



EFEITO DO ZINCO SOBRE *HAEMONCHUS CONTORTUS* - MORTALIDADE E EXPRESSÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA GLICOPROTEÍNA P.

Bruna Gonçalves **Santos**¹; Rodrigo **Giglioti**²; Helder **Louvandini**³; Luciana Morita **Katiki**⁴

Nº 22701

RESUMO - O Zinco (Zn) na suplementação dos animais está sendo estudado a fim de potencializar o sistema imunológico na tentativa de amenizar os problemas advindos do *Haemonchus contortus*. O objetivo do trabalho foi avaliar o Zn em diferentes concentrações e apresentações moleculares e estruturais: ZnO (Óxido de Zinco), ZnSO₄. 7H₂O (Sulfato de Zinco), ZnO 20 (Óxido de Zinco nanoparticulado a 20 micrómetros) e ZnO 40 (Óxido de Zinco nanoparticulado a 40 micrometros) em diferentes concentrações 0.5; 0.1; 0.01; 0.001 mg/mL em testes *in vitro* de eclodibilidade de ovos e motilidade de adultos de *H. contortus*. A expressão gênica da glicoproteína P-9 (PGP-9) de fêmeas adultas de *H. contortus* submetidas ao efeito direto do Zn também foi avaliada, uma vez que a PGP-9 foi associada à resistência anti-helmíntica. O ZnSO₄ apresentou CL₅₀ de 0.48 mg/mL e as demais formulações não apresentaram toxicidade no teste de eclodibilidade. No teste de motilidade não houve toxicidade para nenhuma das formulações. Todas as formulações na concentração 0,5 mg/mL apresentaram maior expressão do gene PGP-9 ($P < 0,01$). ZNO40 e ZnSO₄.7H₂O na dose 0,1 mg/mL, e ZnO na dose 0,01 mg/mL apresentaram maior expressão da PGP-9 ($P < 0,05$) comparados ao controle. Concluímos a baixa toxicidade do Zn em testes *in vitro* e que o contato direto do Zn sob fêmeas adultas de *H. contortus* resultam na maior expressão gênica da PGP-9, sugerindo indução da resistência anti-helmíntica.

Palavras-chaves: Zinco, nanotecnologia, ovinos, parasitismo, expressão gênica, glicoproteína.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UFSCar, Araras-SP; brunags@esudante.ufscar.br

2 Colaborador, Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP.

3 Colaborador, Pesquisador do CENA-USP, Piracicaba-SP.

4 Orientadora: Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP; Imkatiki@sp.gov.br.



ABSTRACT – Zinc (Zn) in animal supplementation is being studied in order to potentiate the immune system in an attempt to alleviate the problems arising from *Haemonchus contortus*. The objective of this work was to evaluate Zn in different concentrations and molecular and structural presentations: ZnO (Zinc Oxide), ZnSO₄. 7H₂O (Zinc Sulfate), ZnO 20 (Nanoparticulate Zinc Oxide at 20 micrometers) and ZnO (Nanoparticulate Zinc Oxide at 40 micrometers) in different concentrations 0.5; 0.1; 0.01; 0.001 mg/mL in in vitro tests of egg hatchability and adult motility of *H. contortus*. The gene expression of P-9 glycoprotein (PGP-9) from adult females of *H. contortus* subjected to the direct effect of Zn was also evaluated, since PGP-9 was associated with anthelmintic resistance. ZnSO₄ presented an LC₅₀ of 0.48 mg/mL and the other formulations did not show toxicity in the hatchability test. In the motility test there was no toxicity for any of the formulations. All formulations at the concentration of 0.5 mg/mL showed higher expression of the PGP-9 gene ($P < 0.01$). ZNO40 and ZnSO₄.7H₂O at a dose of 0.1 mg/mL, and macrometric ZnO at a dose of 0.01 mg/mL showed higher expression of PGP-9 ($P < 0.05$) compared to the control. We concluded the low toxicity of Zn in in vitro tests and that the direct contact of Zn with adult females of *H. contortus* results in higher gene expression of PGP-9, suggesting higher anthelmintic resistance.

Keywords: Zinc, nanotechnology, sheep, parasitism, gene expression, glycoprotein.



1. INTRODUÇÃO

Um grande desafio da produção de ovinos são as doenças parasitárias, que afetam o aparelho digestivo e a integridade fisiológica do animal. Algumas consequências dessa adversidade são a perda de peso, problemas na reprodução, redução da qualidade e quantidade de leite produzido, afetando também a qualidade da lã em alguns casos. Algumas infestações mais graves são capazes de levar animais à morte, principalmente os mais suscetíveis que são os mais jovens (QUINTAS E CARDOSO, 2012). Os ovinos normalmente são hospedeiros de parasitas, porém, a quantidade presente, depende de alguns fatores como o local em que vivem, o manejo, o clima e as próprias variações de cada organismo. Este obstáculo na produção de ovinos pode acarretar muitas perdas econômicas aos pecuaristas, tanto nos casos clínicos, quanto nos subclínicos, os quais os animais não apresentam sintomas evidentes. O parasitismo em ovinos é de difícil eliminação, e seu controle ainda necessita ser explorado (QUINTAS E CARDOSO, 2012).

Segundo Lacerda et al. (2010), para controlar as parasitoses gastrintestinais, o uso de anti-helmínticos é a alternativa mais utilizada nos rebanhos. Mas existe um contratempo nesta opção de tratamento, uma vez que, a dose usada com maior frequência e mesmo doses superiores não têm apresentado a eficácia esperada (MOLENTO, 2004, ROCCO. et al., 2012). Estudos mostram que a melhor medida profilática para o problema é a nutrição correta, pois exerce grande influência na diminuição do parasitismo. Animais que recebem dieta de alta qualidade mostram mais resistência aos sintomas causados pelos parasitos e seu organismo é capaz de limitar o desenvolvimento e estabelecimento de larvas infectantes (MELO et al., 2017), através do sistema imunológico adquirido e potencializado (MCRAE et al., 2015).

Um patógeno gastrintestinal de grande importância econômica que afeta globalmente os pequenos ruminantes é o *Haemonchus contortus*. Este parasita se tornou modelo de nematóide para estudar a resistência anti-helmíntica no tratamento das verminoses mais relevantes para a produção de ruminantes (DOYLE, TRACEY e COTTON, 2020). O nematóide *H. contortus*, é responsável pela doença de centenas de milhões de ovelhas e cabras pelo mundo, causando perdas econômicas, estimadas em dezenas de bilhões de dólares por ano. Sua alimentação se dá pelo consumo de sangue dos capilares da mucosa intestinal dos animais, resultando em complicações como gastrite hemorrágica, anemia, edemas e em alguns casos graves podem levar o animal a óbito (NIKOLAOU E GASSER, 2006).

A grande dificuldade para controlar a proliferação e desenvolvimento destes parasitas nos animais, é sua capacidade de resistência aos fármacos utilizados, cenário que prejudica a



ovinocultura em praticamente todos os países do mundo (KAPLAN & VIDYASHANKAR, 2012). Segundo Traversa e Von Samson-Himmelstjerna (2016), a ocorrência de nematóides gastrintestinais resistentes a anti-helmínticos tem crescido, e com isso, a necessidade de estudar cada vez mais o assunto para estabelecer testes padronizados que possam auxiliar na diminuição deste revés, e aprimorar os conhecimentos sobre alternativas mais eficazes na alimentação.

As glicoproteínas-P (PGP) pertencem à família dos transportadores ABC (ATP-binding cassette) que atuam na remoção de moléculas tóxicas presentes na superfície da mucosa do trato gastrintestinal do parasita e as modificações no gene que codifica esta proteína foram associadas à resistência anti-helmíntica de *H. contortus* (ALBERTS. et al., 2007, apud, MELLO, 2014). Estas modificações no gene da PgP não altera o alvo das drogas (BLACKHALL, et al. 2008, apud, MELLO, 2014), mas é capaz de reduzir a quantidade de fármacos que atinge o sítio alvo (JAMES, HUDSON e DAVEY, 2009, apud, MELLO, 2014). E estudos mostraram que grande parte dos anti-helmínticos utilizados contra *H. contortus* interagem com a PgP (KERBOEUF E GUÉGNARD, 2011, apud, MELLO, 2014).

O Zinco (Zn) é um micromineral de grande importância no organismo dos animais, pois possui papel significativo nos processos bioquímicos. A falta de Zn é responsável por problemas fisiológicos ao animal, destacando a diminuição de peso e o subdesenvolvimento neurológico e imunológico. Para Wintergerst, Maggini e Hornig (2006), existe outra complicação resultante da carência de Zn em nível celular, que é o comprometimento dos macrófagos e neutrófilos, enfraquecendo suas capacidades de fagocitose. Este mineral atua como antioxidante, é capaz de agir nas funções enzimáticas, na síntese de proteínas, no sistema de regulação hormonal e na potencialização da imunidade (CRUZ et al., 2011). Esta suplementação apresenta também redução na incidência de infecções (MAGGINI, et al. 2017). De acordo com Carciofi (2008), o sulfato de Zn (ZnSO₄) é uma das formas mais comuns a ser oferecido na nutrição dos animais.

Contudo, é preciso entender a biodisponibilidade do Zn na forma em que está sendo ofertado, pois, a nutrição com alimentos que contém o mineral, não garante sua absorção pelo sistema sanguíneo, e compromete seu uso nas funções fisiológicas do organismo. (CRUZ et al., 2011). O Zn possui baixa toxicidade, se manejado de forma correta, com doses certas, pois a ingestão de doses superiores às indicadas pode ocasionar a intoxicação, apesar de ser muito rara. Alguns sintomas deste tipo de intoxicação são diarreias, ulcerações gástricas, lesão renal, podendo afetar também o sistema imunológico negativamente (SANTOS e FONSECA, 2012). Desta forma, a nanotecnologia busca construir estruturas moleculares em escala atômica, também podendo ser definida como manejo de estruturas de 1 à 100 nanômetros que é um bilionésimo de metro



(NEVES, 2013). As nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO) são utilizadas em diversas áreas como cosméticos, alimentícios, biosensores, e até mesmo no tratamento de doenças (THEODORE, 2006). As nanopartículas podem apresentar características ampliadas, modificadas ou até mesmo novas características diferentes de sua forma habitual. Ao reduzir o tamanho da partícula, sua reatividade se eleva, pois, aumenta sua área de superfície e unidade de peso, este fator pode levar um aumento de biodisponibilidade do elemento, de modo que, esta estratégia tem sido empregada na alimentação animal, a fim de otimizar o uso dos micronutrientes (GERN, et al. 2014). Atualmente há muitos estudos sobre o efeito do Zn no organismo animal, porém há poucos estudos sobre o efeito do Zn sobre o próprio *H. contortus*.

O objetivo do trabalho foi avaliar o zinco em diferentes apresentações moleculares e estruturais: ZnO (Óxido de Zinco), ZnSO₄. 7H₂O (Sulfato de Zinco), ZnO 20 (Óxido de Zinco nanoparticulado a 20 micrómetros) e ZnO 40 (Óxido de Zinco nanoparticulado a 40 micrometros) e concentrações 1; 0.5; 0.1; 0.01; 0.001 mg/mL, em testes in vitro de eclodibilidade de ovos e motilidade de adultos de *H. contortus*. Objetivou-se avaliar também a expressão gênica da PGP-9 sobre fêmeas adultas de *H. contortus* submetidas ao efeito direto do zinco nas diferentes concentrações e formulações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local: A pesquisa foi desenvolvida no Instituto de Zootecnia (IZ) de Nova Odessa – SP, no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisa em Genética e Reprodução Animal.

2.2 Animais (Doadores de ovos): O estudo foi aprovado pela CEUA (CEUA-IZ 337-2021). Três cordeiros da raça Santa Inês de aproximadamente 18 Kg de peso corporal cada um, receberam Zolvix® (Monepantel) e Ripercol® (Levamisol), para remover os parasitas presentes. Quinze dias após os cordeiros terem recebido os fármacos, foram coletadas fezes diretamente do reto dos animais para se realizar a contagem fecal de ovos (FEC) de acordo com Ueno e Gonçalves (1998), protocolo que foi realizado para conferir se os animais estavam livres de parasitas, então, a partir deste resultado, os animais foram infectados com *H. contortus*. Os animais receberam 6.000 larvas L3 (larvas infectantes) de *H. contortus* de cepa reconhecidamente resistente (Almeida et al., 2010), de modo artificial, sendo as larvas, administradas oralmente. Diante disso, os animais foram alimentados com concentrado comercial, composto por 16% de proteína bruta (250g. / animal /

dia), feno e água *ad libitum*, oferecida em bebedouros automáticos. Após o período de 21 dias, chamado período pré-patente, os ovos de *H. contortus* foram coletados das fezes para realização dos testes in vitro.

2.3 Material teste: Foram avaliados: ZnO (Óxido de Zinco), ZnSO₄ · 7H₂O (Sulfato de Zinco), ZnO 20 (Óxido de Zinco nanoparticulado a 20 micrómetros) e ZnO 40 (Óxido de Zinco nanoparticulado a 40 micrómetros). As nanopartículas (NP) utilizadas nesse estudo foram adquiridas na forma de pó, marca MKNano e (Figura 1).

O Zn nanoparticulado foi preparado previamente por outro grupo de trabalho deste projeto. Esse material tem a capacidade de atravessar todas as barreiras digestivas, ter distribuição sanguínea e ter baixa toxicidade. As doses de Zn nanoparticulado foram quantificadas por espectrometria de massa. Diferentes concentrações desse Zn nanoparticulado foram testados sobre o *H. contortus* para se avaliar a possível atividade direta sobre o parasita.

2.4 Teste de eclosão de ovos: Foram coletadas aproximadamente 5 g. de fezes dos animais para o desenvolvimento do teste. Direcionado através da técnica exposta por Bizimenyera et al. (2006), as fezes coletadas foram levadas ao laboratório e colocadas em água para homogeneização. Posteriormente filtradas em peneiras com as seguintes medidas: 1 mm, 105 µm, 55 µm e 25 µm. Os ovos ficaram retidos na peneira de medida 25 µm, após a filtração, lavados com água destilada, e passaram por um processo de centrifugação em tubos de polietileno de 50 mL. a 3.000 RPM durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso com uma solução salina hipertônica (NaCl). A amostra foi centrifugada novamente, e então, o sobrenadante e os ovos transferidos para a peneira de 25 µm e lavados com água destilada para retirada do sal. Ocorreu então, a contagem dos ovos em 5 alíquotas de 20 µL da solução de ovos. Em torno de 100 ovos de *H. contortus* foram colocados em poços de placa de poliestireno com 48 poços, e assim, preenchidos com até 500 µL de diferentes concentrações de Zn (1; 0.5; 0.1; 0.01 e 0.001 mg/mL), em 6 repetições para cada uma delas (Figura 2). As placas foram incubadas por 24 horas a 27°C e foi utilizado um microscópio para contar os ovos não eclodidos e as larvas

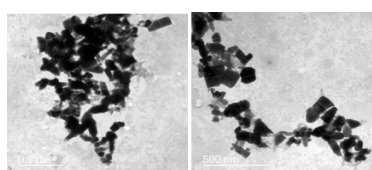


fig 1.

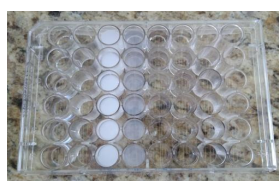


fig. 2

Figura 1. Nanopartículas de Zn **Figura 2.** Placa de poliestireno com 48 poços, contendo 6 repetições de 500uL de solução controle (água destilada) e 6 repetições para cada concentração amostra de zinco solubilizada em água.

2.5 Teste de motilidade: Dois ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus* foram eutanasiados para recuperação dos parasitas do abomaso. Os parasitas (somente fêmeas adultas) foram recuperadas uma a uma e colocadas em um meio de cultura contendo anfotericina, penicilina e estreptomicina (RPMI 1640 + 0.8% glucose + 20% soro fetal bovino + 0.25 mg/mL anfotericina + 10 U/mL penicilina + 10 mg/mL de estreptomicina + 10 nMol Hepes buffer para pH 6.8 a 37 °C). As diferentes formulações contendo zinco foram solubilizadas no meio de cultura nas concentrações 1; 0.5; 0.1; 0.01 e 0.001 mg/mL (Figura 3 e 4). Grupos de 5 fêmeas foram colocadas em 1 poço com 1 mL de meio de incubação em placas de cultivo de 48 poços. Cada concentração testada foi realizada em 6 repetições. As placas foram mantidas em estufas incubadoras em temperatura de 37 °C. A motilidade dos nematoides foi avaliada depois de 24 horas através do auxílio de uma lupa de aumento (40X) para a verificação da mobilidade e sobrevivência pela observação individual.

Os dados dos testes in vitro foram analisados para estabelecer a concentração letal que mata 50% dos ovos e concentração que mata 50% das larvas (LC50) dentro dos limites confiáveis, estimados em 95% por uma curva de regressão estabelecida pelo programa SAS® probit (SAS v. 9.2 ® Cary, NC). para classificar a atuação anti-helmíntica das diferentes formulações contendo Zn nos testes in vitro

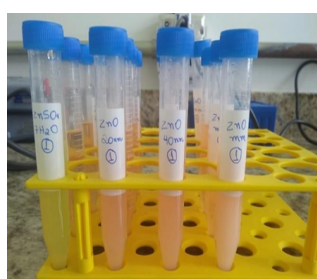


fig.3



fig 4.

Figura 3. Preparo das concentrações de Zinco solubilizadas em meio RPMI para cada tratamento. **Figura 4.** Larvas adultas de *H. contortus* sendo recuperadas e colocadas em placas de 48 poços contendo zinco solubilizado em meio RPMI em diferentes concentrações.

2.6 Expressão gênica: Para teste de expressão gênica, as amostras de RNA de 10 fêmeas adultas de *H. contortus* de cada tratamento foram extraídas usando Trizol e em seguida, foram tratadas com DNase para digestão do DNA residual, e então submetidas à síntese de cDNA. A expressão relativa do gene da PGP-9 foi analisada por meio de RT-qPCR, cujos valores de fold



change foram obtidos usando a média geométrica de três genes de referência considerados mais estáveis (GPI, GPDH e β -ACTIN). Os valores de fold change foram submetidos ao teste comparação não paramétrico Kruskal-Wallis entre os tratamentos e ao respectivo grupo controle (sem tratamento), e foram comparados usando o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados dos testes in vitro de eclodibilidade e motilidade para os diferentes tipos de formulações contendo zinco. O Zn nas mais diferentes formulações apresentou baixa toxicidade embora a dose considerada tóxica para ruminantes tenha sido relatada de 500 mg/kg da dieta segundo National Research Council (1980) e vacas de leite toleram até 1000 mg/kg na dieta (MC DOWEL, 1992). Maiores concentrações não foram testadas pelo fato de que a solução ficava muito turva o que dificultava a visualização e contagem dos parasitas nos testes. A única formulação que apresentou certa toxicidade foi o ZnSO₄ com CL50 de 0.48 mg/mL no teste de eclodibilidade (Tabela 1). Ainda assim, bem superior à dose de 150 µg/mL de ZnSO₄ que causou diminuição de atividade de bactérias celulolíticas do rúmen como observado por Eryavuz e Dehority (2009) em estudos de fermentação ruminal in vitro. No teste de motilidade não houve mortalidade para nenhuma das formulações. Inclusive após 24 horas de incubação com as formulações de Zn.

Segundo Pivoto (2014) o papel nutracêutico dos microminerais e seus efeitos em ruminantes infectados por parasitas ainda possui poucos relatos. Seu estudo demonstrou que o edetato de zinco, como outra formulação, também não reduz a carga parasitária de forma significativa, mas auxilia na redução do estresse oxidativo causado por *H. contortus* em cordeiros. Resultado de grande importância, pois, as células fagocíticas, produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) para tentativa de eliminação dos parasitas (RINALDI et al, 2007, apud, SCHAFER, 2019). Mas estas ERO não têm ação específica contra o patógeno podendo gerar lesões em células da mucosa do abomaso de cordeiros infectados por *H. contortus* (MACHADO et al, 2014, apud, SCHAFER, 2019), e o Zn tem potencial antioxidante no organismo do animal, capaz de amenizar os efeitos que estas espécies reativas de oxigênio podem causar. Em nosso estudo concluímos que o Zn também não interferiu no ciclo biológico do parasita.

Tabela 1. Resultado dos testes de eclodibilidade e motilidade



	CL 50 teste eclodibilidade				CL50 teste de motilidade
ZnO	sem toxicidade na maior concentração testada*	sem toxicidade na maior concentração testada*	na maior	na maior	sem toxicidade na maior concentração testada**
ZnO 20	sem toxicidade na maior concentração testada*	sem toxicidade na maior concentração testada*	na maior	na maior	sem toxicidade na maior concentração testada**
ZnO 40	sem toxicidade na maior concentração testada*	sem toxicidade na maior concentração testada*	na maior	na maior	sem toxicidade na maior concentração testada**
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.48 (0.25-2.49)				sem toxicidade na maior concentração testada**

*maior concentração testada no teste de eclodibilidade 1mg/mL

**maior concentração testada no teste de motilidade 0.5 mg/mL

Na maioria dos estudos já realizados, o Zn foi administrado oralmente, mas pesquisas com outros elementos mostraram que a via oral pode influenciar de forma negativa sobre os efeitos dos minerais em ovinos, uma vez que pode haver interferência pelos microrganismos ruminais (ROCHA, et al. 2013, apud, ROCHA, 2017). A partir disso, os autores mencionam que mais estudos precisam ser desenvolvidos posteriormente para determinação de doses e frequência que o Zn pode ser administrado em ovinos de maneira adequada capaz de diminuir a ocorrência da hemonose, principalmente de larvas resistente, levando em consideração as formas de administração, as formulações efetivas e se o mineral deve ser associado à algum outro componente para melhor aproveitamento. Estudos in vivo e in vitro apresentam diferenças devido a farmacocinética. Dessa forma, nosso trabalho alcançou um resultado surpreendente ao verificar a atividade direta do Zn sobre o vigor das larvas reconhecidamente resistentes aos anti-helmínticos.

Todas as formulações na concentração 0,5 mg/mL apresentaram maior expressão do gene PGP-9 e diferiram significativamente ($P < 0,01$) do grupo controle. Em concentrações menores, as formulações ZN020, ZNO40 e ZnSO₄. 7H₂O na dose 0,1 mg/mL, e o tratamento ZnO na dose 0,01 mg/mL apresentaram maior expressão da PGP-9 ($P < 0,05$) comparada ao controle (Figura 5).

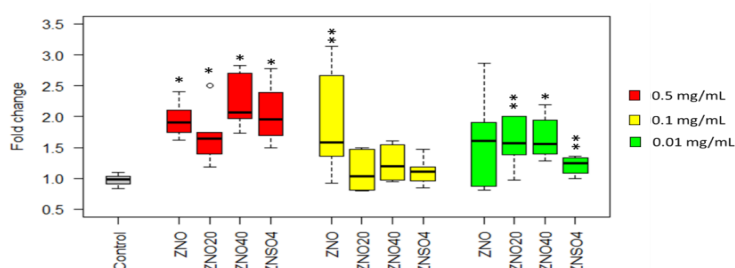




Figura 5. Média dos valores de *fold change* da expressão relativa do gene da glicoproteína 9 (Pgp-9) entre os tratamentos 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml. *difere significativamente do grupo controle ($p < 0,01$); **difere significativamente do grupo controle ($p < 0,05$).

Pesquisas antecedentes mostram que a PgP está presente em todas as fases do ciclo de vida de *H. contortus*, de ovos até adultos (XU et al., 1998; KERBOEUF et al., 2003, apud PACHECO, et al. 2022). É encontrada também na cutícula das larvas no primeiro e terceiro estágio, formando um mecanismo bioquímico de proteção durante todas as fases do desenvolvimento de *H. contortus* (RIOU et al., 2005, apud PACHECO, et al. 2022).

Gilleard e Beech (2007) demonstraram que o uso constante de ivermectina como anti-helmíntico também aumenta a resistência, outro fator existente é que o uso deste anti-helmíntico também pode modificar a frequência alélica funcionando como pressão seletiva genética.

Em síntese, neste presente trabalho, foi possível apresentar que o Zn em suas devidas formulações podem aumentar a expressão da PgP-9. Portanto, o Zn é um mineral que possui propriedades benéficas aos ovinos, mas não demonstrou eficácia significativa para combate ao parasito estudado.

4. CONCLUSÃO

Os compostos testados na presente pesquisa apresentaram baixa toxicidade para *H. contortus* em testes de eclodibilidade e motilidade. Apresentaram-se com melhor viabilidade e mais motilidade do que os parasitas do grupo controle. O Zn não causa mortalidade do *H. contortus* através de contato direto como pôde ser observado nos testes *in vitro*.

Já os resultados obtidos no teste genético, foi possível observar que o contato direto do Zn sob fêmeas adultas de *H. contortus* resultam na maior expressão gênica da PGP-9, sugerindo que esse composto possa estar associado e/ou contribuir para a maior resistência anti-helmíntica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha família e meu noivo por todo apoio. À minha orientadora e demais pesquisadores do Instituto de Zootecnia por tanto conhecimento compartilhado comigo. Ao CNPq pela bolsa concedida. À FAPESP **2019/26042-8** pela oportunidade de participação no trabalho.



REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitol. Int.** 59, 622–5. 2010.
- CRUZ, F. et al. Uma revisão sobre o zinco. **Ensaio e ciência: ciências biológicas, agrárias e da saúde, campo grande**, MS, v. 15, n. 1, p. 207-222, 2011.
- DOYLE, S. R.; TRACEY, A.; COTTON, J. A. Genomic and transcriptomic variation defines the chromosome-scale assembly of *haemonchus contortus*, a model gastrointestinal worm. **Communications biology**. Nov. 2020.
- ERYAVUZ, A.; DEHORITY, B. A. Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers in vitro. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 151. Issues 3-4. p. 175-183. 2009.
- GERN, J. C. et al. Aplicação da nanotecnologia na pecuária e suas implicações no bem-estar animal. **III congresso brasileiro de bioética e bem-estar animal**. Curitiba, p. 134-137, 2014.
- Gilleard, J.S., Beech, R.N. Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. **Parasitology** **134**, 1133–1147. 2007.
- KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, N. A. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Vet parasitol** 2012; 186(1-2): 70-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>.
- LACERDA, M. J. R. et al. 2010. Routes of applying closantel as a gastrointestinal anthelmintic in sheep. **Archivos latinoamericanos de producción animal**, 17, 55-59. MAGGINI, S. et al. Vitaminas C, D e zinco: papéis sinérgicos na função imunológica e infecções. *Vitam miner.* 2017 , 6 , 167.
- MCDOWELL, L. R.; CUNHA, T. J. Zinc. (Ed.) Minerals in Animal and Human Nutrition, **Academic Press Inc. San Diego**, CA, USA. p. 265-293. 1992.
- MCRAE, K. M. et al. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. **Parasite immunology**, v. 37, p. 605 - 613, 2015.
- MELO, G. K. A. et al. Effect of creep-fed supplement on the susceptibility of pasture-grazed suckling lambs to gastrointestinal helminths. **Veterinary parasitology**, v. 239, p. 26 – 30, 2017.
- MELLO, S. S. **Associação entre polimorfismos no gene da glicoproteína-P (PgP) e resistência múltipla a anti-helmíntico em Haemonchus contortus e identificação de fatores de risco relacionados**. 69 f. Tese (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, SP. 2014.
- MOLENTO, M. B. et al. Método famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência rural**, 34, 1139- 1145. 2004.
- National Research Council Mineral Tolerance of Domestic Animals. **National Academy of Sciences**, Washington, DC, USA. 1980.
- NEVES, A. L. D. P. Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana. **Universidade Federal de Santa Catarina**. Tese de doutorado. Florianópolis, 2013.
- NIKOLAOU, S.; GASSER, R. B. Prospects for explorar processos de desenvolvimento molecular em *haemonchus contortus* . **Int j parasitol.** 36: 859-868. 2006.



PACHECO, P. A. et al. Phytochemical modulation of P-Glycoprotein and its gene expression in an ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* isolate in vitro. **Veterinary Parasitology**. 305. São Paulo. 2022.

PIVOTO, F. L. PERFIL OXIDATIVO DE CORDEIROS INFECTADOS POR *Haemonchus contortus* E TRATADOS COM EDETATO DE ZINCO. **Universidade Federal de Santa Maria**. Dissertação de Mestrado. Santa Maria - RS. 2014.

QUINTAS, H; CARDOSO, L. (ed.) MENDONÇA, A. Guia sanitário para criadores de pequenos ruminantes. Bragança: instituto politécnico. Isbn 978-972-745-137-1. ROCCO, V. V. B. et al. 2012. Diferentes princípios ativos no controle de helmintos gastrintestinais em ovinos. **Global science and technology**, 5, 194-200. 2012.

ROCHA, J. F. X. Metabolismo do edetato de zinco em cordeiros e seu efeito metafilático em variáveis metabólicas e oxidativas de ovelhas no pós-parto. **Universidade Federal de Santa Maria**. Tese de doutorado. Santa Maria - RS. 2017.

SANTOS, C.; FONSECA, J. Zinco: fisiopatologia, clínica e nutrição. **APNEP, Hospital Garcia de Orta, EPE**. Vol. Vi – n.º 1 – julho 2012.

SANTOS, N. S. Efeitos das nanopartículas de óxido de zinco (NPs Zno) em alguns aspectos da sobrevivência, reprodução e desenvolvimento de *biomphalaria glabrata* (say, 1818) (gastropoda: pulmonata). 2020. Dissertação de Mestrado, **Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde**, Rio de Janeiro, 2020.

SCHAFER, A. S. Óxido de cobre associado ao closantel em ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus*: metabolismo oxidativo, hepático e imunológico. **Universidade Federal de Santa Maria**. Tese de Doutorado. Santa Maria - RS. 2019.

THEODORE, L. Nanotechnology: basic calculations for engineers and scientists. **Wiley, hoboken** 3. 2006.

TOLEDO, C. S. S.; GIL, C. C.; MARQUES, M. A. P.. Estudo preliminar da sensibilidade do ouriço *lytechinus variegatus* à substâncias de referência: comparação de duas populações da zona costeira da cidade de Niterói – RJ. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso – **Escola de Engenharia – Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2019.

TRAVERSA, D.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Anthelmintic resistance in sheep gastro-intestinal strongyles in europe. **Small rumin res**; 135: 75-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.014>. 2016.

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

WINTERGERST, S. E.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Immune-reforço papel da vitamina C e zinco e efeito em condições clínicas. **Ann. Nutr. Metab.** 50 , 85–94. 2006.