delgado inferior, intestino grosso e rins	Schneider et al. (1987)

TGI - Trato gastrintestinal; adaptado de Vitti e Kebreab (2010).

O modelo proposto por Fernández (1995) foi desenvolvido para o estudo do metabolismo de cálcio e fósforo em suínos, pela combinação de resultados de absorção, balanço e cinética dos minerais. É considerado um modelo preciso, porém, leva em consideração o fluxo em três compartimentos (TGI, sangue e osso) (Tabela 1). Esse modelo foi adaptado por Lopes et al. (2001), com a introdução de um quarto compartimento, os tecidos moles, permitindo uma avaliação mais detalhada dos fluxos de Ca e P no organismo animal.

Para o estudo da cinética de P em caprinos, Vitti et al. (2000) propuseram um modelo de quatro compartimentos (Tabela 1), com fluxo bidirecional entre o TGI, osso e tecidos

moles com o plasma. O modelo proposto assume que não há reentrada de marcador (nesse caso o ^{32}P) de outras fontes externas e que para formular as equações que descrevem o comportamento do sistema deve ser respeitado o princípio de conservação das massas.

2.5. Uso da técnica de diluição isotópica e modelagem na avaliação do metabolismo de fósforo em ruminantes

Wilson e Field (1983) utilizaram a técnica de diluição isotópica com ^{32}P para estudo do metabolismo de P em cordeiros infectados com *T. colubriformis*, sendo verificado uma deficiência mineral devido à redução de 30 % da absorção de P exógeno, causando deficiência de P, conduzindo a uma redução da secreção de P salivar, bem como uma redução da concentração do elemento no plasma.

Utilizando a mesma técnica, Louvandini et al. (2009a; 2009b) realizaram dois experimentos em bezerros infectados com *Cooperia punctata*, um com infecção única e outro com infecção seriada. Em bezerros submetidos a infecção única, não houve redução do consumo, mas foi observado redução do peso vivo, do teor de P no plasma e da retenção do mineral, com maior excreção do P nas fezes. Na infecção seriada houve redução na ingestão da dieta, redução da absorção de P e perda em peso desses animais, agravando ainda mais o quadro clínico dos bezerros infectados.

Louvandini et al. (2008) utilizaram o modelo adaptado por Lopes et al. (2001) para estudar o efeito de diferentes níveis de P na dieta de cordeiros em crescimento. Na modelagem foi verificado que os fluxos mostraram uma relação positiva linear ou exponencial com o P consumido. Os autores verificaram ainda um aumento na incorporação e reabsorção nos ossos e tecidos moles com o aumento dos níveis de P na dieta. Assim, os autores destacaram que esse modelo se sobressai sobre os demais por detalhar as trocas entre tecidos e as várias rotas, sendo assim o mais indicado para o estudo da cinética do P em ovinos.

Com o uso do modelo descrito por Vitti et al. (2000) para avaliar o fluxo de P em bezerros infectados com *C. punctata*, foi possível verificar que uma infecção única, de 45000 larvas infectantes, promoveu um balanço negativo de P no osso e nos tecidos moles (LOUVANDINI et al., 2009a). Na infecção seriada (10000 larvas infectantes/semana, durante 35 dias), houve redução do fluxo de P do sangue para o TGI, do TGI para o sangue, do sangue para os tecidos moles, no balanço do osso e dos tecidos moles em bezerros infectados (LOUVANDINI et al., 2009b).

REFERÊNCIAS

ABRÃO, D. C. et al. Utilização do método Famacha no diagnostico clinico individual de haemoncose em ovinos no sudoeste do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, p. 70-72, 2010.

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

AMARANTE, A. F. T. **Os parasitas de ovinos**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2015. 263p.

AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, R. A.; BRICARELLO, P. A. Relationship of intestinal histology with the resistance to *Trichostrongylus colubriformis* infection in three breeds of sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 43-48, 2007.

ANDRIGUETTO, J. et al. **As bases e os fundamentos da nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 396p.

ANDRONICOS, N. M. et al. *Trichostrongylus colubriformis* larvae induce necrosis and release of IL33 from intestinal epithelial cells in vitro: implications for gastrointestinal nematode vaccine design. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.42, p.295-304, 2012.

ANNENKOV, B. N. Kinetics of mineral metabolismo in organs and tissues. In: GEORGIEVSKII, V. I.; ANNENKOV, B. N.; SAMOKHIN, V. I. (Ed.). **Mineral nutrition of animals**. London: Butterworths, 1982. p. 243-257.

BARKER, I. K. Scanning electron microscopy of the duodenal mucosa of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **Parasitology**, London, v. 3, p. 307-314, 1973.

BARKER, I. K. Intestinal pathology associated with *Trichostrongylus colubriformis* infection in sheep: Histology. **Parasitology**, London, v. 70, p. 165-171,1975a.

BARKER, I. K. Intestinal pathology associated with *Trichostrongylus colubriformis* infection in sheep: vascular permeability and ultrastructure of the mucosa. **Parasitology**, London, v. 70, p. 173-80, 1975b.

BEN-GHEDALIA, D. et al. Solubility and net exchange of calcium, magnesium and phosphorus in digesta flowing along the gut of the sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 332, p. 87-94, 1975.

BORTOLUSSI, G.; TERNOUTH, J. H.; MCMENIMAN, N. P. Dietary nitrogen and phosphorus depletion in cattle and their effects on live weight gain, blood metabolite concentrations and phosphorus kinetics. **Journal of Agricultural Science,** London, v. 126, p. 493-501, 1996.

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**, Liverpool, v. 101, p. 11–20, 1989.

BRAITHWAITE, G. D. Endogenous faecal loss of phosphorus in growing lambs and the calculation of phosphorus requirements. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 105, p. 67-72, 1985.

BRAITHWAITE, G. D. Some observations of phosphorus homeostasis and requirements of sheep. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 102, p. 295-306, 1984.

BRAVO, D. et al. Phosphorus availability of oilseed meals determined by the apparent faecal digestibility technique. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 108, p. 43-60, 2003a.

BRAVO, D. et al. Quantitative aspects of phosphorus excretion in ruminants. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 43, p. 285-300, 2003b.

BRAVO, D.; MESCHY, F. Towards revised dietary phosphorus recommendation for ruminants. **Productions Animales**, Paris, v. 16, p. 19-26, 2003.

BREVES, G.; SCHRÖDER, B. Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 4, p. 125-140, 1991.

BROWN, D.; ROTHERY, P. **Models in biology**: mathematics, statistics and computing. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. 687 p.

CANTACESSI, C. et al. First transcriptomic analysis of the economically important parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using a next-generation sequencing approach. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 8 p. 1199-1207, 2010.

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. et al. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, p. 248-258, 2011.

CARE, A. D.; BARLET, J. P.; ABDELHAFEEZ, H. M. Calcium and phosphate homeostasis in ruminants and its relationship to the etiology and prevention of parturient paresis. In: RUCKEBUSCH, Y.; THVENT, P. (Ed.). **Digestive physiology and metabolism in ruminants**. Westport: AVI Publishing, 1980. p. 429-446.

CHALLA, J.; BRAITHWAITE, G. D. Phosphorus and calcium metabolism in growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis. 1. Studies of the effects of changes in the dietary phosphorus intake on phosphorus and calcium metabolism. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 110, p. 573-581, 1988a.

CHALLA, J.; BRAITHWAITE, G. D. Phosphorus and calcium metabolism in growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis. 2. Studies of the effects of different levels of phosphorus, infused abomasally on phosphorus metabolism. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 110, p. 583-589, 1988b.

CHARLIER, J. et al. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 361-367, 2014.

COATES, D. B.; TERNOUTH, J. H. Phosphorus kinetics of cattle grazing tropical pastures and implications for estimation of their phosphorus requirement. **Journal of Agricultural Science,** London, v. 119, p. 401-410, 1992.

COMAR, C. L. et al. Comparison of two isotope methods for determination of endogenous fecal calcium**. Journal of Nutrition**, Springfield, v. 50, p. 459-467, 1953.

COOP, R. L.; ANGUS K. W. The effect of continuous doses of *Trichostrongylus colubriformis* larvae on the intestinal mucosa of sheep and on liver vitamin A concentration. **Parasitology**, London, v. 70, p. 1-9, 1975.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition-parasite interaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, p. 187-204, 1999.

COOP, R. L.; SYKES, A. R. Interactions between gastrointestinal parasites and nutrients. In: FREER, M.; DOVE, H. (Ed.). **Sheep nutrition**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2002. p. 313-331.

COMMONWEALTH SCIENTIFI C AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION - CSIRO. **Feeding Standards for Australian Livestock**: Ruminants. Melbourne, Victoria, Australia: CSIRO Publishers, 1990.

DIAS, R. S. et al. A revised model for studying phosphorus and calcium kinetics in growing sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 2787-2794, 2006.

DIAS, R. S. et al. Phosphorus kinetics in lambs fed diferente levels of calcium phosphate. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 145, p. 509-516, 2007.

DIAZ GONZALEZ, F. H.; OSPINA, H.; BARCELLOS, J. O. J. (Ed.). **Nutrição mineral em ruminantes**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. 146 p.

DOBSON, R. J.; WALLER, P. J.; DONALD, A. D. Popupation dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: The effect of infection rate on the establishment of infective larvae parasite fecundity. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 20, p. 347-352, 1990.

FASSETT, J. D. Isotopic and nuclear analytical techniques in biological systems: a critical study. Part X. Elemental isotope dilution analysis with radioactive and stable isotopes. **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 67, p. 1943-1949, 1995.

FERNÁNDEZ, J. A. Calcium and phosphorus metabolism in growing pigs. III. A model resolution. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 41, p. 255-261, 1995.

FIELD, A. C.; WOOLLIAMS, J. A. Genetic control of phosphorus metabolism in sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 64, p. 232-233, 1984.

FIELD, A. C.; WOOLLIAMS, J. A.; DINGWALL, R. A. The effect of dietary intake of calcium and dry matter on the absorption and excretion of calcium and phosphorus by growing lambs. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 105, p. 237-243, 1985.

FORBES, A. B. et al. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 339-344, 2002.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, p. 285-308, 1997.

GEORGIEVSKII, V. I. The physiological role of macro-elements. In: GEORGIEVSKII, V. I.; ANNENKOV, B. N.; SAMOKHIN, V. I. (Ed.). **Mineral nutrition of animals**. London: Butterworths, 1982. p. 91-170.

GRACE, N. D. Phosphorus kinetics in the sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 45, p. 367-374, 1981.

GREER, A. W. et al. The effect of concurrent corticosteroid-induced immuno-suppression and infection with the intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis* on feed intake and utilization in both immunologically naïve and competent sheep. **Animal Science**, Cambridge, v. 80, p. 89-99, 2005.

GREGORY, P. C. et al. The influence of a chronic subclinical infection of *Trichostrongylus colubriformis* on gastrointestinal motility and digesta flow in sheep. **Parasitology**, London, v. 91, p. 381-396, 1985.

HEVESY, G. V.; HOBBIE, R. Determination of lead in rocks. **Journal of Analytical Chemistry,** New York, v. 88, p. 1-6, 1932.

HOLMES, P. H. Interactions between parasites and animal nutrition: the veterinary consequences. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 52, p. 113-120, 1993.

HORTON, G. M. J. Selenium and vitamin E for lambs with Trichsotrongylosis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 45, p. 891-895, 1977.

HOUDIJK, J. G. M.; ATHANASIADOU, S. Direct and indirect effects of host nutrition on ruminant gastrointestinal nematodes. In: MANNETJE L.T'. et al. (Ed.). **Matching herbivore nutrition to ecosystems biodiversity**. Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán, 2003. p. 213-236.

HUBER, K. et al. Phosphate transport in the duodenum and jejunum of goats and its adaptation by dietary phosphate and calcium. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 283, p. 296-302, 2002.

IQBAL, M. U. et al. Absorption, Availability, Metabolism and Excretion of Phosphorus in Ruminants. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, Pakistan, v. 7, p. 689-693, 2005.

JONES, W. O. et al. Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue and mucus of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination and challenge with *Trichostrongylus colubriformis.* **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 20, p. 1075-1079, 1990.

KEBREAB, E. et al. An integrated mathematical model to evaluate nutrient partition in dairy cattle between animal and its environment. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 112, p. 131-154, 2004.

KLEIBER, M. et al. Radiophosphorus (^{32}P) as tracer for measuring endogenous phosphorus in cow's faeces. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 45, p. 253-263, 1951.

LETTINI, S. E.; SUKHDEO, V. K. Anhydrobiosis increases survival of trichostrongyle nematodes. **Journal of Parasitology**, Faisalabad, Pakistan, v. 92, n. 5, p. 1002-1009, 2006.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man.** 2. ed. Hampshire: Burgess Publishing, 1980. 477 p.

LOFGREEN, G. P.; KLEIBER, M. Further studies on the availability of phosphorus in alfalfa hay. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 13, p. 258-264, 1954.

LOFGREEN, G. P.; KLEIBER, M. The availability of phosphorus in alfalfa hay. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 12, p. 366-371, 1953.

LOPES, J. B. et al. Model of the biological fl ow of phosphorus from phosphate sources in pigs using ^{32}P as a marker. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, p. 165-173, 2001.

LOUVANDINI, H. et al. Phosphorus kinetics in calves experimentally submitted to a trickle infection with *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, p. 47-51, 2009b.

LOUVANDINI, H. et al. Phosphorus kinetics in calves submitted to single infection with *Cooperia punctata.* **Journal of Agricultural Science**, London, v. 1, p. 58-65, 2009a.

LOUVANDINI, H. et al. Phosphorus kinetics in growing hair sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 76, p. 183-189, 2008.

LOUVANDINI, H. **Perda endógena de fósforo em ovinos suplementados com diferentes níveis do elemento na dieta**. 1995. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1995.

LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S. Cinética de fósforo com modelos matemáticos em ovinos adultos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, p. 1467-1472, 2007.

LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S. Endogenous loss of phosphorus in sheep fed different levels of phosphorus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, p. 145-149, 1994.

MacRAE, J. C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 52, p. 121-130, 1993.

MATSUI, T. et al. Effect of calcitonin on salivary phosphorus and calcium excretion in sheep. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 102, p. 365-368, 1984.

MAVROT, F.; HERTZBERG, H.; TORGERSON, P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, p. 557, 2015.

McDOWELL, L. R. Calcium and phosphorus. In: McDOWELL, L. R. (Ed.). **Minerals in animal and human nutrition**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 33-100.

McDOWELL, L. R. **Mineral in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992. 524 p.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, p. 229-234, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nurient requirements of dairy cattle**. Washington, DC: Agriculture Research Council, National Academy Press, 2001.

PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 2, p. 227-246, 1989.

PFEFFER, E. Phosphorus requirements in goats. In: INTERNATIONAL MEETING ON MINERAL NUTRITION AND MINERAL REQUIREMENTS IN RUMINANTS, 1989, Kyoto, Japan. **Proceedings…** Kyoto, Japan: Showado Insatsu, 1989. p. 42-46.

POPPI, D. P. et al. Calcium and phosphorus absorption in lambs exposed to *Trichostrongylus colubriformis*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 95, p. 453-464, 1985.

PORTILHO, F. P. et al. Minimum phosphorus requirement for Santa Ines lambs reared under tropical conditions. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 63, p. 170-176, 2006.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine**: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10. ed. Edinburgh: Saunders-Elsevier, 2007. 2156 p.

RAJARATNE, A. A. J.; SCOTT, D.; BUCHAN, W. Effects of change in phosphorus requeriment on phosphorus kinetic in the sheep. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 56, p. 262-264, 1994.

RAMOS, C. I. et al. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Snata Maria, v. 34, p. 1889-1895, 2004.

REINHARDT, T. A.; HORST, R. L.; GOFF, J. P. Calcium, phosphorus and magnesium homeostasis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 4, p. 331-350, 1988.

REVERON, A. E.; TOPPS, J. H.; GELMAN, A. L. Mineral metabolism and skeletal development of lambs affected by Trichostroqylus colubrajormis. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 16, p. 310-319, 1974.

SALVIANO, L. M. C.; VITTI, D. M. S. S. Effect of different calcium and phosphorus ratios on endogenous loss and true absorption in sheep. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, p. 349-55, 1996.

SANDSTRÖM, B. et al. Methods for studying mineral and trace element absorption in humans using stable isotopes. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 3, p. 71-95, 1993.

SCHNEIDER, K. M. et al. Quantitation of phosphorus excretion in sheep by compartmental analysis. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 252, p. 720-731, 1987.

SCHNEIDER, K. N. et al. A shor-term study of calcium and phosphorus absorption in sheep fed on diets high and low incalcium and phosphorus. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 36, p. 91-105, 1985.

SCHRODER, B. et al. mechanisms of intestinal phosphate transpot in small ruminants. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 74, p. 635-648, 1985.

SCOTT, D. Control of phosphorus balance in ruminants. In: DOBSON, A.; DOBSON, M. J. (Ed.). **Aspects of digestive physiology in ruminants**. Ithaca: Cornell University Press, 1988. p. 156-174.

SEVILLA, C. C. **Phosphorus deficiency in lambs**. 1985. 215 p. PhD (Thesis) - University of Queensland, Brisbane, Australia, 1985.

SILVA FILHO, J. C. et al. Exigência mínima de fósforo em novilhos da raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, p. 1861-1865, 2000.

SPIEKERS, H. et al. Influence of dry matter intake on feacal phosphorus losses in dairy cows fed rations low in phosphorus. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 69, p. 37-43, 1993.

STEAR, M. J.; MURRAY, M. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 54, p. 161-176, 1994.

STEEL, J. W.; SYMONS, L. E. A.; JONES, W. O. Effects of level of larval intake on the productivity and physiological and Metabolic responses of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis.* **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.31, p.821-838, 1980.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Intake and utilisation of food by growing lambs with parasitic damage to the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongylus colubraformis* larvae. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 86, p. 507-515, 1976.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Intake and utilisation of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 88, p. 671-677, 1977.

SYKES, A. R.; COOP, R. L.; ANGUS, K. W. Chronic infection with *Trichostrongyhts vitrinus* in sheep. Some effects on food utilization, skeletal growth and certain serum constituents. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 26, p. 372-377, 1979.

SYKES, A. R.; COOP, R. L.; ANGUS, K. W. Experimental production of osteoporosis in growing lambs by continuous dosing with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 85, p. 549-559, 1975.

SYKES, A. R.; COOP, R. L.; ANGUS, K. W. The influence of chronic *Ostertagia circumcincta* infection on the skeleton of growing sheep. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 87, p. 521-529, 1977.

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

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, p. 345-357, 1992.

TAYLOR, M. A. et al. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 742 p.

TAYLOR, M. A. et al. **Veterinary parasitology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 874 p.

TERNOUTH, J. H. Phosphorus and beef production in Northern Australia. 3. Phosphorus in cattle - a review. **Tropical Grassland**, Cali, v. 24, p. 159-169, 1990.

TERNOUTH, J. H.; SEVILLA, C. C. The effects of low levels of dietary phosphorus upon the dry matter intake and metabolism of lambs. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 41, p. 175-184, 1990.

THOMPSON JUNIOR, W. R. Phosphorus in animal nutrition. In: POTASH AND PHOSPHATE INSTITUT. **Phosphorus for agriculture: a situation analysis**. Atlanta, 1978. p. 126-158.

UNDERWOOD, E. J. **The mineral nutrition of livestock**. Wallingford, UK: CAB International, 1981.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. Wallingford, UK: CAB International, 1999. 614 p.

VALK, H. et al. Prospects for minimizing phosphorus excretion in ruminant by dietary manipulation. **Journal of Environmental Quality**, Madiosn, v. 29, p. 28-36, 2000.

VAN DEN BERG, G. J. et al. Absorption and retention studies of trace elements and minerals in rats using radiotracers and whole-body counting. **Laboratory Animals**, London, v. 29, p. 66-77, 1995.

VAN HOUTERT, M. F. J.; SYKES, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, p. 1151-1167, 1996.

VICENTE, J. J. et al. Nematóides do Brasil. Parte V: Nematóides de mamíferos. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 14, p. 1-452, 1997.

VITTI, D. M. S. S. **Avaliação da disponibilidade biológica do fósforo dos fosfatos bicálcico, Patos de Minas, Tapira e fi nos de Tapira para ovinos pela técnica da diluição isotópica**. 1989. 87 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1989.

VITTI, D. M. S. S.; KEBREAB, E. **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals**. London, UK: CAB International, 2010.

VITTI, D. M. S. S. et al. Avaliação da disponibilidade biológica do fósforo do fosfato bicálcico e de fosfatos de rocha para ovinos com uso do radiofósforo (^{32}P) como traçador. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 1113-1118, 1991.

VITTI, D. M. S. S. et al. A kinetic model of phosphorus metabolism in growing goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, p. 2706-2716, 2000.

WALKER, D. M.; AL-ALI, S. J. The endogenous phosphorus excretion of preruminant lambs. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 38, p. 1061-1069, 1987.

WILSON, W. D.; FIELD, A. C. Absorption and secretion of calcium and phosphorus in the alimentary tract of lambs infected with daily doses of *Trichostrongylus colubriformis* or *Ostertagia circuncincta* larvae. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 93, p. 61-71, 1983.

WOOD, I. B. et al. Word Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Second Edition of Guidelines for Evaluanting the Efficacy of Anthelmintics in Ruminants (Bovine, Ovine, Caprine). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 58, p. 181-213, 1995.

YOUNG, V. R. et al. The influence of dietary phosphorus intake on the rate of bone metabolism in sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 20, p. 727-732, 1966.

3. Variáveis hemato-bioquímicas, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de cordeiros infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*

Resumo

Esse estudo foi conduzido objetivando-se avaliar o efeito da infecção induzida por *Trichostrongylus colubriformis* sobre variáveis hemato-bioquímicas, ruminais, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de cordeiros Santa Inês. Foram utilizados 18 cordeiros Santa Inês (16,9 ± 1,43 kg) machos de aproximadamente três meses de idade distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos experimentais: grupo infectado (I, n=9) e grupo controle (C, n=9) sem infecção. Os cordeiros do grupo I receberam 5000 L3, três vezes por semana, durante três semanas, totalizando 45000 L3 de *T. colubriformis*. O controle do consumo da dieta foi diário tendo os cordeiros do grupo I como referência para seus respectivos pares do grupo C (pair-fed). Pesagem, escore de condição corporal e amostras de sangue e fezes foram obtidos quinzenalmente, durante 75 dias. Avaliou-se o hemograma e variáveis bioquímicas (proteínas totais, albumina, glubulinas, relação albumina/globulina e beta-hidroxibutírico) e número de ovos por grama de fezes (OPG). Para determinar a digestibilidade aparente dos nutrientes e balanço de nitrogênio, todos os cordeiros (grupos C e I) foram alocados em gaiolas para ensaio de metabolismo, durante 10 dias. No último dia do ensaio de digestibilidade, foi coletado líquido ruminal dos animais para determinação do pH e da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH3) e contagem de protozoários. Os cordeiros apresentaram infecção moderada (OPG = 620,3 ± 594,98), com maior eliminação de ovos aos 30 dias pós-infecção inicial. Em cordeiros infectados houve redução de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média e proteína total com aumento no número de plaquetas e eosinófilos circulantes em relação aos do controle ($P < 0,1$). Os cordeiros infectados não apresentaram quadro de inapetência, porém, foi observada menor digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica da dieta. Conclui-se que a infecção por *T. colubriformis* comprometeu parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como afetou negativamente a digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânca.

Palavras-chave: endoparasitas**,** consumo**,** desempenho**,** ruminantes**,** hematologia

3.1. Introdução

Os parasitas gastrintestinais constituem uma das principais causas de perdas econômicas em sistemas de produção de pequenos ruminantes (MOLENTO, 2009). Os diferentes graus de infecção a que os animais estão expostos podem causar baixa produtividade, elevada taxa de mortalidade e atraso no desenvolvimento corporal dos animais.

Trichostrongylus colubriformis é um nematoide da família Trichostrongylidae de alta ocorrência em ruminantes em diversas regiões do mundo (O'CONNOR et al., 2006). *Trichostrongylus colubriformis*, em infecções graves, pode causar enterites severas com ampla atrofia das microvilosidades da mucosa intestinal, formação de túneis e erosão do epitélio da mucosa duodenal (TAYLOR et al., 2010; CARDIA et al., 2011), hiperplasia e hipertrofia das criptas (CARDIA et al., 2011), infiltração de leucócitos e alta exsudação de proteínas séricas para o lúmen intestinal (TAYLOR et al., 2010). Em consequência dessa infecção, a capacidade digestiva e absortiva dos nutrientes, incluindo os minerais, torna-se comprometida (CANTACESSI et al., 2010) acarretando redução do crescimento do esqueleto, densidade e mineralização óssea (FOX et al., 1977) e em baixo desempenho animal.

As infecções por helmintos nos ruminantes provocam alterações hematológicas e bioquímicas importantes, tais como redução nas concentrações de hemoglobina (SOTOMAIOR; THOMAZ-SOCCOL, 1998), e eritrócitos (BERNARDI; ALVES; MARIN, 2005; CARDIA et al., 2011), células determinantes na oxigenação dos tecidos. Também, provocam aumento de imunoglobulinas, mastócitos, leucócitos tanto a nível sanguíneo como tissular (HARRISON et al., 1999; CARDIA et al., 2011). Também pode ser verificado alta exsudação de proteínas totais (KYRIAZAKIS et al., 1996; URQUHART et al., 1998; BRICARELLO et al., 2002).

O impacto negativo da infecção por *T. colubriformis* no desempenho produtivo de cordeiros pode comprometer a produção comercial de ovinos, principalmente quando ocorrem infecções subclínicas (inaparentes), uma vez que esta não é percebida pelo produtor. Barker (1973; 1975) relatou redução na eficiência de digestão e absorção dos nutrientes, comprometendo a produtividade dos ovinos.

Em decorrência de seu caráter subclínico e de poucas pesquisas conduzidas com animais submetidos à infecção seriada com *T. colubriformis*, esse estudo foi conduzido objetivando-se avaliar variáveis hemato-bioquímicas, ruminais, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de cordeiros infectados experimentalmente com *T. colubriformis*.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Local do estudo

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), em Piracicaba, São Paulo, Brasil. Sua condução ocorreu após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CENA (Número de Protocolo 004/2015).

3.2.2. Cultivo das larvas de Trichostrongylus colubriformis

Dois ovinos machos da raça Santa Inês, de aproximadamente 10 meses de idade, foram previamente infectados com dose única de 12 mil larvas infectantes (L3) de *T. colubriformis*. Essas larvas foram provenientes do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP - Botucatu). Após 21 dias da infecção esses dois ovinos foram monitorados, a cada dois dias, pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (Gordon e Whitlock, 1939) modificada conforme Ueno e Gonçalves (1998). Após a primeira identificação de ovos, foi iniciada a coleta diária total de fezes e, consequentemente, o cultivo para obtenção das L3 por meio da coprocultura (UENO; GONÇALVES, 1998).

O cultivo das larvas foi realizado por sete dias, à 25 ºC e umidade relativa entre 85 a 90 % em câmara de germinação (TA-401, Tecnal). Para recuperação das larvas, os frascos foram preenchidos com água a uma temperatura de 37 ºC e invertidos sobre placas de Petri e completando-as com água (37 ºC), para que ocorra a migração das larvas para as placas. A água contendo as larvas foi coletada com o auxílio de pipeta do tipo Pasteur (foram realizadas três recuperações em cada placa de Petri) e, acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas sob refrigeração a 5 ºC, até contagem e inoculação nos cordeiros. O restante da água contida nos frascos de coprocultura foi filtrado utilizando um funil de Büchner acoplado a um kitassato e lavado através do método de Baermann modificado. Nesse método, o papel filtro, contendo o material filtrado, é disposto sobre uma peneira de 212 µm acoplada a um funil de vidro preenchido anteriormente com água a 39 ºC, devendo obrigatoriamente, o papel filtro estar em contato completo com a água. Nesse processo, as larvas migram, através dos poros do filtro, por hidrotropismo e termotropismo e se sedimentam no fundo do funil,

onde são coletadas em frascos de vidro e armazenadas sob refrigeração (UENO; GONÇALVES, 1998).

Para contagem das larvas utilizou-se lâmina de vidro, contendo 10 campos delimitados. Em cada campo foi pipetada uma alíquota de 10 µL da solução de larvas recuperadas. A quantidade média de larvas vivas/10 µL foi multiplicada pelo volume total, obtendo-se a quantidade aproximada de larvas infectantes.

3.2.3. Grupos experimentais, período experimental, dieta, regime alimentar e inoculação dos animais

Foram utilizados 18 cordeiros Santa Inês, machos, castrados, com peso médio inicial de 16,9 ± 1,43 kg, criados confinados em baias coletivas do nascimento ao desmame (60 dias de idade), a fim de evitar infecção prévia com endoparasitas. Após esse período, os animais foram alocados em baias individuais (1,0 x 1,5 m) providas de comedouro, bebedouro e piso emborrachado. Antes de iniciar o período experimental, os cordeiros foram everminados, pesados para formação dos pares com mesma a oferta da quantidade de alimento (pair-fed), de acordo com o peso vivo e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo infectado (I, n=9) e grupo controle (C, n=9). Os cordeiros do grupo I receberam, aproximadamente, 5000 larvas infectantes (L3), três vezes por semana, durante três semanas, totalizando 45000 L3 de *T. colubriformis*. Por outro lado, os cordeiros do grupo C permaneceram sem infecção.

O experimento teve duração de 75 dias, nesse período os cordeiros receberam água e dieta (Infectados) *ad libitum* composta por feno de Tifton (*Cynodon* ssp.), triturado com partículas de 3 cm, concentrado (30 % soja e 70 % milho) e suplemento mineral comercial conforme descrito na Tabela 2. A dieta foi formulada com uma relação volumoso: concentrado de 70:30, sendo ajustada a cada 15 dias. A quantidade inicial média fornecida foi de 390 ± 92,49 e 171 ± 40,46 e final de 690 ± 110,58 e 212 ± 46,64 g para volumoso e concentrado, respectivamente.

Tabela 2 - Composição bromatológica dos ingredientes da dieta experimental com base na matéria seca

Ingredientes	MS %	PB %	FDN %	FDA %	Ca %	P %
Concentrado	89,89	21,86	49,05	8,21	0,13	0,52
Feno de Tifton	90,07	6,20	79,86	42,85	0,27	0,17
[1]Mistura mineral	96,50	-	-	-	13,20	7,90

*MS-Matéria seca, PB- Proteína bruta, FDN- Fibra em detergente neutro, FDA- Fibra em detergente ácido, Ca- Cálcio, P- Fósforo, [1]Mistura mineral: Magnésio-10 g, Enxofre-35 g, Sódio-120 g, Cobre-0,756 g, Manganês-2,180 g, Zinco-2,8 g, Iodo-0,056 g, Cobalto-0,044 g, Selênio-0,14 g, Flúor-0,85 g. q.s.p. 1000 g.

A determinação da composição química da dieta foi realizada no laboratório de Nutrição Animal – CENA/USP. As amostras do feno e concentrado foram analisadas para determinação do teor de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) de acordo AOAC (2011). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo metodologia proposta por Van Soest et al. (1991) adaptada por Mertens (2002).

3.2.4. Peso corporal, escore de condição corporal, contagem de ovos nas fezes e carga parasitária

Os cordeiros foram pesados e amostras de sangue e fezes colhidas nos dias 0, 15, 30, 45, 60 e 75. O escore de condição corporal foi avaliado no momento da pesagem quinzenal, sendo realizada de acordo com o método descrito por Thompson e Meyer (2006). As mensurações foram feitas em uma escala de 1 a 5 (1 - muito magro e 5 - obeso) com intervalo de 0,5 ponto. Os dados de peso vivo dos cordeiros foram usados para determinar o ganho médio diário em peso (GMD, g/animal/dia) e o ganho total em peso (GTP, kg/animal). A contagem de ovos por grama de fezes foi determinada a partir da coleta de fezes diretamente da ampola retal.

A determinação da carga parasitária foi feita através da contagem total de vermes, sendo que, durante a necropsia dos animais, o intestino delgado foi removido e todo o conteúdo foi lavado com água corrente até atingir o volume final de 2 litros, utilizando-se proveta graduada. Em seguida, amostra, em duplicata, de 10 % do material foi preservada em formalina (10%) para contagem total de vermes.

3.2.5. Avaliação do consumo

Durante todo o período experimental, antes do fornecimento da dieta, as sobras do dia anterior foram coletadas e pesadas, para determinar a quantidade a ser fornecida aos respectivos pares do grupo controle (pair-fed). O uso do pair-fed garantiu que os animais controle recebessem, no dia seguinte, a mesma quantidade diária de alimento, consumida pelos infectados, no dia anterior, a fim de melhor avaliar o efeito da *T. colubriformis* sobre os parâmetros avaliados. De forma semelhante, a coleta e pesagem das sobras foram usadas para determinar o consumo diário (CMS, g/animal/dia) o consumo de proteína bruta (CPB, g/animal/dia) e o consumo total de matéria seca (CTMS, % PV). A conversão alimentar (CA) foi calculada através da relação entre o consumo total (kg MS/animal) e o ganho total em peso dos animais no período.

3.2.6. Ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes

Após 20 dias da última inoculação de L3, os animaisde ambos os grupos (I e C) foram distribuídos aleatoriamente, durante 10 dias, em gaiolas de estudo de metabolismo para coletas diárias de amostras da dieta ofertada e coletas totais de sobras, fezes e urina para determinação da digestibilidade aparente (DA) dos nutrientes. As coletas da dieta, sobras e fezes foram pesadas, sendo uma amostra representativa, 10 % do total de cada material e armazenadas sob refrigeração (-20 ºC). Da mesma forma, amostras de urina foram coletadas em baldes contendo 100 mL de ácido sulfúrico a 10 %, com volume total determinado em proveta graduada e 10 % desse total amostrado foi congelado para posterior análise. As amostras do oferecido, sobras e fezes foram descongeladas, secas em estufa de circulação forçada a 60 ºC, moídas a 1 mm em moinho tipo Willey e encaminhadas para análise bromatológica conforme descrito no item 2.3.

A digestibilidade aparente de cada unidade dietética foi calculada de acordo com a seguinte equação:

DA de X (%) = [(X consumido – X excretado) / X consumido] x 100

DA = digestibilidade aparente

X = unidade dietética analisada

3.2.7. Parâmetros de fermentação ruminal

No último dia do ensaio de digestibilidade, com o uso uma sonda esofágica, foram coletadas amostras de líquido ruminal de ambos os grupos (C e I), obedecendo um intervalo de três a quatro horas após o fornecimento da dieta aos cordeiros. As amostras de líquido ruminal foram utilizadas para determinação da concentração de N-NH3 e contagem de protozoários seguindo metodologias descritas por Preston (1995) e Dehority et al. (1983), respectivamente, e para a determinação do pH. Para as análises de N-NH3, as amostras foram armazenadas em refrigerador, em temperatura de -20 ºC e, para a contagem de protozoários, 2 mL das amostras de líquido ruminal foram diluídos em 4 mL de solução a base de verde de metila e formol salino (M.F.S.) e mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. O pH foi mensurado usando um pHmetro pré-calibrado.

3.2.8. Balanço de nitrogênio

A determinação do balanço de nitrogênio (N consumido menos o N excretado), sob condições controladas, permite a quantificação do metabolismo proteico e demostra se o organismo está ganhando ou perdendo proteína (ANDRIGUETTO, 2002). Para o cálculo do balanço de nitrogênio (N), o teor de N total das amostras de urina foi determinado pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 2011), utilizando-se destilação a vapor com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 12M, coleta em solução de ácido bórico (H3BO3) e titulação com solução de H2SO4 0,025M.

O balanço de N foi calculado pela diferença entre o total consumido e o total excretado:

N retido = (N consumido) – (N excretado)

Onde: N retido = quantidades médias diárias de N, proveniente da dieta e absorvido pelo animal; N consumido = N ingerido, proveniente da dieta oferecida; N excretado = N excretados nas fezes e na urina.

3.2.9. Variáveis hematológicas e bioquímicas

As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 15, 30, 45, 60 e 75 por venopunção da jugular utilizando agulhas acoplados a tubos vacutainer contendo 0,05 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por 5 mL de sangue. A partir das amostras sanguíneas

foi determinado o número de eritrócitos (10^6µL), hematócrito (%), hemoglobina (g/dL), volume corpuscular média (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração de hemoglobina corpuscular médio (g/dL), leucócitos (10^3µL) e plaquetas (10^3µL). Todas as variáveis sanguíneas foram realizadas no CENA utilizando-se analisador hematológico automatizado veterinário Sysmex pocH-100iV Diff.

Amostra de sangue "*in natura*" foram utilizadas para formação do esfregaço sanguíneos, de cada animal e em cada período de coleta, destinados à contagem diferencial de leucócitos. Esses esfregaços, após secarem, 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 em aumento de 100x, de acordo com suas características morfológicas e tintoriais, em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

Amostras de sangue (5 mL) foram coletadas em tubos vacutainer sem anti-coagulante, posteriormente foram centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos para obtenção do soro sanguíneo. O sobrenadante (soro) foi coletado e armazenado em tubos de polipropileno a menos 20 ºC para determinação de proteínas totais (PT) e albumina utilizando Kits comerciais Labtests® com leitura em Espectrofotômetro de Microplacas Epoch (BioTek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, EUA). A partir da determinação das PT e albumina, foram calculadas as globulinas e a relação albumina/globulina em ambos os tratamentos. O beta-hidroxibutírico (BHB) foi determinado imediatamente após a coleta de amostras de sangue, utilizando o sensor portátil Optium Xceed (Abbott Diabetes Care Ltda., Witney, UK), seguindo metodologia descrita por Raimondo et al. (2011).

3.2.10. Análises estatísticas dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa SAS v. 9.3® (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). O consumo, o desempenho e as variáveis hematológicas e bioquímicas foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED, com medidas repetidas no tempo. Para análise de digestibilidade, balanço de N e parâmetros de fermentação ruminal foi utilizado o procedimento GLM. Para as variáveis analisadas pelo MIXED, optou-se pela matrix de covariância unestruturada, sendo a que melhor se ajustou aos dados obtidos de acordo o menor Critério de Informação de Akaike (AIC) e Critério Bayesiano de Schwarz (BIC). As médias foram comparadas pelo teste t adotando-se 10 % de probabilidade.

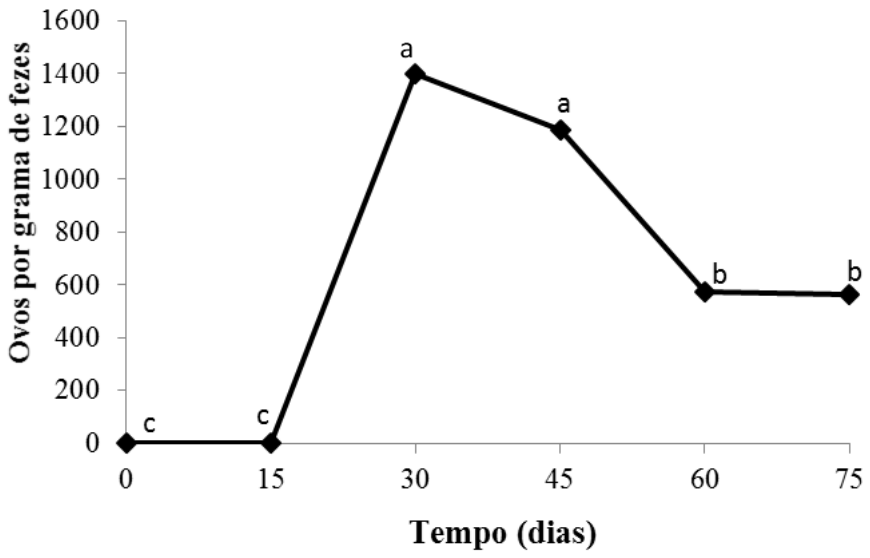
Nas variáveis com medidas repetidas no tempo, foram testados os efeitos de tratamento, tempo e a interação tratamento x tempo. O GMD foi calculado por regressão linear do PC em função do dia experimental nas datas de pesagem (0, 15, 30, 45, 60 e 75) em cada animal. O modelo da equação de regressão correspondeu a $Yi = a_0 + b_1X$, onde Yi = peso corporal (kg) no dia experimental i; a_0 = intercepto da regressão; b_1 = ganho médio diário (kg/dia); X = dia experimental. Para análise estatística, os dados de OPG foram transformados por log (x + 10), sendo os resultados apresentados com os valores originais.

3.3. Resultados

3.3.1. Ovos por grama de fezes, carga parasitária e sinais clínicos observados

Durante o período experimental os animais do grupo infectado apresentaram média de 620,3 ± 594,98 de OPG. O período de pré-patência foi entre 23 a 25 dias, com contagem máxima individual de 2400 OPG. Nos animais do tratamento controle não foram verificados ovos durante todo o período avaliado. As maiores contagens de OPG foram observadas nos dias 30 e 45 pós-infecção inicial, ocorrendo uma estabilidade a partir do 60º dia, como observado na Figura 2.

Figura 2 - Média de ovos por grama de fezes nos cordeiros infectados com *Trichostrongylus colubriformis* durante o período experimental



A menor quantidade de vermes recuperados foi de 4280 correspondendo a 9,5 % do total de larvas infectantes inoculadas. A média de vermes recuperados foi de 6642,8 correspondendo a 14,8 % do total inoculado e a maior quantidade de vermes recuperados foi de 12310, que totalizam 27,3 % de larvas infectantes inoculadas.

Dois animais infectados apresentaram fezes com consistência semi-pastosa de forma aglomerada a partir 45º dia pós-infecção inicial, como também foi verificada queda de pelo em um animal, com intensificação dessa sintomatologia até o final do experimento (75 dias pós infecção inicial).

3.3.2. Variáveis hematológicas e bioquímicas

Os cordeiros I apresentaram uma redução de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e VCM quando comparados aos animais C ($P < 0,1$) (Tabela 3). Por outro lado, a CHCM e o número de plaquetas foram maiores nos animais I ($P < 0,1$).

Tabela 3 - Variáveis hematológicas de cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* durante 75 dias

Eritrograma	**Valores de Referência[1]**	**Tratamentos**			**Efeitos**	
		Controle (n=9)	**Infectado (n=9)**	**Trat**	**Tempo**	**Trat*T**
Eritrócitos (10^6/µL)	8-16	13,1 ± 0,25	12,1 ± 0,26	*	ns	ns
Hematócrito (%)	24-50	46,4 ± 0,96	41,9 ± 1,01	*	ns	ns
Hemoglobina (g/dL)	8-16	12,1 ± 0,19	11,3 ± 0,20	*	ns	ns
VCM (fL)	23-48	35,4 ± 0,19	34,4 ± 0,20	*	ns	ns
HCM (pg)	9-13	9,2 ± 0,07	9,3 ± 0,07	ns	ns	ns
CHCM (g/dL)	29-35	26,2 ± 0,23	27,1 ± 0,24	*	ns	ns
Plaquetas (10^3/µL)	200-700	593,4 ± 23,09	680,5 ± 24,17	*	*	ns
Leucócitos (10^3/µL**)**	4-12	10,1 ± 0,35	10,1 ± 0,36	ns	*	ns
Neutrófilos /µL	600-4000	4938,9 ± 1,45	4777,3 ± 1,45	ns	ns	ns
Linfócitos /µL	2500-7500	4514,7 ± 1,6	4151,1 ± 1,6	ns	*	ns
Eosinófilos /µL	0-2400	191,9 ± 0,55	868,6 ± 0,55	*	*	ns
Monócitos /µL	250-840	383,8 ± 0,48	363,6 ± 0,48	ns	*	ns
Basófilos /µL	---	30,3 ± 0,09	40,4 ± 0,09	ns	*	ns

[1]Kramer (2006), VCM- Volume corpuscular médio; HCM- Hemoglobina corpuscular média; CHCM- Concentração de hemoglobina corpuscular média; Trat- efeito de tratamento; Trat*T- Interação entre tratamento e tempo; *Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade; ns – não significativo

Não houve influência da infecção sobre o número de leucócitos circulantes em relação aos cordeiros do grupo C6 ($P > 0,1$). No entanto, o exame diferencial de leucócitos mostrou um aumento significativo do número de eosinófilos em resposta à infecção por *T. colubriformis*, bem como influência do tempo sobre a contagem eosinofílica ($P < 0,1$).

A infecção com *T. colubriformis* promoveu redução nas proteínas totais ($P < 0,1$) (Tabela 4). Concentrações sanguíneas de albumina, globulina, relação A/G e beta-hidroxibutirato não foram afetadas pela infeção com *T. colubriformis* ($P > 0,1$).

Tabela 4 - Variáveis bioquímicas de cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*

Variáveis	**Valores de Referência[1]**	**Tratamentos**		**Efeitos**		
		Controle (n=9)	**Infectado (n=9)**	**Trat**	**Tempo**	**Trat* Tempo**
Proteínas totais (g/dL)	6 – 7,9	6,8 ± 0,19	5,8 ± 0,18	*	ns	ns
Albumina (g/dL)	2,4 - 3	2,7 ± 0,09	2,5 ± 0,09	ns	ns	ns
Globulinas (g/dL)	3,1-5,1	4,0 ± 0,27	3,4 ± 0,19	ns	ns	ns
Relação A/G	0,4 – 0,7	0,6 ± 0,03	0,7 ± 0,03	ns	ns	ns
BHB (mmol/L)	<0,6	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,02	ns	ns	ns

*Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade; ns – não significativo; Relação A/G – relação albumina/globulina; BHB - beta-hidroxibutírico; Trat - efeito de tratamento; Tempo - efeito de tempo; Trat*Tempo - Interação entre tratamento e tempo; [1]Kaneko et al. (2008).

3.3.3. Desempenho dos animais

Os animais do tratamento infectado apresentaram maior CMS (g/animal/dia) em comparação ao tratamento controle ($P < 0,1$). Houve efeito do tempo sobre o CMS, no entanto, não houve interação significativa entre tratamento x tempo (Tabela 5).

Tabela 5 - Consumo de matéria seca e desempenho de cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*

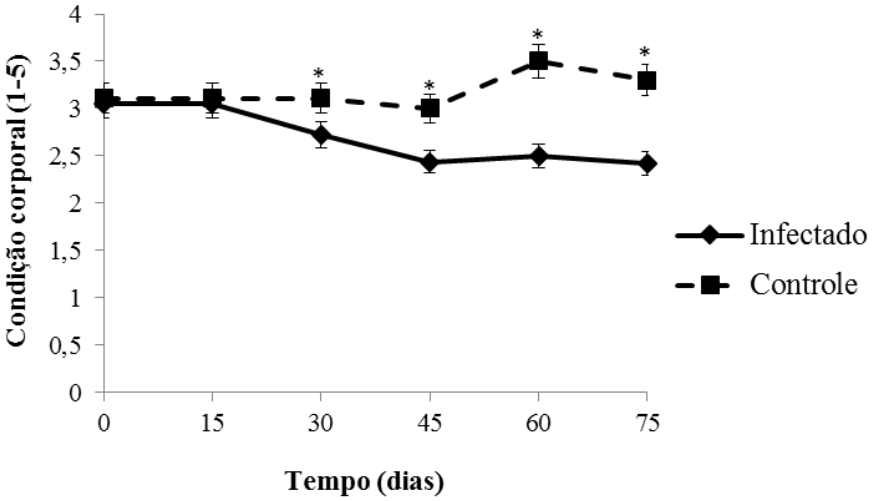
Variáveis	Tratamentos		Efeitos		
	Controle (n=9)	Infectado (n=9)	Trat	Tempo	Trat* Tempo
Consumo de MS (g/animal/dia)	588,6 ± 5,23	620,7 ± 4,61	*	*	ns
Consumo de MS ($P^{0.75}$/animal/dia)	65,6 ± 0,30	71,4 ± 0,34	*	*	ns
Consumo de PB (g/animal/dia)	62,9 ± 0,51	66,2 ± 0,51	*	*	ns
Consumo total de MS (% PV)	3,1 ± 0,01	3,4 ± 0,01	*	*	ns
Peso vivo inicial (kg)	16,9 ± 1,42	16,8 ± 1,42	ns	---	---
Peso vivo final (kg)	21,2 ± 1.50	21,1 ± 1.50	ns	---	---
Ganho médio diário (g/animal/dia)	60,8 ± 4,32	50,3 ± 4,32	ns	---	---
Ganho total em peso (kg/animal)	3,8 ± 0,30	3,3 ± 0,33	ns	---	---
Conveesão alimentar	11,4 ± 1,23	14,7 ± 1,33	ns	---	---

*Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade; ns – não significativo; MS - matéria seca; PB - proteína bruta; CA - Conversão alimentar calculada pela relação entre o consumo total (kg MS/animal) e o GTP; Trat - efeito de tratamento; Tempo - efeito de tempo; Trat*Tempo - Interação entre tratamento e tempo.

Não houve diferenças no ganho médio diário, ganho em peso total e na conversão alimentar entre os cordeiros I e C ($P > 0,1$).

Não houve influência da infeção parasitária sobre o peso final dos animais ($P > 0,1$) (Tabela 5). Entretanto, animais I apresentaram diminuição do escore de condição corporal (Figura 3) a partir do 30º dia, diferindo significativamente do animais C nos tempos 45, 60 e 75 dias pós-infecção inicial.

Figura 3 - Escore de condição corporal de animais sadios e infectados durante o período experimental



Cordeiros C apresentaram maior digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica consumida ($P < 0,1$). No entanto, os grupos I e C apresentaram similaridade na digestibilidade da PB, FDN e FDA da dieta consumida (Tabela 6).

Tabela 6 - Digestibilidade aparente da dieta (%) em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*

Digestibilidade (%)	**Tratamentos**		**Prob**
	Controle (n=9)	**Infectado (n=9)**	
Matéria seca	61,3 ± 0,02	55,8 ± 0,02	0,086
Matéria orgânica	62,8 ± 0,02	56,7 ± 0,02	0,088
Proteína bruta	64,1 ± 0,02	60,8± 0,02	ns
Fibra em detergente neutro	59,3 ± 0,03	52,4 ± 0,03	ns
Fibra em detergente ácido	48,1 ± 0,04	41,4 ± 0,04	ns

*Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade; ns – não significativo; Prob – probabilidade.

O consumo de N, sua excreção via fezes e urina não diferiram entre cordeiros C e I, consequentemente, a retenção de N não foi afetada pela verminose ($P > 0,1$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Balanço de nitrogênio (N) em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*

Balanço (g/dia)	**Tratamentos**		**Prob**
	Controle (n=9)	**Infectado (n=9)**	
N consumido	10,7 ± 0,83	10,9 ± 0,83	ns
N excretado nas fezes	3,8 ± 0,33	4,4 ± 0,33	ns
N excretado na urina	2,38 ± 0,28	3,06 ± 0,28	ns
N retido	4,54 ± 0,71	3,47 ± 0,71	ns

*Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade; ns - não significativo; Prob – probabilidade.

3.3.4. *Parâmetros de fermentação ruminal*

Os valores de pH ruminal e N amoniacal, assim como a contagem de protozoários nesse compartimento não diferiram entre animais C e I ($P > 0,1$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito da infecção induzida com *Trichostrongylus colubriformis* nos parâmetros ruminais e contagens de protozoários em cordeiros

Variáveis	**Tratamentos**		**Prob**
	Controle (n=9)	**Infectado (n=9)**	
pH	6,2 ± 0,04	6,3 ± 0,04	ns
N amoniacal (mg/dL)	19,3 ± 1,54	17,3 ± 1,44	ns
Protozoários ($x10^5$/mL)	1,2 ± 3,14	1,2 ± 3,36	ns

*Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade; ns – não significativo**;** Prob – probabilidade.

3.4. Discussão

Os resultados parasitológicos (OPG e número de vermes) permitem classificar a infecção como moderada (média de OPG = 620,3 ± 594,98), pois, segundo Ueno e Gonçalves (1998), infecção leve está entre 100 a 500, moderada de 500 a 2000 e pesada acima de 2000 ovos por grama de fezes para *T. colubriformis.* No entanto, o estabelecimento larval fornece maior realidade quanto ao grau de infecção (UENO E GONÇALVES, 1998). No presente experimento, os cordeiros apresentaram um estabelecimento larval médio de 14,8 % do total

de larvas inoculadas, com variação de 9,5 a 27,3 %. Estes valores corroboram com Cardia et al. (2011) que citam que a resposta imune em cordeiros infectados, quando adquirida em consequência de um desafio contínuo, causa grande redução da carga larval.

Os cordeiros apresentaram carga parasitária, variando entre animais, de 350 a 2400 OPG e maior eliminação de ovos aos 30 dias pós-infecção inicial com decréscimo aos 60 dias e estável até o fim do período experimental. Essa redução na contagem de OPG pode indicar a atuação do sistema imune contra o desafio seriado da infecção induzida (CARDIA et al., 2011).

As fezes aglomeradas de consistência semi-pastosa (dois animais) e intensa queda de pelo (um animal) foram as principais alterações clínico-patológicas, que são consequência, provavelmente, dos efeitos promovidos pela carga parasitária estabelecida (CARDIA et al., 2011). Essa consistência fecal pode ser devido à maior exsudação de proteínas séricas para o lúmen intestinal (TAYLOR et al., 2010) que segue o fluxo intestinal sendo eliminado aderido às fezes. Causas possíveis para a queda de pelo estão o estresse (BOWMAN et al., 2003) como também a baixa absorção de nutrientes (CANTACESSI et al., 2010), ambos promovidos pela tricostrongilose.

No presente estudo o efeito da verminose reduziu os valores de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e VCM dos cordeiros I comparado aos C ($P < 0,05$), porém, permaneceram dentro da normalidade (KRAMER, 2006). Essas alterações promovem perdas e/ou redução no transporte de oxigênio e nutrientes para os tecidos (JAIN, 1986). O maior número de plaquetas sanguíneas nos cordeiros infectados pode estar indicando uma resposta frente à hemorragia ocorrida em consequência da formação de túneis e erosão do epitélio da mucosa duodenal, devido a implantação e estabelecimento larval (BOWMAN et al., 2003). No caso do CHCM superior nos cordeiros I, pode ter ocorrido uma resposta, tentando aumentar a concentração de hemoglobina por hemácia, devido à menor quantidade de hemoglobina nos cordeiros I e/ou indicando uma possível deficiência nutricional em decorrência dos efeitos da tricostrongilose. Animais I apresentaram aumento do número de eosinófilos circulantes em comparação aos do tratamento C. Essa resposta eosinofílica é característica em animais infectados por verminoses e produz resposta imediata contra infecções por *T. colubriformis* (CARDIA et al., 2011). As maiores ($P < 0,1$) contagens de eosinófilos foram verificadas aos 60 e 75 dias pós infecção inicial, quando a contagem de ovos por grama de fezes diminui de 1188 aos 45 dias para 572 aos 60 dias e 561 aos 75 dias pós infecção inicial, podendo indicar ativa resposta inume contra a infecção parasitária (DORCHIES et al., 1997).

Em ambos os grupos, as variáveis albumina, globulina e relação A/G estão dentro dos valores de referência (Tabela 4, KANEKO et al., 2008). Já as proteínas totais em cordeiros I estão significativamente inferiores comparado aos C e abaixo da referência para a espécie. A redução proteínas totais foi associada a fatores como falhas hepáticas, transtornos renais e intestinais, hemorragias ou deficiência na nutrição (KANEKO et al., 1997). A redução de proteínas plasmáticas totais nos cordeiros I pode estar ligada a ocorrência de alta exsudação de proteínas séricas para o lúmen intestinal imposta pelo *T. colubriformis* (TAYLOR et al., 2010). Com relação aos metabólitos energéticos, não houve alteração nos níveis de BHB entre tratamentos.

Os cordeiros I não apresentaram sinais de anorexia e/ou redução de consumo de MS. Tal fato pode ser justificado pela infecção moderada (UENO; GONÇALVES, 1998) que apresentaram. Ao compararmos o consumo entre tratamentos, os cordeiros I consumiram mais que os cordeiros C. No entanto, acredita-se que tal fato tenha ocorrido devido à adoção da metodologia do tipo pair-fed, que garantiu que os animais C recebessem, no dia seguinte, a mesma quantidade diária de alimento que foi consumida pelos I no dia anterior. Uma característica muito importante em relação ao hábito alimentar dos ovinos é a alta seletividade durante o consumo de alimentos. Ambos os tratamentos, consumiram em sua totalidade o concentrado ofertado, estando essa diferença diária de consumo relacionada ao feno. Cordeiros I tinham acesso *Ad libtum* ao feno, sendo que as porções de baixa qualidade nutricional como talos e colmos foram rejeitadas mesmo tendo sido triturado para o fornecimento. Tal situação também foi observada nos cordeiros C. No entanto, como a quantidade do volumoso ofertado neste caso foi restrita à quantidade consumida pelos cordeiros I, o consumo do grupo C foi menor por este motivo.

Os parâmetros ruminais de ambos os tratamentos foram semelhantes, onde o potencial de hidrogênio (pH) no fluido ruminal, tratando-se de uma dieta com relação volumoso concentrado de 70:30, esteve dentro da variação característica de uma dieta mais fibrosa (6 a 7,0). Assim, a contagem de protozoários que em muitos casos é diretamente influenciada pelo pH do meio não variou, bem como os valores de N amoniacal, que foram considerados adequados para as atividades fermentativas, pois, foram superiores a 10 mg/dL, reportado por Van Soest (1994) como concentração mínima para o crescimento microbiano.

O comprometimento da digestibilidade e absorção de nutrientes pelos animais é influenciado pelo nível de desafio larval e pelo número de espécies de vermes estabelecidos durante a infecção (VAN HOUTERT; SYKES, 1996). Isso ainda é influenciado pelas características do hospedeiro, como a idade, raça, estado nutricional e imunitário. Geralmente,

em animais parasitados com nematoides gastrintestinais, ocorre redução na disponibilidade de nutrientes, devido a redução do consumo voluntário e/ou redução na capacidade digestiva e eficiência de absorção dos nutrientes (DYNES et al., 1998), sendo dependente da espécie de nematoide.

No caso do *T. colubriformis* essa redução no desempenho está associada a redução da capacidade digestiva e absortiva dos nutrientes (HOUDIJK; ATHANASIADOU, 2003), como visto no presente estudo, houve menor capacidade digestiva da MS e MO nos cordeiros I em relação aos C ($P < 0,1$). Esse fato decorre, principalmente, pelo estabelecimento larval, que promove danos à mucosa absortiva, tais como atrofia generalizada das vilosidades e erosão no epitélio duodenal, comprometendo a capacidade de assimilação de nutrientes (COOP et al., 1982; COOP; KYRIAZAKIS, 1999; CARDIA et al., 2011), sendo necessário que animais I consumam 3,3 Kg a mais de alimento para equiparação do ganho em peso comparado aos animais C (Tabela 5).

Quando se avaliou a digestibilidade das frações da dieta (PB, FDN e FDA), não houve diferença entre os tratamentos, porém, dois pontos devem ser levados em consideração: apenas dois animais (22 % do grupo I) apresentaram alta carga parasitária, ou seja, apresentaram alta susceptibilidade, existindo uma grande variação individual entre os cordeiros (OPG de 350 a 2400), fato que possivelmente pode ter contribuído para a não diferença, sendo uma característica semelhante à que ocorre a nível de campo. Outro ponto, com enfoque na PB, seria a digestão e absorção compensatória, indicando que animais I podem alterar o seu sitio de absorção, buscando uma melhor assimilação de nutrientes (BOWN et al., 1991). Nossos resultados corroboram com Symons e Jones (1970) e Poppi et al. (1986) que, ao avaliarem a digestibilidade verdadeira dos nutrientes, mostraram que a infecção com *T. colubriformis* não afetou significativamente a digestão e absorção de proteína em ovinos, devido a essa capacidade dos ovinos em absorver os nutrientes em diferentes locais do intestino. De forma semelhante, o balanço de N não foi afetado pela infecção por *T. colubriformis* sendo, portanto, semelhante entre cordeiros C e I, podendo estar relacionado à absorção compensatória, como mencionado anteriormente.

Não houve diferença no peso vivo, assim como no GMD entre cordeiros C e I. Porém, cordeiros C apresentaram constante escore de condição corporal ao longo do tempo (Figura 2), situação inversa ao encontrado nos cordeiros I que, apresentaram significativa diminuição do ECC ocorrida paralelamente ao início da eliminação de ovos. Deve ser salientado a ocorrência do processo inflamatório, a nível intestinal, que ocorre em ovinos parasitados com helmintos, provocando alteração na permeabilidade vascular, com difusão desse líquido para a

cavidade, principalmente em casos de infecções crônicas, desequilíbrio eletrolítico e perda proteica (KYRIAZAKIS et al., 1996; SILVA, 2014). Tal situação pode mascarar o desempenho animal, onde a carcaça desses animais parasitados pode-se encontrar emaciada e de inferior qualidade.

3.5. Conclusões

A infecção moderada com *T. colubriformis* em cordeiros propiciou impacto negativo sobre as variáveis sanguineas, destacando a redução de eritrócitos, hemoglobina e proteínas totais com elevação de eosinófilos. Além disto, afetou negativamente a digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica da dieta.

Referências

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal**: as bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos. 4. ed. São Paulo: Nobel, 2002. 395 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

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

BARKER, I. K. Intestinal pathology associated with *Trichostrongylus colubriformis* infection in sheep: vascular permeability and ultrastructure of the mucosa. **Parasitology**, London, v. 70, p. 173-180, 1975.

BERNARDI, J. R. A.; ALVES, J. B.; MARIN, C. M. Desempenho de cordeiros sob quatro sistemas de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 1248-1255, 2005.

BOWMAN, D. D. et al. **Georgi's parasitology for veterinarians**. 8. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Publishing, 2003. 422 p.

BOWN, M. D.; POPPI, D. P.; SYKES, A. R. Nitrogen transactions along the digestive tract of lambs concurrently infected with *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta*. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 66, p. 237-249, 1991.

BRICARELLO, P. A. et al. Response of corriedale and crioula lanada sheep to artificial primary infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 26, p. 447-457, 2002.

CANTACESSI, C. et al. First transcriptomic analysis of the economically important parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using a next-generation sequencing approach. **Infection, Genetics and Evolution**, Amstedam, v. 10, p. 1199-1207, 2010.

CARDIA, D. F. F. et al. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, p. 248-258, 2011.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition–parasite interaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, p. 187-204, 1999.

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

DEHORITY, B. A. et al. Occurrence of the rumen ciliate Oligoisotricha bubali in domestic cattles (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 45, n. 4, p. 1394-1397, 1983.

DORCHIES, P. et al. Reduced egg counts in mixed infections with Oestrus ovis and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils? **Parasitology Research**, Berlin, v. 83, p. 727-30, 1997.

DYNES, R. A. et al. Elevation of feed intake in parasite-infected lambs by central administration of a cholecystokinin receptor antagonist. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 79, p. 47-54, 1998.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, p. 285-308, 1997.

GREER, A. W. et al. The effect of concurrent corticosteroid-induced immuno-suppression and infection with the intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis* on feed intake and utilization in both immunologically naïve and competent sheep. **Animal Science**, Cambridge, v. 80, p. 89-99, 2005.

HARRISON, G. B. L. et al. Studies on the role of mucus and mucosal hypersensitivity reactions during rejection of *Trichostrongylus colubriformis* from the intestine of immune sheep using an experimental challenge model. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 29, p. 459-468, 1999.

HOUDIJK, J. G. M.; ATHANASIADOU, S. Direct and indirect effects of host nutrition on ruminant gastrointestinal nematodes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE NUTRITION OF HERBIVORES, 6., 2003, Mérida, Yucatán, México. **Matching herbivore nutrition to ecosystems biodiversity; proceedings…** Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán, 2003. p. 213-236.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1986.

KANEKO, J. J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KANEKO, J. J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animal**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. 918 p.

KRAMER, J. W. Normal hematology of cattle, sheep, and goats. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Ames: Blackwell, 2006.

KYRIAZAKIS, I. et al. Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, p. 297-313, 1996.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, p. 229-234, 2009.

O'CONNOR, L. J. et al. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, p. 1-15, 2006.

POPPI, D. P. et al. Nitrogen transactions in the digestive tract of lambs exposed to the intestinal parasite *Trichostrongylus colubriformis*. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 55, p. 593-602, 1986.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding**: a manual for research workers. Rome: FAO, 1995. 126 p.

RAIMONDO, R. F. S. et al. Uso de sensor portátil para a mensuração de glicose e beta hidroxibutirato no sangue de bovinos leiteiros. **Veterinaria & Zootecnia**, Botucatu, v. 18, p. 389-393, 2011.

SILVA, H. M. Nematodioses gastrintestinais de caprinos: uma revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.13, p. 199-208, 2014.

SOTOMAIOR, C. S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Estudo do tipo de hemoglobina como auxiliar na seleção de ovinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrointestinais. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 3, p. 51-55, 1998.

SYKES A. R.; COOP R. L.; ANGUS K. W. Chronic infection with *Trichostrongyhts vitrinus* in sheep. Some effects on food utilization, skeletal growth and certain serum constituents. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 26, p. 372-377, 1979.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Intake and utilization of food by growing lambs with parasitic damage to the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongyllus colubriformis* larvae. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 86, p. 507-515, 1976.

SYKES, A. R.; POPPI, D. P.; ELLIOT, D. C. Effect of concurrent infection with *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* on the performance of growing lambs consuming fresh herbage. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 110, p.531-541, 1988.

SYMONS, L. E. A.; JONES, W. O. Nematospiroides dubius. Nippostrongylus brasiliensis and *Trichostrongylus colubriformis*: protein digestion in infected mammals. **Experimental Parasitology**, New York, v. 27, p. 496-506, 1970.

TAYLOR, M. A. et al. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 742 p.

THOMPSON, J.; MEYER, H. Body condition scoring of sheep. In: BIENNIAL SPOONER SHEEP DAY, 52., 2006, Madiosn, Wisconsin. **Proceedings…** Madison, Wisconsin: University of Wisconsin, Madison, 2006. p. 28-31.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. 273 p.

VAN HOUTERT, M. F. J.; SYKES, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, p. 1151-1167, 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutrition ecology of the ruminants**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J. et al. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

4. Cinética do fósforo em cordeiros infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* com o uso de ^{32}P

Resumo

Esse estudo foi conduzido objetivando-se avaliar o metabolismo e a cinética do fósforo (P) em cordeiros infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis* utilizando a técnica de diluição isotópica e modelagem. Foram utilizados 15 cordeiros (21,1 ± 1,50 kg) machos, da raça Santa Inês, de aproximadamente seis meses de idade, distribuídos nos tratamentos infectado (I, n=8) e controle (C, n=7). Os cordeiros I receberam infecções seriadas com 5000 L3/três vezes na semana totalizando 45000 L3 de *T. colubriformis*. Após 66 dias da última inoculação de L3, foi injetado 6,6 MBq de ^{32}P/cordeiro para avaliar a cinética do mineral. Amostras de sangue, fezes e urina foram coletados nos sete dias seguintes, com abate dos cordeiros no último dia e colheita dos tecidos ósseo e moles (fígado, rim, coração e músculo). Modelo biomatemático com quatro compartimentos (C_1 - trato gastrintestinal; C_2 – plasma; C_3 – osso e C_4 – tecidos moles) foi utilizado para analisar o fluxo de P nos cordeiros. Os cordeiros I e C apresentaram consumo de P (V_I) semelhante, sendo verificada redução da absorção de P dietético (Vaa) e P endógeno (Vaf) nos I, em relação aos controles, com consequente maior excreção fecal de P de origem dietético (V_{FD}) e menor quantidade de P endógeno que chega ao trato gastrintestinal (V_{IT}). Em cordeiros I a biodisponibilidade do P foi menor em comparação aos cordeiros C. Com a menor absorção (V_{aT}) de P em cordeiros I houve consequentemente, menor distribuição de P para os ossos e tecidos moles (V_{eD2}), bem como menor incorporação de P nos ossos (V_{O+D}). Conclui-se que a infecção por *T. colubriformis* em cordeiros altera sobremaneira o metabolismo de P, com redução da sua absorção intestinal e biodisponibilidade, com aumento da perda fecal, além da redução do fluxo de P para ossos.

Palavras-chave: endoparasitas, fluxos, modelagem, osso, radiofósforo, tecidos moles

4.1. Introdução

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais importantes da nutrição animal, sendo necessário em várias funções do corpo, atuando na manutenção e reparo dos tecidos corporais, onde em associação com cálcio e outros minerais promovem o crescimento e a mineralização do tecido ósseo e desenvolvimento muscular. Dessa forma, o consumo adequado de P atua na regulação de minerais essenciais, assim como no adequado consumo e utilização de energia e nutrientes (VITTI; KEBREAB, 2010).

Em ovinos, um dos fatores que podem interferir no metabolismo do P é o parasitismo gastrintestinal, causando sérios danos ao crescimento ósseo e desempenho (SYKES; COOP, 1976; 1977; SYKES; COOP; ANGUS, 1977; SYKES; COOP; ANGUS, 1979). A reduzida absorção e/ou retenção de P é altamente significante, pois, o P é o mineral que possui uma maior quantidade de funções biológicas (WALKER; AL-ALI, 1987). A dimensão do impacto da verminose no metabolismo ovino está relacionada à intensidade do desafio larval diário, seu estabelecimento no hospedeiro e a capacidade desse hospedeiro promover a resposta imune (PARKINS; HOLMES, 1989; VAN HOUTERT; SYKES, 1996; AMARANTE, 2015).

Cordeiros infectados com *Trichostrongylus colubriformis* apresentam alta redução nos teores de P (SYKES; COOP, 1976), possivelmente em consequência de depressão da capacidade de absorção desse mineral (REVERON; TOPPS; GELMAN, 1974; SYKES; COOP, 1976). Segundo Poppi et al. (1985), infecções subclínicas por *T. colubriformis* afetam diretamente a absorção e a reciclagem de P para o trato digestivo, resultando na deficiência do mineral. Uma vez que o P não foi absorvido ele será perdido via fezes. Assim, além do impacto negativo no metabolismo animal, provoca a contaminação do solo e dos lençóis freáticos a partir do P eliminado diretamente no ambiente (TAMMINGA, 2003).

O uso da técnica de diluição isotópica tem permitido avaliar o metabolismo de P em ruminantes, sua biodisponibilidade e as perdas endógenas (VITTI et al., 1991; VITTI et al., 2008), buscando a eficiência de utilização, o atendimento dos requerimentos nutricionais com consequente redução da contaminação ambiental (VITTI; KEBREAB, 2010). Nesse sentido, a aplicação de modelos biomatemáticos permitem avaliar a translocação do P no organismo animal. Vários estudos foram realizados em ovinos avaliando os efeitos de diferentes níveis de fósforo no metabolismo de P (LOUVANDINI; VITTI, 2007; DIAS et al., 2007; LOUVANDINI et al., 2008). No entanto, em ovinos infectados com *T. colubriformis* os dados são incipientes, principalmente, com a aplicação de modelagem. Assim, objetivou-se avaliar o

metabolismo e a cinética do P em cordeiros infectados experimentalmente com *T. colubriformis* usando a técnica de diluição isotópica e modelagem.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Descrição e tratamentos

Informações inerentes ao local do estudo, cultivo das larvas de *T. colubriformis*, formação dos grupos experimentais, dieta, regime alimentar com o uso do pair-fed e inoculação das larvas infectantes nos cordeiros estão descritos nos itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3.

Para desenvolvimento da modelagem, foram utilizados 15 cordeiros, os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos experimentais: controle (C, n=7) e infectados (I, n=8) (5000 larvas em estádio de desenvolvimento L3, três vezes por semana, durante três semanas, totalizando 45000 L3 de *T. colubriformis*). O período experimental teve duração de 90 dias. Os primeiros 75 dias, para inoculação das larvas e estabelecimento da infecção sendo os últimos 15 dias para aplicação do ^{32}P e coleta de amostras.

4.2.2. Aplicação do fósforo radioativo e coletas de amostras

A solução radioativa de ^{32}P foi produzida pelo instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e consiste em uma solução de fosfato de sódio, livre de carreador. Para obtenção de 6,6 megabecquerel (MBq) em 0,5 mL fez-se a diluição em 10 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,85 %. Para formação dos padrões, amostras de 0,5 mL dessa solução foram transferidas para balões volumétricos de 1 L completando-se o volume com água destilada. Em seguida 1 mL da solução foi adicionado a frascos de contagem contendo 19 mL de água destilada para avaliação da radioatividade.

A fase de coletas teve duração de 15 dias, com oito dias de adaptação às gaiolas para estudo de metabolismo e coleta de amostras de fezes e urina para determinação do P inorgânico. Os sete dias seguintes foram utilizados para avaliação radioativa (66 dias após a última inoculação de L3) quando foi injetado, em cada animal, por venopunção da jugular direita, 6,6 MBq de ^{32}P. Amostras de sangue foram coletadas durante sete dias por venopunção da jugular esquerda, cinco minutos após a injeção de ^{32}P e depois a cada 24 horas utilizando-se agulhas acopladas a tubos vacutainer contendo 0,05 mL de ácido etilenodiamino

tetra-acético (EDTA). Amostras de fezes e urina (10 %) foram coletadas diariamente a partir de 24 horas após a injeção do ^{32}P, durante sete dias.

Para a determinação da atividade radioativa no plasma, amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos. Então, foi adicionado 1 mL de plasma em 19 mL de água destilada em frascos de cintilação para contagem por efeito Cerenkov (NASCIMENTO FILHO; LOBÃO, 1977; IAEA, 1979). Para determinação do P inorgânico no plasma foi adicionado 9 mL de ácido tricloroacético (10 %) em 1 mL de plasma. Essa mistura permaneceu por 10 minutos em repouso, no escuro, para precipitação das proteínas, então foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos. O fósforo inorgânico no plasma foi determinado por análises colorimétricas segundo metodologia descrita por Fiske e Subbarow (1925).

As fezes foram maceradas em almofariz, homogeneizadas e 1 g pesado em cadinho para a secagem em estufa a 100 °C. Após a determinação das cinzas por calcinação em mufla a 500 °C, fez-se a digestão com 5 mL de ácido sulfúrico (18N), e o volume total foi transferido para frascos de contagem completando-se o volume para 20 mL, e posterior determinação da radioatividade por efeito Cerenkov (NASCIMENTO FILHO; LOBÃO, 1977; IAEA, 1979). A determinação do P inorgânico nas fezes foi realizada por colorimetria, após a digestão das cinzas com ácido clorídrico, empregando-se o método do vanadato e molibdato de amônio (SARRUGE; HAAG, 1974).

Para determinação do ^{32}P presente nas amostras de urina, fez-se a diluição de 1 mL de urina em 19 mL de água destilada em frascos de cintilação para contagem por efeito Cerenkov (NASCIMENTO FILHO; LOBÃO, 1977; IAEA, 1979).

Após os sete dias de coletas da fase experimental, os cordeiros foram sacrificados de acordo com os procedimentos da Comissão de Ética em Experimentação com Animais do CENA (Protocolo 004/2015).

Após a sangria dos cordeiros, amostras de tecidos moles (fígado, rim, coração e músculo) e osso foram coletados. A amostra do osso foi representada pela 12ª costela, que foi retirada do lado direito do animal.

As amostras dos tecidos foram limpas e preparadas para a determinação do teor de matéria seca, seguindo-se de uma pré-queima em chapa aquecedora com gotas de ácido nítrico 50 %. As cinzas obtidas por incineração (500 ºC), foram solubilizadas em ácido clorídrico, e o teor de P inorgânico determinado pelo método vanadato-molibdato (SARRUGE; HAGG, 1974).

A detecção da radioatividade de ^{32}P nos tecidos foi realizada em espectrômetro de cintilação liquida por efeito Cerenkov (NASCIMENTO FILHO; LOBÃO, 1977; IAEA, 1979).

4.2.3. Definições e cálculos de determinação

A determinação das atividades específicas no plasma e nas fezes foram calculadas como porcentagem da atividade injetada por mg de fósforo de acordo Lofgreen e Kleiber (1953). A partir das atividades específicas (no plasma e nas fezes) foram determinadas as perdas endógenas fecais de fósforo, base para os cálculos de absorção real do elemento.

4.2.3.1. Plasma

Para os cálculos de determinação da porcentagem injetada e da atividade especifica foram utilizadas as seguintes fórmulas adaptadas de Salviano e Vitti (1996):

AIplasma = (CPMplasma / CPMsolução padrão) x 100

AEplasma = AIplasma / Piplasma

Onde:

AIplasma = % da atividade injetada presente no plasma;

CPMplasma = contagem por minuto em 1 mL de plasma;

CPMsolução padrão = contagem por minuto na solução padrão;

AEplasma = atividade especifica no plasma;

Piplasma = mg de fósforo em 1 mL de plasma.

4.2.3.2. Fezes

Os cálculos de determinação da porcentagem injetada e da atividade especifica foram semelhantes ao plasma:

AIfezes = (CPMfezes / CPMsolução padrão) x 100

AEfezes = AIfezes / Pifezes

Onde:

AIfezes = % da atividade injetada presente nas fezes;

CPMfezes = contagem por minuto em 1 g de fezes;

CPMsolução padrão = contagem por minuto na solução padrão;

AEfezes = atividade especifica nas fezes;

Pifezes = mg de fósforo em 1 g de fezes.

4.2.3.3. Perda endógena fecal

Após as determinações das atividades especificas no plasma e fezes, a porcentagem de fósforo endógeno excretado nas fezes foi determinada pela seguinte fórmula:

- P endógeno nas fezes (%) = (AEfezes / AEplasma) x 100

Com base na porcentagem de fósforo endógeno excretado nas fezes e na quantidade de fósforo total excretado nas fezes (V_F), calculou-se a quantidade de fósforo endógeno excretado (V_f):

V_F = porcentagem de P nas fezes x quantidade diária de fezes

V_f = P endógeno nas fezes (%) x V_F

4.2.3.4. Absorção real e disponibilidade biológica

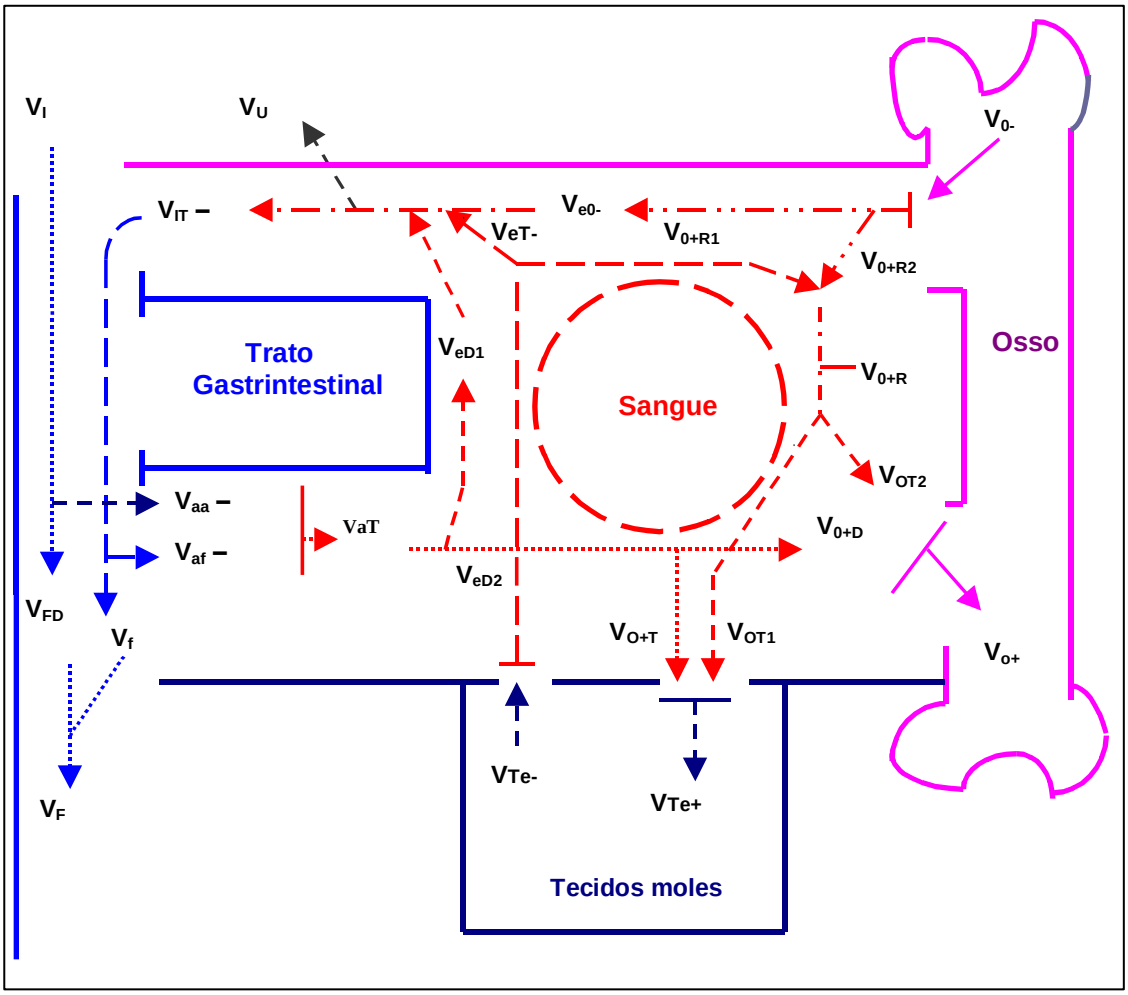
Para o cálculo da absorção real e da disponibilidade biológica utilizou-se a quantidade de fósforo consumido, fósforo excretado e fósforo endógeno:

- P absorvido = P consumido – (P excretado – P endógeno)
- Disponibilidade biológica (%) = (P absorvido / P consumido) x 100

4.2.4. Modelo Lopes et al. (2001)

O modelo utilizado (Figura 4) apresenta quatro compartimentos: C_1 - trato gastrintestinal; C_2 – plasma; C_3 – osso e C_4 – tecidos moles (LOPES et al., 2001). Segundo Louvandini et al. (2008), o uso do modelo Lopes et al. (2001) possui vantagens sobre os outros modelos, 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. Nesse modelo os tecidos moles são representados pelo fígado, rim, coração e músculo, os quais são estudados conjuntamente.

Figura 4 - Modelo matemático do metabolismo do fósforo (Lopes et al., 2001). V_I - quantidade de P ingerido; V_F - perda total de P nas fezes; V_f - P endógeno fecal; V_{FD} - P nas fezes de origem dietética; V_U - perda de P na urina; V_{aa} - P absorvido de origem alimentar; V_{IT}- P de origem endógena, que chega ao trato gastrintestinal - T_{GI}; V_{af} - P endógeno reabsorvido no TGI; V_{aT} - total de P absorvido; V_{0+} - P incorporado no osso; V_{O-} - P reabsorvido do osso; V_{O+R2} - P do osso reciclado para o osso e tecidos moles; V_{eO-} - P reabsorvido do osso, que retorna ao TGI; V_{O+D} - P do V_{aT} incorporado no osso; V_{Te+} - P incorporado nos tecidos moles; V_{Te-} - P reabsorvido dos tecidos moles; V_{O+R1} - P dos tecido moles reciclado para osso e tecidos moles; V_{O+R} - total de P reciclado para o osso e tecidos moles; V_{eT-} - P reabsorvido dos tecidos moles, que retorna ao TGI; V_{O+T} - P do V_{aT} incorporado nos tecidos moles; V_{eD1} - P do V_{aT} que retorna para o TGI; V_{eD2} - P do V_{aT} distribuído para o osso e tecidos moles; V_{T01} - P do V_{O+R} reincorporado nos tecidos moles; V_{T02} - P do V_{O+R} reincorporada no osso.



As variáveis para formação do modelo foram estimadas através de equações envolvendo as seguintes variáveis: P consumido (V_I), P total excretado nas fezes (V_F), com as frações de origem dietética (V_{FD}), e endógena (V_f), P excretado na urina (V_U), P absorvido de origem alimentar (Vaa) e reabsorção do P de origem endógena (V_{af}), valor da fração de P endógeno, proveniente de secreções e de células de descamação, que chega ao trato gastrintestinal (V_{IT}),

absorção total de P, incluindo as frações de origem endógena e alimentar (V_{aT}) e o balanço de P (Ba), definidas segundo Fernandez (1995) (equações de 1 a 6). O valor de P proveniente do total absorvido (V_{aT}) que retorna ao trato gastrintestinal (V_{eD1}) foi calculado pela diferença entre o P do V_{aT} e o P incorporado em C_3 e C_4, após subtrair-se o P reciclado que retorna a estes compartimentos. O restante do total absorvido (V_{eD2}) foi distribuído proporcionalmente entre C_3 e C_4 (V_{O+T} e V_{O+D}), de acordo equações de 7 a 10.

(1) $V_{FD} = V_I - V_{aa}$

(2) $V_{aa} = V_I - V_{FD}$

(3) $V_{IT} = \dfrac{V_f}{1 - (V_{aa}/V_f)}$

(4) $V_{af} = V_{IT} - V_f$

(5) $V_{aT} = V_{aa} + V_{af}$

(6) $B_a = V_I - V_F - V_U$

(7) $V_{eD1} = V_{aT} - (V_{O+} - V_{OR2}) - (V_{Te+} - V_{O+R1})$

(8) $V_{eD2} = V_{aT} - V_{eD1}$

(9) $V_{O+D} = \dfrac{V_{O+}\ (V_{aT} \times \%\ \text{P incorporado no osso})}{V_{O-}\ (V_{aT} \times \%\ \text{P incorporado no osso})}$

(10) $V_{O+T} = \dfrac{V_{Te+}\ (V_{aT} \times \%\ \text{P incorporado nos tecidos moles})}{V_{Te-}\ (V_{aT} \times \%\ \text{P incorporado nos tecidos moles})}$

Na determinação do P incorporado no osso (V_{O+}) e nos tecidos moles, fígado, rim, coração e músculo (V_{Te+}), foi considerado a concentração de P (mg/g MS). O percentual de ^{32}P [(cpm da amostra/g de MS)/(dose total injetada)]/[(mg P/ MS)], e a atividade específica dos tecidos [(% da atividade injetada de ^{32}P)/(mg P/g MS do tecido)], foram calculados. Para o ^{32}P retido nos tecidos moles foi considerado a média dos valores encontrados em cada tecido estudado. A quantidade de MS de cada tecido foi determinada pelo produto entre o percentual de MS obtida e o peso dos tecidos, definidos segundo dados de pesquisa de Owen (1976) e Bueno (1997). Foi utilizado ainda nesse processo, o decaimento físico $T_{1/2}$ e biológico (Tb) do ^{32}P, fundamentado na International Atomic Energy Agency (1979), uma

vez que os cordeiros foram sacrificados uma semana após a aplicação do ^{32}P e a contagem do material radioativo efetuada oito dias após o abate.

O valor do ^{32}P retido (mg/g MS) foi determinado pelo produto do percentual de ^{32}P retido e a concentração total de P nos compartimentos C_1 e C_3 (mg/g MS).

Após a correção do decaimento do ^{32}P para a data da sua introdução na corrente sanguínea, calculou-se o P incorporado (mg/g MS) nos compartimentos C_3 e C_4 pela relação entre o valor de ^{32}P corrigido e o da atividade específica em cada compartimento envolvido, e o P total incorporado (mg) nos compartimentos C_3 e C_4 foi obtido pelo produto entre a MS (g) do compartimento e o P incorporado (mg) pelo produto entre a MS (g) do compartimento e o P incorporado (mg/g MS). Os valores de V_{O+} e V_{Te+} (mg P/kg PV/dia) foram obtidos pela relação entre o P total incorporado no compartimento e o peso do animal (g). As equações 11 a 24 caracterizam essas determinações.

(11) ^{32}P retido no osso (mg ^{32}P/g MS) = P inorgânico (mg P/g MS) x ^{32}P retido (%)

(12) P total incorporado ao osso (mg P) = P total no osso (mg P/g MS) x MS do osso (g)

(13) V_{O+} (mg P/kg PV) = $\frac{\text{P total incorporado ao osso (mg P)}}{\text{Peso total do ovino (kg)}}$ x 1000

(14) Peso total dos tecidos (g) = Peso do ovino (g) x % do peso dos tecidos

(15) MS tecidos (g) = Peso total dos tecidos (g) x % da MS dos tecidos

(16) ^{32}P retido no fígado (mg ^{32}P/g MS) = P inorgânico (mg P/g MS) x ^{32}P retido (%)

(17) ^{32}P retido no rim (mg ^{32}P/g MS) = P inorgânico (mg P/g MS) x ^{32}P retido (%)

(18) ^{32}P retido no coração (mg ^{32}P/g MS) = P inorgânico (mg P/g MS) x ^{32}P retido (%)

(19) ^{32}P retido no músculo (mg ^{32}P/g MS) = P inorgânico (mg P/g MS) x ^{32}P retido (%)

(20) P total incorporado no tecido (mg P) = P total tecido (mg P/g MS) x MS do tecido (g)

(21) V_{Te+} (mg P/kg PV) = $\frac{\text{P total incorporado no tecido (mg P)}}{\text{Peso do ovino (kg)}}$

(22) $T_{1/2}$ = 0,693/ constante de decaimento (K)

(23) Atividade do material radioativo no tempo t (A) = Atividade inicial (A_0) x e^{-kt}

(24) Tb = 0,693 t/1n (A_0/A)

O P reabsorvido nos compartimentos C_3 (V_{O-}) e C_4 (V_{Te-}) foi calculado deduzindo-se, respectivamente, de V_{O+} e V_{Te+} o valor do balanço de P multiplicado pela proporção de P incorporado no compartimento em estudo (equações 25 e 26).

Para a determinação do P reciclado que retorna aos compartimentos C_3 (V_{O+R1}) e C_4 (V_{O+R2}) e ao trato gastrintestinal (V_{eO} - V_{eT}), o cálculo foi realizado com base nas equações 27 a 30, segundo Lopes et al. (2001). O valor do P proveniente do osso e tecidos moles reciclado para os tecidos moles (V_{O+R}), o do P do V_{O+R} reincorporado nos tecidos moles (V_{TO1}) e o P do V_{O+R} reincorporado nos ossos (V_{TO2}), foram determinados de acordo com as equações 31 a 33.

(25) $V_{O-} = V_{O+}$ - (B_a x % de P incorporado no osso)

(26) $V_{Te-} = V_{Te+}$ - (B_a x % de P incorporado no tecido)

(27) $V_{O+R1} = \dfrac{V_{O+} \text{ x } V_{O-}}{V_{Te+} \text{ (}Va_T \text{ x \% de P incorporado no tecido)}}$

(28) $V_{O+R2} = \dfrac{V_{Te+} \text{ x } V_{Te-}}{V_{o-} \text{ (}Va_T \text{ x \% de P incorporado no osso)}}$

(29) $V_{eO-} = V_{O-} - V_{O+R2}$

(30) $V_{eT-} = V_{Te-} - V_{O+R1}$

(31) $V_{O+R} = V_{O+R1} + V_{O+R2}$

(32) $V_{TO1} = V_{O+R} - V_{O+} - V_{O+D}$

(33) $V_{TO2} = V_{O+R} - V_{TO1}$

4.2.5. Análises estatísticas dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa SAS v. 9.3® (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) em um delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos, controle (n=7 e infectado (n=8) e, análise de variância utilizando-se o procedimento GLM, com médias comparadas pelo teste t adotando-se o nível de 10 % de probabilidade.

4.3. Resultados

Cordeiros I por *T. colubriformis*, no sistema pair-fed de avaliação, apresentaram um consumo semelhante aos cordeiros C ($P > 0,1$) (Tabela 9). Dessa forma, o consumo de fósforo (V_I) não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,1$). Ambos os tratamentos apresentaram pequenas perdas de P via urina (V_U) ($P > 0,1$), sendo as fezes a principal via de excreção de P nos cordeiros, com perdas totais de P (V_F) maior em cordeiros I ($P < 0,1$).

Em cordeiros C o P endógeno que chega ao TGI (V_{IT}) foi maior que em cordeiros I ($P < 0,1$). Ambos os tratamentos (C e I) apresentaram perda endógena fecal de P (Vf) semelhante ($P > 0,1$). Porém, verificou-se maior capacidade absortiva tanto do P endógeno (Vaf) quanto do P de origem alimentar (Vaa) em cordeiros C ($P < 0,1$), por consequência, uma maior quantidade de P de origem dietética (V_{FD}) foi verificada nas fezes dos cordeiros I ($P < 0,1$).

Tabela 9 - Médias das variáveis relacionadas aos fluxos de fósforo (P) e disponibilidade biológica do elemento em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*

Variáveis (mg/kg PV/dia)	**Tratamentos**		
	Controle (n=7)	**Infectado (n=8)**	**Prob**
Consumo de MS (g/dia)	678,7 ± 15,41	698,1 ± 14,41	0,36*
P consumido (V_I)	134,3 ± 12,44	142,2 ± 11,51	0,64
Perdas de P dietético nas fezes (V_{FD})	55,4 ± 12,44	84,7 ± 10,88	0,08
P endógeno total que chega ao TGI (V_{IT})	73,3 ± 9,44	52,7 ± 8,83	0,06
P absorvido de origem endógena (Vaf)	43,2 ± 7,09	23,7 ± 6,63	0,06
P endógeno excretado nas fezes (Vf)	30,1 ± 4,40	28,6 ± 4,12	0,84
Perdas totais de P nas fezes (V_F)	85,6 ± 14,60	113,6 ± 13,66	0,08
Perdas de P na urina (V_U)	0,04 ± 0,11	0,05 ± 0,05	0,95
Balanço de P (Ba)	48,6 ± 10,06	28,5 ± 9,41	0,16
P absorvido de origem alimentar (Vaa)	78,8 ± 8,59	57,6 ± 8,03	0,09
P total absorvido (V_{aT})	122,1 ± 14,14	81,3 ± 13,23	0,05
Disponibilidade biológica (%)	58,0 ± 0,05	42,6 ± 0,04	0,05
P plasmático (mg/100 mL)	6,6 ± 0,38	6,2 ± 0,35	0,42

Prob – probabilidade, *Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade.

A disponibilidade biológica do P foi menor nos cordeiros I em relação aos cordeiros C ($P < 0,1$). O P plasmático e os balanços geral, nos ossos e tecidos moles de P não diferiram entre cordeiros C e I ($P > 0,1$) (Tabelas 9 e 10).

Tabela 10 - Médias das variáveis relacionadas aos fluxos de fósforo (P) em cordeiros controle e infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubriformis*

Variáveis (mg/kg PV/dia)	**Tratamentos**		
	Controle (n=7)	**Infectado (n=8)**	**Prob**
P do V_{aT} que retorna ao TGI (V_{eD1})	9,8 ± 1,90	6,7 ± 1,77	0,24
P do V_{aT} distribuído para o osso e demais tecidos (V_{eD2})	112,2 ± 12,52	74,5 ± 11,71	0,04
P do V_{aT} incorporado nos tecidos moles (V_{O+T})	6,4 ± 1,17	5,8 ± 1,09	0,70
P do V_{aT} incorporado no osso (V_{O+D})	105,7 ± 11,57	68,7 ± 10,82	0,03
P incorporado no osso (V_{O+})	813,2 ± 90,32	650,2 ± 84,49	0,21
P reabsorvido do osso (V_{O-})	767,5 ± 92,09	623,9 ± 86,14	0,27
Balanço de P no osso	45,7 ± 9,27	26,2 ± 8,67	0,14
P reabsorvido do osso que retorna ao TGI (V_eO_-)	60,0 ± 7,57	42,4 ± 7,08	0,11
P do osso reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R2})	707,5 ± 88,33	581,5 ± 82,63	0,31
P do tecido reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R1})	42,2 ± 8,08	49,9 ± 7,56	0,49
Total de P reciclado para o osso e demais tecidos (V_{O+R})	749,8 ± 94,95	631,4 ± 88,81	0,37
P do V_{O+R} reincorporado aos ossos (V_{OT2})	707,5 ± 88,33	581,5 ± 82,63	0,31
P do V_{O+R} reincorporado aos tecidos moles (V_{OT1})	42,2 ± 8,08	49,9 ± 7,56	0,49
P incorporado nos tecidos moles ($V_{Te+)}$	48,7 ± 8,74	55,8 ± 8,17	0,56
P reabsorvido dos tecidos moles (V_{Te-})	45,7 ± 8,50	53,5 ± 7,95	0,51
Balanço de P nos tecidos moles	2,9 ± 0,85	2,2 ± 0,80	0,58
P reabsorvido dos tecidos moles que retorna ao TGI (V_{eT-})	3,54 ± 0,60	3,59 ± 0,56	0,95

Prob – probabilidade, *Comparação de médias pelo teste t a 10 % de probabilidade.

Valores de V_{eD1} e V_{O+T} não diferiram entre tratamentos ($P > 0,1$), porém V_{eD2} foi afetado pela infecção com *T. colubriformis* ($P < 0,1$). Em cordeiros I o V_{O+D} foi afetado quando comparado aos cordeiros C ($P < 0,1$) (Tabela 10).

As variáveis V_{O+}, V_{O-}, V_{eO-}, V_{O+R2}, VO_{+R1}, V_{O+R}, V_{OT2}, V_{OT1}, $V_{Te+,}$ V_{Te-}, V_{eT-} não diferiram entre cordeiros C e I ($P > 0,1$).

4.4. Discussão

A interferência no consumo de MS, e por consequência de P em ovinos infectados com *T. colubriformis* como causa do baixo desempenho dos animais são controversos na literatura. Alguns autores relataram que a diminuição do consumo voluntário, decorrente da parasitose instalada, é causa determinante do baixo desempenho animal (SYKES; COOP; ANGUS, 1979; BOWN; POPPI; SYKES, 1989; FOX et al., 1997; MOLENTO, 2009; CANTACESSI et al., 2010). Por outro lado, autores citaram que a tricostrongilose não é fator responsável pela redução do consumo de nutrientes e que o baixo desempenho apresentado por esses cordeiros é decorrente da baixa eficiência na digestão e absorção dos nutrientes (WILSON; FIELD, 1983; SYKES; POPPI; ELLIOT, 1988; COOP; KYRIAZAKIS, 1999; CARDIA et al., 2011).

Dentro desse contexto, os dados do presente estudo confirmaram que a infecção seriada com *T. colubriformis* não afeta o consumo de MS (Tabelas 5 e 9), proporcionando semelhante consumo de P entre os cordeiros C e I ($P > 0,1$), porém, o processo de absorção da dieta é significativamente afetado, com redução da digestibilidade aparente da MS (item 3.3.3, Tabela 6) e, com técnica mais acurada, a diluição isotópica, verificou-se que em termos percentuais, a infecção com *T. colubriformis* induziu redução de 18,2 % da absorção de P comparado aos cordeiros C. Esses resultados corroboram com Wilson e Field (1983) que, utilizando ^{32}P na avaliação da absorção de P em cordeiros infectados com 3000 larvas de *T. colubriformis* por dia, durante 8 semanas, observaram que a infecção reduziu significativamente a capacidade de absorção do P exógeno. No trabalho realizado por Louvandini et al. (2009a) utilizando a técnica de diluição isotópica (^{32}P) em bezerros com infecção aguda (dose única de 45 000 L3) por *Cooperia punctata*, foi verificado redução na retenção de P. Em experimento semelhante, porém, com bezerros sob infecção crônica (10 000 L3 / semana, durante 5 semanas), também foi verificado alteração no metabolismo do P com menor retenção do elemento (LOUVANDINI et al., 2009b).

A concentração de P sanguíneo semelhante entre os cordeiros C e I, dentro da faixa de normalidade (4 a 9 mg/100 mL) para a espécie (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999), sinalizou mais uma vez que essa variável não é um bom indicativo para aferir o *status* nutricional de P em ruminantes, pois, apesar da absorção menor de P pelos cordeiros I os teores de P na corrente sanguínea são mantidos pelos mecanismo de homeostase do elemento lançando mão das reservas do mineral nos tecidos principalmente o osso, além da menor reciclagem do elemento via saliva (V_{IT}) (VITTI; KEBREAB, 2010). Essa menor reciclagem nos cordeiros I

foi mecanismo de ajuste de fundamental importância para o organismo, principalmente, tendo importância relevante em animais em crescimento, pois o P é um dos principais elementos estruturais do corpo, participando do processo de síntese, crescimento, mineralização do esqueleto e ainda, na capacidade produtiva dos animais (carne, leite e lã) bem como a utilização da energia nos tecidos que é mediada pela molécula de ATP (NELSON; COX, 2000).

Uma vez comprometida a capacidade de absorção do P em consequência da tricostrongilose, também foi verificado que a disponibilidade biológica do P foi reduzida nos cordeiros I. Assim, nos cordeiros I, o fluxo do P absorvido incorporado no osso (V_{O+D}) foi reduzido significativamente, mostrando que, mesmo já tendo interferido na capacidade absortiva do P, o *T. colubriformis* interferiu na cinética desse macro elemento. Tais alterações, podem levar à redução do crescimento do esqueleto, densidade e mineralização óssea (REVERON; TOPPS; GELMAN, 1974; SYKES; COOP, 1976, 1977; FOX et al., 1997).

Do total de P absorvido, apenas pequenas quantidades foram direcionadas aos tecidos moles, 5,2 e 7,1 % em cordeiros C e I, respectivamente. As quantidades que retornaram para o TGI foram 8,0 e 8,2 % e, as quantidades que foram incorporadas aos ossos foram 86,5 e 84,5 para cordeiros C e I, respectivamente, confirmando que o tecido ósseo é sem dúvida o principal tecido envolvido no metabolismo de P em animais jovens (LOUVANDINI et al., 2008).

O balanço de P no osso representa 94 e 91,9 % do balanço geral de P no organismo de cordeiros C e I, respectivamente, em fase de crescimento, com fluxos de incorporação, reabsorção, reciclagem e reincorporação similares entre cordeiros C e I, porém altamente superiores aos tecidos moles, confirmando que o tecido ósseo funciona como um centro de armazenamento e distribuição de P concordando com Vitti e Kebreab (2010) que descrevem que a maioria do P nos animais (aproximadamente 80 %) ocorre como um constituinte do osso.

Sabe-se que o osso é um tecido dinâmico, que está em constante remodelagem, ou seja, constante incorporação e reabsorção de P e Ca contribuindo para a homeostase. No presente experimento, o nível de infecção não promoveu diferença significativa entre tratamentos quanto ao balanço de P no osso, porém, em infecções prolongadas, principalmente em ovinos criados à pasto, onde ocorre reinfecção diária dessa helmintose de caráter subclínico, poderia ocorrer um desbalanço acentuado de P nos ossos, levando a falhas que comprometam a deposição dos demais constituintes básicos da carcaça, que se desenvolvem posteriormente ao tecido ósseo, comprometendo o desempenho animal e o sistema de produção.

A principal via de excreção do P foi a fecal, sendo encontrado pequenas quantidades na urina dos cordeiros de ambos os tratamentos, estando de acordo com os relatos da literatura (LOUVANDINI; VITTI, 2007; DIAS et al., 2007; LOUVANDINI et al., 2009a; LOUVANDINI et al., 2009b) e, indicando que a endoparasitose não alterou a rota de excreção do mineral, pois a excreção urinária é uma via secundária associada ao consumo e absorção elevada de P (BRAVO et al., 2003). Como houve comprometimento da absorção e menor quantidade de P disponível a excreção pela urina não foi ativada e a perda endógena via saliva foi reduzida nos cordeiros infectados a fim de reter mais P.

O P excretado nas fezes é proveniente das frações do P dietético não absorvido e pelo P de origem endógena (derivado das secreções salivares, sucos digestivos e células intestinais). A maior excreção de P dietético em cordeiros I ocorreu devido ao parasitismo instalado no principal local de absorção de nutrientes (duodeno) (WILSON; FIELD, 1983; BOWN; POPPI; SYKES, 1989). Cordeiros I excretaram 18,3 % a mais de P dietético que cordeiros C. Isso mostrou que a infecção por *T. colubriformis* pode gerar perdas em produtividade, devido à baixa utilização desse importante mineral, devido à sua essencialidade na dieta, além de perdas econômicas, pelo seu alto custo de mercado, bem como impacto negativo ao ambiente pela contaminação do solo e água pelo aumento da sua excreção via fezes.

Possivelmente, essa maior excreção de P nas fezes em cordeiros I ocorreu devido à baixa utilização do P dietético, pela falha na absorção deste em consequência dos danos provocados à mucosa duodenal (BOWMAN et al., 2003; TAYLOR et al., 2010; CARDIA et al., 2011). Segundo Louvandini et al. (2009a) através do uso de ^{32}P em bezerros com infecção aguda de *Cooperia punctata*, foi verificado aumento da excreção nas fezes.

4.5. Conclusões

A absorção real de fósforo em ovinos foi comprometida pelo *Trichostrongylus colubriformis*, bem como a disponibilidade biológica desse elemento, aumentando, consequentemente, a excreção fecal do fósforo de origem alimentar. Além disto, cordeiros infectados diminuem a reciclagem do P via saliva para ajustar a distribuição do P pelo organismo.

O fluxo de P absorvido que chega aos ossos é reduzido pela infecção por *T. colubriformis*, mesmo assim, o tecido ósseo continua sendo a principal via de incorporação, reabsorção, reciclagem e reincorporação de P em cordeiros em crescimento infectados com *T. colubriformis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as investigações realizadas na presente Tese, verificou-se que o *T. colubriformis* não afeta diretamente o consumo de matéria seca e fósforo, respondendo uma questão que permaneceu conflitante por vários anos. Confirmou-se o impacto negativo da infecção por *T. colubriformis* sobre a capacidade absortiva do P, tanto da fração dietética quanto da endógena.

Como possível resposta à menor absorção de P, os cordeiros infectados reduziram a reciclagem de P, disponibilizando menor quantidade de P endógeno para o TGI, buscando distribuir o P absorvido para os tecidos corporais e manter a homeostase do P a nível plasmático.

O uso da modelagem além de ter permitido a verificação dos fluxos do P entre os compartimentos, nos mostrou que a infecção por *T. colubriformis* compromete a incorporação de P nos ossos (principal tecido de armazenamento e distribuição). Estando o metabolismo de P afetado, provavelmente, comprometerá o desempenho dos animais levando à ineficiência do sistema de produção de cordeiros.

A perda de P em cordeiros infectados com *T. colubriformis* gera impacto negativo de âmbito nutricional, afetando diretamente o metabolismo, impacto financeiro, sendo o P um dos elementos mais caros na formulação da mistura mineral e, impacto ambiental, pois sua consequente eliminação via fezes, contamina o solo e a água gerando alterações nos ecossistemas.

Referências

AMARANTE, A. F. T. **Os parasitas de ovinos**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2015. 263p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

BOWMAN, D. D. et al. **Georgi's parasitology for veterinarians**. 8. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Publishing, 2003. 422 p.

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**, Liverpool, v. 101, p. 11–20, 1989.

BRAVO, D. et al. Phosphorus availability of oilseed meals determined by the apparent faecal digestibility technique. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 108, p. 43-60, 2003.

BUENO, M. S. et al. Avaliação da carcaça de cabritos abatidos com diferentes pesos vivos. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 54, p. 61-67, 1997.

CANTACESSI, C. et al. First transcriptomic analysis of the economically important parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using a next-generation sequencing approach. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p. 1199-1207, 2010.

CARDIA, D. F. F. et al. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, p. 248-258, 2011.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition-parasite interaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, p. 187-204, 1999.

DIAS, R. S. et al. Phosphorus kinetics in lambs fed diferente levels of calcium phosphate. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 145, p. 509-516, 2007.

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

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

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, p. 285-308, 1997.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. **Laboratory training manual on the use of nuclear technigues in animal research**. Vienna, 1979. 300 p.

LOFGREEN, G. P.; KLEIBER, M. The availability of the phosphorus in alfafa hay. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 12, p. 366-371, 1953.

LOPES, J. B. et al. Modelo do fluxo biológico do fóosforo de fontes de fosfato em suínos, usando o ^{32}P como marcador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, p. 165-173, 2001.

LOUVANDINI, H. et al. Phosphorus kinetics in calves experimentally submitted to a trickle infection with *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, p. 47-51, 2009b.

LOUVANDINI, H. et al. Phosphorus kinetics in calves submitted to single infection with *Cooperia punctata.* **Journal of Agricultural Science**, London, v. 1, p. 58-65, 2009a.

LOUVANDINI, H. et al. Phosphorus kinetics in growing hair sheep. **Small Ruminant Research**, Amstedam, v. 76, p. 183-189, 2008.

LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S. Cinética de fósforo com modelos matemáticos em ovinos adultos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, p. 1467-1472, 2007.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, p. 229-234, 2009.

NASCIMENTO FILHO, V. F. D.; LOBÃO, A. O. **Detecção de P-32 em amostras de origem animal e vegetal por efeito Cerenkov, cintilação líquida e detector G.M**. Piracicaba: CENA, 1977. 35 p. (Boletim Científico, 48).

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: principles of biochemistry. 3. ed. New York: Worth, 2000. 1152 p.

OWEN, J. B. **Sheep production**. London: Baillière Tindall, 1976. 436 p.

PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 2, p. 227-246, 1989.

POPPI, D. P. et al. Calcium and phosphorus absorption in lambs exposed to *Trichostrongtlus colubriformis*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 95, p. 453-64, 1985.

REVERON, A. E.; TOPPS, J. H.; GELMAN, A. L. Mineral metabolism and skeletal development of lambs affected by *Trichosttongylus colubrifomis*. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 16, p. 310-319, 1974.

SALVIANO, L. M. C.; VITTI, D. M. S. S. Effect of different calcium and phosphorus ratios on endogenous loss and true absorption in sheep. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, p. 349-355, 1996.

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

SYKES A. R.; POPPI D. P.; ELLIOT D. C. Effect of concurrent infection with *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubrlformis* on the performance of growing lambs consuming fresh herbage. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 110, p. 53l-541, 1988.

SYKES, A. R.; COOP R. L.; ANGUS, K. W. Chronic infection with *Trichostrongyhts vitrinus* in sheep. Some effects on food utilization, skeletal growth and certain serum constituents. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 26, p. 372-377, 1979.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Intake and utilisation of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 88, p. 671-677, 1977.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Intake and utilization of food by growing lambs with parasitic damage to the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongyllus colubriformis* larvae. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 86, p. 507-515, 1976.

SYKES, A. R.; COOP, R. L.; ANGUS, K. W. The influence of chronic *Ostertagia circumcincta* infection on the skeleton of growing sheep. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 87, p. 521-529, 1977.

TAMMINGA, S. Pollution due to nutrient losses and its control in European animal production. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 84, p. 101-111, 2003.

TAYLOR, M. A. et al. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 742 p.

TERNOUTH, J. H.; SEVILLA, C. C. The effects of low levels of dietary phosphorus upon the dry matter intake and metabolism of lambs. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 41, p. 175-184, 1990.

UNDERWOOD, B. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. Wallingford, UK: CAB International, 1999. 614 p.

VAN HOUTERT, M. F. J.; SYKES, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, p. 1151-1167, 1996.

VITTI, D. M. S. S. et al. Avaliação da disponibilidade biológica do fósforo do fosfato bicálcico e de fosfatos de rocha para ovinos com uso do radiofósforo (^{32}P) como traçador. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 1113-1118, 1991.

VITTI, D. M. S. S.; KEBREAB, E. **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals**. London, UK: CAB International, 2010.

VITTI, D.M.S.S. et al. **The effect of phosphorus on true absorption and excretion of phosphorus in Brazilian Santa Ines sheep**. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 2008, Scarborough, UK. **Proceedings…** Penicuik, UK: BSAS, 2008.

WALKER, D. M.; AL-ALI, S. J. The endogenous phosphorus excretion of preruminant lambs. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 38, p. 1061-1069, 1987.

WILSON, W. D.; FIELD, A. C. Absorption and secretion of calcium and phosphorus in the alimentary tract of lambs infected with daily doses of *Trichostrongylus colubriformis* or *Ostertagia circumcincta* larvae. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 93, p. 6l-71, 1983.