



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA DE MEDICAMENTOS
CONVENCIONAL E HOMEOPÁTICOS SOBRE *Trichostrongylus*
colubriformis EM COELHOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE**

HELAÍNE HADDAD SIMÕES MACHADO

Sob a Orientação do Professor
Argemiro Sanavria

e Co-orientação do Professor
Gilberto Brasil Lignon

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Magister**
Scientiae em Medicina Veterinária, Área
de Concentração em Medicina Veterinária
Preventiva

Seropédica, RJ
Dezembro de 2003

636.93208969654
M132e
T

Machado, Helaíne Haddad Simões, 1975-
Eficácia anti-helmíntica de medicamentos
convencional e homeopáticos sobre
Trichostrongylus colubriformis em coelhos
infectados experimentalmente/Helaíne Haddad
Simões Machado. - 2003.
55f. : il.(color)., grafs., tabs.

Orientador: Argemiro Sanavria.
Dissertação (Mestrado) Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de
Veterinária.
Inclui bibliografia.

1. Anti-helmínticos - Teses. 2. Homeopatia
veterinária - Teses. 3. Coelho - Doenças
parasitárias - Controle - Teses. 3.
Trichostrongylus colubriformis - Teses. I.
Sanavria, Argemiro, 1949-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de
Veterinária.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

HELAÍNE HADDAD SIMÕES MACHADO

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em Medicina Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10/12/2003



Argemiro Sanavria. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)



Adivaldo Henrique da Fonseca. Ph.D. UFRRJ



Heloisa Maria Kreling da Silva. Ph.D. FAA-CESVA

DEDICATÓRIA

“O ser humano vivencia a si mesmo como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

Dedico este trabalho a minha querida Moana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ pela oportunidade de realizar este trabalho e vivenciar tamanho aprendizado e enriquecimento profissional. Agradeço, portanto, à sua Coordenação, em especial à Professora Marta Fernanda Albuquerque da Silva (IV/UFRRJ), a todo o seu Corpo Docente e a todos os meus Colegas de Turma.

Aos Professores Argemiro Sanavria (IV/UFRRJ) e Gilberto Brasil Lignon (EMBRAPA) pela orientação e, mais do que isto, por mostrar-me os caminhos surpreendentes pelos quais a pesquisa científica é capaz de conduzir-nos. Agradeço também pela oportunidade e confiança.

Aos Animais que participaram deste trabalho.

Ao Professor Luiz Figueira Pinto (IHB/IV/UFRRJ) por todos os valiosos esclarecimentos em homeopatia.

Ao Professor Hélcio Resende Borba (IV/UFRRJ) pelas sugestões sobre a metodologia na fase inicial do projeto.

Ao Professor Adivaldo Henrique da Fonseca e ao Técnico Luiz Carlos Ribeiro da Paz (IV/UFRRJ) pelos valiosos ensinamentos a respeito de técnicas laboratoriais.

Ao Sr. Otacilio José Domingos (IV/UFRRJ) pela atenção e dedicação aos serviços institucionais.

A Professora Maria Angélica Vieira da Costa Pereira (LSA/CCTA/UENF) por todas as sugestões e incentivo.

Aos Professores Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira e Olney Vieira da Motta por toda ajuda.

Aos Professores Cláudio Baptista de Carvalho e Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho (LSA/CCTA/UENF) pelo apoio constante e pela compreensão e a todos os funcionários e pesquisadores do Laboratório de Sanidade Animal (LSA/UENF) que participaram direta ou indiretamente do trabalho.

Ao Professor Edenio Detmann (LEAG/CCTA/UENF) pela grande e fundamental ajuda nas análises estatísticas.

Ao Professor Clóvis de Paula Santos e ao Técnico Sérgio Rangel Braga (LBCT/CBB/UENF) pelo auxílio nas morfometrias.

Ao Professor Fábio Cunha Coelho (LFIT/CCTA/UENF) e ao Médico Veterinário Homeopata Ricardo José Bottechia pelas sugestões bibliográficas.

As Pós-graduandas Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos e Lio Moreira (LSA/CCTA/UENF) pelo auxílio nas fotografias.

Ao Técnico de Nível Superior Cláudio Teixeira Lombardi (LZNA/CCTA/UENF) pela colaboração nas avaliações dos parâmetros zootécnicos.

À Estagiária do LSA/UENF Cinthia Lopes Schiffler, por toda a dedicação oferecida aos cuidados com os animais e também nas análises laboratoriais.

Aos Amigos Isabel Cristina Fábregas Bonna e Francimar Fernandes Gomes pelo companheirismo e incentivo.

Aos Meus Pais José Renato Simões Machado e Fátima Haddad Simões Machado, Irmãos Tiago Haddad Simões Machado e Renato Haddad Simões Machado e demais familiares que sempre estiveram do meu lado.

Ao Meu Querido Reginaldo da Silva Alves, por tudo.

BIOGRAFIA

Helaíne Haddad Simões Machado nasceu em 1975 na cidade de Itajubá, MG.

Cursou o Ensino Médio no Colégio Marista São José – Unidade Tijuca, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

No ano de 1995 iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, tendo se graduado no ano de 2000.

Ainda em 2000, ingressou no Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* de Formação de Especialista em Homeopatia para Médicos Veterinários do Instituto Hahnemanniano do Brasil (IHB), Rio de Janeiro, RJ.

Durante o ano de 2001, estagiou no Setor de Clínica Médica do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsmann (IMMVJV) da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro.

Ao final de 2001, tornou-se especialista em Homeopatia Veterinária.

Neste mesmo ano foi aprovada em Concurso Público para o Cargo de Médico Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), onde ingressou em Junho de 2002.

Em março de 2002, ingressou no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Atualmente trabalha no Setor de Doenças Infecto-contagiosas e Parasitárias do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF, em Campos dos Goytacazes, RJ.

SUMARIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	01
RESUMO.....	03
ABSTRACT	04
 CAPÍTULO I - Avaliação do Parasitismo por <i>Trichostrongylus colubriformis</i> em Coelhos Infectados Experimentalmente	 05
1 INTRODUÇÃO	06
RESUMO.....	07
ABSTRACT	08
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	09
2.1 <i>Trichostrongylus colubriformis</i> (GILES, 1892) - Sistemática e Aspectos Biológicos	09
2.2 Infecção Experimental de <i>T. colubriformis</i> em Coelhos	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Localização do Experimento	12
3.2 Animais e Manejo.....	12
3.3 Obtenção do Inóculo e Infecção Experimental	12
3.4 Aspectos Parasitários, Clínicos e Zootécnicos	13
3.5 Procedimentos de Identificação e Contagens	13
3.6 Delineamento Experimental	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Animais Doadores	15
4.2 Morfologia.....	15
4.3 Aspectos Clínicos e Zootécnicos	18
4.4 Aspectos Parasitários.....	18
5 CONCLUSÕES.....	22
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
 CAPÍTULO II - Eficácia Anti-helmíntica da Doramectina e dos Nosódios <i>Trichostrongylus colubriformis</i> 30CH e Fator Vermes® sobre <i>Trichostrongylus colubriformis</i> em Coelhos	 27

1 INTRODUÇÃO	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT	30
2 REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 <i>Controle Medicamentoso da Tricostongilose.....</i>	31
2.2 <i>Medicamentos Homeopáticos.....</i>	32
2.3 <i>Métodos de Testes de Eficácia Anti-helmíntica para Nematódeos.....</i>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 <i>Localização do Experimento</i>	35
3.2 <i>Animais e Manejo</i>	35
3.3 <i>Infecção Experimental.....</i>	36
3.4 <i>Medicamentos Homeopáticos e Padrão de Referência.....</i>	37
3.5 <i>Parâmetros Avaliados.....</i>	37
3.6 <i>Delineamento Experimental e Cálculo da Eficácia</i>	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 <i>Avaliação da Atividade da Doramectina.....</i>	39
4.1.1 <i>Aspectos Clínicos e Zootécnicos</i>	39
4.1.2 <i>Aspectos Parasitários.....</i>	39
4.1.3 <i>Eficácia.....</i>	40
4.2 <i>Avaliação da Atividade do Nosódio Trichostrongylus colubriformis 30CH</i>	40
4.2.1 <i>Aspectos Clínicos e Zootécnicos</i>	40
4.2.2 <i>Aspectos Parasitários.....</i>	41
4.2.3 <i>Eficácia.....</i>	44
4.3 <i>Avaliação da Atividade do Nosódio Fator Vermes®.....</i>	44
4.3.1 <i>Aspectos Clínicos e Zootécnicos</i>	44
4.3.2 <i>Aspectos Parasitários.....</i>	45
4.3.3 <i>Eficácia.....</i>	48
5 CONCLUSÕES.....	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7 ANEXO	54

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I - Avaliação do Parasitismo por <i>Trichostrongylus colubriformis</i> em Coelhos Infectados Experimentalmente	
Tabela 1 Medidas de formas de <i>Trichostrongylus colubriformis</i> obtidos de coelhos através de exame coproparasitológico, coprocultura e necropsia, a partir de infecção experimental com 3×10^3 larvas infectantes, por via oral.....	16
Tabela 2 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM-g/dia), consumo de matéria seca (CMS-g/dia) e conversão alimentar (CA-g/g), de acordo com os grupos de animais infectados e não infectados.....	18
Tabela 3 Período pré-patente, estimativa do número de ovos por grama de fezes e do número total de ovos diários eliminados por cada coelho infectado, de acordo com o sexo.....	19
Tabela 4 Números de larvas infectantes, de nematódeos adultos e sua relação (%) com a dose infectante de 3×10^3 L ₃ e ovos no útero de espécimes obtidas dos coelhos experimentalmente infectados.....	21
 CAPÍTULO II - Eficácia Anti-helmíntica da Doramectina e dos Nosódios <i>Trichostrongylus colubriformis</i> 30CH e Fator Vermes® sobre <i>Trichostrongylus colubriformis</i> em Coelhos	
Tabela 1 Distribuição dos grupos de coelhos tratados e controles.....	36
Tabela 2 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM - g/dia), consumo de matéria seca (CMS - g/dia) e conversão alimentar (CA - g/g), de acordo com os diferentes tratamentos.....	39
Tabela 3 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis peso vivo final (PVF) e peso de carcaça (PC), de acordo com os diferentes tratamentos....	39
Tabela 4 Médias das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais infectados (I) e infectados e tratados com doramectina (ITD).....	40
Tabela 5 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM - g/dia), consumo de matéria seca (CMS - g/dia) e conversão alimentar (CA - g/g), de acordo com os diferentes tratamentos.....	40
Tabela 6 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis peso vivo final (PVF) e peso de carcaça (PC), de acordo com os diferentes tratamentos....	41
Tabela 7 Período pré-patente (PPP) e contagem de ovos por grama de fezes dos animais infectados (I), e infectados e tratados com <i>Trichostrongylus colubriformis</i> 30CH (ITTc).....	42
Tabela 8 População estimada de nematódeos machos, de nematódeos fêmeas e população global, obtidas nos coelhos infectados, e sua relação (%) com a dose infectante de 3×10^3 L ₃	43

Tabela 9 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis número de larvas infectantes obtidas sete dias após medicação (Larvas); população de nematódeos machos à necropsia (Machos); população de nematódeos fêmeas à necropsia (Fêmeas); população global (Total) e número de ovos no útero (Ovos).....	44
Tabela 10 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM - g/dia), consumo de matéria seca (CMS - g/dia) e conversão alimentar (CA - g/g), de acordo com os diferentes tratamentos.....	45
Tabela 11 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis peso vivo final (PVF) e peso de carcaça (PC), de acordo com os diferentes tratamentos....	45
Tabela 12 Período pré-patente (PPP) e contagem de ovos por grama de fezes dos coelhos infectados (I), e infectados e tratados com Fator Vermes® (ITFV)..	46
Tabela 13 População estimada de nematódeos machos, de nematódeos fêmeas e população global, obtidas nos coelhos infectados, e sua relação (%) com a dose infectante de 3×10^3 L3.....	47
Tabela 14 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis número de larvas infectantes obtidas sete dias após medicação (Larvas); população de nematódeos machos à necropsia (Machos); população de nematódeos fêmeas à necropsia (Fêmeas); população global (Total) e número de ovos no útero (Ovos).....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
 CAPÍTULO I - Avaliação do Parasitismo por <i>Trichostrongylus colubriformis</i> em Coelhos Infectados Experimentalmente	
Figura 1 <i>Trichostrongylus colubriformis</i> A) Ovo. B) Larva infectante. C) Ovejeter em fêmea. D) Bolsa copulatória permitindo visualização dos espículos, simétricos e em forma de ponta de arpão, e do gubernáculo em macho.....	17
 CAPÍTULO II - Eficácia Anti-helmíntica da Doramectina e dos Nosódios <i>Trichostrongylus colubriformis</i> 30CH e Fator Vermes® sobre <i>Trichostrongylus colubriformis</i> em Coelhos	
Figura 1 Comportamento descritivo para o logaritmo natural da contagem fecal de ovos (OPG) (ln ovos/grama de fezes), de acordo com os diferentes tratamentos, sendo os momentos das avaliações referentes a 21, 22 e 27 dias após a infecção.....	42
Figura 2 Comportamento descritivo para o logaritmo natural da contagem fecal de ovos (OPG) (ln ovos/grama de fezes), de acordo com os diferentes tratamentos, sendo os momentos das avaliações referentes a 21, 22 e 27 dias após a infecção.....	46

INTRODUÇÃO GERAL

O parasitismo gastrointestinal constitui, de modo geral, um problema importante para a pecuária brasileira, culminando em prejuízos sócio-econômicos pela redução ou incapacidade produtiva dos animais acometidos, e pelos surtos clínicos, principalmente, nos animais jovens.

Observam-se gastos significativos com a compra de anti-helmínticos cada vez mais modernos, formulados para superar, a cada dia, a seleção de resistência de helmintos. Tal resistência decorre do uso indiscriminado de bases medicamentosas eficazes. Portanto, estudos epidemiológicos e pesquisas sobre formas alternativas de controle de nematódeos contribuem para a sanidade animal e conseqüentemente para a produção de alimentos e para a saúde pública (ECHEVARRIA *et al.*, 1996; WALLER *et al.*, 1996).

A preocupação com efeitos nocivos ao meio ambiente causados por parasitoides convencionais constitui outro importante incentivo para pesquisas sobre formas de controle integrado e novas alternativas (SUNDRUM, 2001). Como exemplo disso, um estudo avaliando os efeitos do uso de doses terapêuticas de drogas anti-helmínticas sobre a decomposição de fezes de ruminantes demonstrou que os resíduos de ivermectina e doramectina excretados são capazes de afetar as populações de coleópteros, de nematódeos de vida livre e a matéria orgânica da pastagem (SUAREZ, 2002). Os coleópteros desempenham papel importante no controle da infestação das pastagens por larvas de nematódeos gastrointestinais, por promoverem a fragmentação e o enterro das massas fecais. A menor atividade desses insetos pode colaborar para que as massas fecais funcionem como reservatório dos ovos e das larvas (GASTALDI *et al.*, 2001).

Por conta destes e de outros motivos, observa-se atualmente, no mundo, a expansão da agropecuária orgânica ou ecológica - sistema de produção originado na Europa – o que reflete o crescimento da consciência sobre a preservação do meio ambiente. Esse sistema visa prevenir impactos ambientais e o comprometimento de gerações futuras, conseqüentes da intensificação da produção agropecuária, preconizando a adoção de tecnologias que otimizem o uso de recursos naturais, maximizem os benefícios sociais e eliminem o emprego de insumos artificiais tóxicos capazes de poluir o meio ou que representem risco à saúde pública por meio de resíduos alimentares.

O sistema orgânico busca, portanto, o decréscimo do uso de substâncias químicas no controle de endoparasitoses. Para isso, formas alternativas de tratamento, que representem opções menos onerosas para os pequenos produtores devem ser melhor avaliadas.

Com a crescente demanda de produtos alimentícios dessa natureza, tem-se observado expansão na atuação de médicos veterinários homeopatas e boa aceitação dessa abordagem terapêutica por produtores.

A utilização da homeopatia é preconizada para a certificação da produção orgânica (TURRA, 1999), considerando-se seu baixo custo, facilidade de administração, menor estresse para os animais, ausência de resíduos e menores riscos de intoxicação para os manipuladores. Entretanto, sua eficácia remete a questionamentos, devido a resultados conflitantes e limitado conhecimento sobre seus efeitos específicos (BIOLCHINI, 1995; CABARET, 1996).

A eficácia anti-helmíntica de um medicamento pode ser influenciada por diversos fatores, como nutrição, idade, origem genética dos animais, contaminação ambiental e reinfecção, subdoses do medicamento, falhas na administração, desenvolvimento de larvas hipobióticas não eliminadas pelo tratamento e infecções concomitantes. Portanto, para inferir sobre a eficácia de determinado tratamento é necessário a realização de testes

específicos, *in vivo*, onde se controle a origem e a idade dos animais, o manejo, o ambiente e a infecção (VIEIRA & CAVALCANTE, 1998).

A escolha do coelho como modelo experimental para este trabalho deveu-se à sua susceptibilidade a alguns nematódeos gastrintestinais de ruminantes, como o *Trichostrongylus colubriformis*, e às facilidades de aquisição, alimentação, espaço para o manejo e custo reduzido.

Constituem os objetivos deste estudo avaliar alguns aspectos parasitários e clínicos da infecção experimental de *Trichostrongylus colubriformis* oriundos de ovinos em coelhos, bem como testar a eficácia anti-helmíntica da doramectina e dos medicamentos homeopáticos *Trichostrongylus colubriformis* 30CH e Fator Vermes® sobre este nematódeo.

RESUMO

MACHADO, Helaine Haddad Simões. **Eficácia anti-helmíntica de medicamentos convencional e homeopáticos sobre *Trichostrongylus colubrifomis* em coelhos infectados experimentalmente**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 55p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva).

O uso indiscriminado de bases anti-helmínticas em animais de produção vem colaborando para seleção de cepas resistentes, efeitos nocivos ao meio ambiente e resíduos alimentares. Observa-se a expansão de novas alternativas de controle, como a homeopatia, em sistemas de produção agroecológica. Isto torna sua avaliação importante pois é limitado o conhecimento científico sobre seus efeitos específicos. A infecção experimental de *T. colubrifomis* (Nematoda: Trichostrongyloidea) em coelho vem sendo realizada com êxito, tornando esse modelo adequado para testes preliminares de eficácia anti-helmíntica. Com o objetivo de avaliar sua eficácia sobre a remoção de *T. colubrifomis* em coelhos, foram testados os nosódios *Trichostrongylus colubrifomis* 30CH e Fator Vermes® e o medicamento convencional Doramectina como padrão de referência. 35 coelhos jovens da raça Nova Zelândia foram utilizados para a avaliação do parasitismo e para o teste controlado. Primeiramente, formas infectantes do nematódeo, obtidas por coprocultura de cepa de ovinos foram inoculadas na dose estimada de 3×10^3 larvas, via oral, em cinco coelhos, para a multiplicação do nematódeo. Em seguida, 30 animais foram distribuídos, sob delineamento em blocos casualizados, em cinco grupos de seis, os quais receberam os tratamentos NI (Não-Infectados), I (Infectados), ITTc (Infectados e Tratados com *Trichostrongylus colubrifomis* 30CH), ITFV (Infectados e Tratados com Fator Vermes®) e ITD (Infectados e Tratados com a Doramectina - Dectomax®). Para a infecção, utilizou-se a mesma dose média de 3×10^3 larvas. Parâmetros clínicos, ganho de peso, consumo de ração e resultados coproparasitológicos foram registrados. Os animais infectados foram necropsiados, com registro dos pesos de carcaça. Procedeu-se, então, a sexagem e a contagem dos parasitas no intestino delgado e a contagem de ovos no útero de fêmeas. Os dados foram submetidos à análise de variância e testes de comparação de médias ($P < 0,05$). O período pré-patente variou de 18 a 20 dias. Não houve observação de sinais clínicos da infecção. Foi observado que os nosódios testados influenciaram a população parasitária global ($P = 0,0049$; $P < 0,05$), de machos ($P = 0,0007$; $P < 0,05$) e de fêmeas ($P = 0,0345$; $P < 0,05$). Os tratamentos ITTc e ITFV apresentaram eficácia média na remoção do parasita de 36,65% e 18,64%, respectivamente, enquanto o tratamento ITD apresentou 100% de eficácia. Não houve diferença entre sexos nos animais. Não houve efeito dos tratamentos sobre número de ovos no útero de fêmeas do nematódeo ($P = 0,0809$; $P > 0,05$), bem como sobre número de larvas obtidas das fezes dos animais infectados ($P = 0,9077$; $P > 0,05$), peso vivo final ($P = 0,2301$; $P > 0,05$) e peso de carcaça ($P = 0,2338$; $P > 0,05$). Também não houve diferença significativa para as variáveis ganho de peso médio, consumo de matéria seca e conversão alimentar. Concluiu-se que os produtos *Trichostrongylus colubrifomis* 30CH e Fator Vermes®, segundo o protocolo deste experimento, atuaram na remoção parasitária. Entretanto, sugere-se que novos estudos devem ser conduzidos aumentando-se o período de tempo de avaliação em modelo experimental.

Palavras-chave: *Trichostrongylus colubrifomis*, homeopatia, doramectina, anti-helmíntico

ABSTRACT

MACHADO, Helaine Haddad Simões. **Anthelmintic efficacy of conventional and homeopathic products on *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected rabbits**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 55p. (Dissertation, Master's degree in Veterinary Medicine, Preventive Veterinary Medicine).

The indiscriminate use of anthelmintic bases in production animals is collaborating for selection of resistant strains, noxious effects to the environment and alimentary residues. The expansion of new control alternatives is observed, as the homeopathy, in systems of ecological production. This turns its important evaluation because the scientific knowledge is limited on their specific effects. The experimental infection of *T. colubriformis* (Nematoda: Trichostrongyloidea) in rabbit it has been accomplished with success turning that appropriate model for preliminary tests of anthelmintic effectiveness. With the objective of evaluating the effectiveness about the removal of *T. colubriformis* in rabbits, were tested the nosodes *Trichostrongylus colubriformis* 30CH and Fator Vermes® and conventional product Doramectin for reference pattern. Thirty five young New Zealand rabbits were utilized for the evaluation of parasitism and the controlled test. Firstly, infective forms of *T. colubriformis*, obtained by faeces culture of sheep strain, were inoculated, orally, in five rabbits, for the multiplication of the nematode, in average dose of 3×10^3 larvae suspended in distilled water. To follow, thirty rabbits were distributed, through casualized block, in five groups of six, which received the treatments NI (No Infected), I (Infected), ITTc (Infected and Treated with *Trichostrongylus colubriformis* 30CH), ITFV (Infected and Treated with Fator Vermes e) and ITD (Infected and Treated with Doramectin - Dectomax®). Average dose of 3×10^3 larvae too was used for this infection. Clinical parameters, weight gain, alimentary consumption and coproparasitological results were reported. The infected animals were necropsied, obtaining the carcass weights. It proceeded, then, the sex separation and the counting of parasites in small intestine and the counting of eggs in uterus of females. The data were submitted to analysis of variance and to tests for averages comparison ($P < 0,05$). The pre-patent period varied from 18 to 20 days. There was not observation of clinical signs of the infection. It was shown that the nosodes were capable to influence the global parasitic population ($P=0,0049$; $P < 0,05$), of males ($P=0,0007$; $P < 0,05$) and of females ($P=0,0345$; $P < 0,05$). The treatments ITTc and ITFV presented medium effectiveness in the removal of the parasite of 36,65% and 18,64%, respectively, while the treatment ITD presented 100% of effectiveness. There was no difference among the sexes of the rabbits. There was not effect of treatments on number of eggs in uterus of females of the nematode ($P=0,0809$; $P > 0,05$), as well as on number of obtained larvae of the faeces of infected animals ($P=0,9077$; $P > 0,05$), final weight ($P=0,2301$; $P > 0,05$) and carcass weight ($P=0,2338$; $P > 0,05$). Also was not relative effect to the evaluated treatments in the weight gain, dry matter consumption and alimentary conversion variables. It was ended that products *Trichostrongylus colubriformis* 30CH and Fator Vermes®, according to the protocol used in this experiment, acted in parasitic remission. However, it suggests that new studies should be driven increasing the medication period in experimental model.

Key words: *Trichostrongylus colubriformis*, homeopathy, doramectin, anthelmintic.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DO PARASITISMO POR *Trichostrongylus colubriformis* EM COELHOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Trichostrongylus colubriformis* é conhecida por parasitar naturalmente o trato digestivo de ruminantes, principalmente ovinos e caprinos, provocando danos à saúde e perdas econômicas. A observação e caracterização morfológica de ovos encontrados nas fezes, de larvas obtidas por coprocultura e de adultos recuperados à necropsia confirmam a presença do parasitismo.

A infecção experimental em animais de laboratório utilizando esse nematódeo vem sendo realizada para estudos em helmintologia e testes de eficácia anti-helmíntica. Gerbis (*Meriones unguiculatus*) (CONDER *et al.*, 1991) e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (GRATION *et al.*, 1992) já foram utilizados com sucesso, porém, com a necessidade de indução de imunossupressão prévia.

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é citado como bom modelo para infecções experimentais com helmintos desde a década de 30 com o trabalho de ORTLEPP (1939) e apresenta como vantagens a adaptação de alguns nematódeos de ruminantes, facilidades de aquisição e baixo custo de manutenção, além de adaptação ao cativeiro, precocidade e prole numerosa (ANDRADE, 1994).

CAUTHEN (1958), trabalhando com *Trichostrongylus azei* e utilizando o coelho como modelo, concluiu que não se trata de um modelo satisfatório. KIRSCH (1973), reporta que o sistema coelho - 7'. *colubriformis* não se sustenta devido à grande variação encontrada na eliminação de ovos nas fezes e à rápida eliminação dos nematódeos. Porém, êxitos em infecções experimentais, mais recentes, com larvas de 7'. *colubriformis* são freqüentes. Colaboraram para o conhecimento da interação deste nematódeo com o coelho PURVIS E SEWELL (1972), HERLICH (1976), HOPIUNS (1979), COUTINHO (1983), HOSTE *et al.* (1995), entre outros.

Este estudo teve por objetivo avaliar alguns aspectos parasitários, clínicos e zootécnicos da infecção experimental de *Trichostrongylus colubriformis* em coelhos, contribuindo assim para o conhecimento do parasitismo por este nematódeo.

RESUMO

MACHADO, Helaine Haddad Simões. **Avaliação do parasitismo por *Trichostrongylus colubriformis* em coelhos infectados experimentalmente**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 55p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva).

Dezessete coelhos Nova Zelândia tipo carne foram utilizados com a finalidade de se avaliar o parasitismo mediante infecção experimental por *Trichostrongylus colubriformis*. Cinco animais foram inoculados, por via oral, com a dose média de 3×10^3 larvas infectantes obtidas de cepa do nematódeo oriundas de ovinos da Região de Campos dos Goytacazes, RJ. Após a comprovação da ação parasitária sobre o hospedeiro com a obtenção de ovos nas fezes realizou-se coprocultura e as larvas extraídas constituíram o inóculo para a infecção de outros seis animais. Os demais coelhos compuseram o grupo controle. Peso, consumo diário de matéria seca, comportamento e resultados coproparasitológicos foram avaliados para os doze animais. O período pré-patente variou entre 18 e 20 dias. A contagem média de ovos por grama de fezes foi de 467 ± 98 aos 22 dias e de 375 ± 69 aos 28 dias após a infecção. A relação com a dose infectante de nematódeos adultos, recuperados dos animais infectados à necropsia, variou entre 16,00 e 32,33%. O número de nematódeos fêmeas obtido foi maior em relação ao de machos. Aspectos morfométricos dos ovos, larvas infectantes e adultos obtidos dos coelhos foram avaliados. O sexo dos coelhos não influenciou nos resultados da infecção. O parasitismo não produziu alteração significativa (teste F, $P > 0,05$) no consumo de matéria seca, ganho de peso e conversão alimentar que representasse importância econômica, durante o período experimental. Demais alterações clínicas também não foram observadas. Perante os resultados deste estudo, pode-se inferir que o coelho confirmou-se como modelo laboratorial adequado para a multiplicação de *Trichostrongylus colubriformis* obtidos de ovinos, comprovando a adaptação do nematódeo a este hospedeiro, o coelho.

Palavras chave: *Trichostrongylus colubriformis*, coelho, infecção experimental, parasitismo.

ABSTRACT

MACHADO, Helaíne Haddad Simões. **Evaluation of parasitism by *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected rabbits.** Seropédica: UFRRJ, 2003. 55p. (Dissertation, Master's degree in Veterinary Medicine, Preventive Veterinary Medicine).

Seventeen New Zealand meat type rabbits were used with the purpose of evaluated the parasitism through experimental infection by *Trichostrongylus colubriformis*. Five animals were inoculated, orally, with medium dose of 3×10^3 infective larvae obtained from strain of the nematode arised from sheep of Campos dos Goytacazes, RJ. After the proof of the parasitic action on the host with the eggs in the faeces took place culture of faeces and the extracted larvae constituted the inocule for the infection to other six animals. The other rabbits composed the control group. Weight, daily dry matter consumption, behavior and coproparasitological results were evaluated for twelve animals. The pre-patent period varied between 18 and 20 days. The average counting of eggs per gram of faeces was from 467 ± 98 to 22 days and 375 ± 69 to 28 days after the infection. The relationship for the infective dose and adults nematodes recovered from the animals infected to necropsy, varied between 16,00 and 32,33%. The number of female nematodes obtained was bigger in relation to males. Measurements of eggs, infective larvae and adults obtained from rabbits were evaluated. The rabbits's sex didn't influence in the infection results. The parasitism didn't produce significant alteration (test F, $P > 0,05$) in dry matter consumption, weight gain and alimentary conversion that it represented economical importance, during the experimental period. Too many clinical alterations were not also observed. The results of this research ratify the rabbit as experimental model adjusted for the multiplication of *Trichostrongylus colubriformis* gotten of sheep, proving the adaptation of the nematode to this host.

Key words: *Trichostrongylus colubriformis*, rabbit, experimental infection, parasitism.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trichostrongylus colubriformis* (GILES, 1892) Sistemática e Aspectos Biológicos

A espécie *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda: Trichostrongyloidea), sin. *T. instabilis*, ocorre com distribuição mundial e alta prevalência em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Parasita o intestino delgado ou o abomaso de ruminantes domésticos, onde atua como patógeno primário, constituindo importante causa de gastroenterite parasitária em ovinos, caprinos e bovinos (SOULSBY, 1987; URQUHART *et al.*, 1998). Há identificação da espécie como sendo, também, um parasita do homem (FLEURY *et al.*, 1970).

Os adultos são pequenos e capiliformes, sem cápsula bucal, com sulco excretor nítido na região esofágica. Os machos podem chegar a 8 mm de comprimento e seus espículos são simétricos, curtos, em forma de “ponta de arpão” numa das extremidades. (URQUHART *et al.*, 1998). Segundo SOULSBY (1987), os espículos da espécie variam de 135 a 156µm e, IORI & CANCRINI (1983), analisando morfologicamente exemplares de *T. colubriformis* isolados de seres humanos, verificaram que seus espículos eram mais curtos (116-125µm) que os de espécimes isolados de ovinos após infecção experimental com larvas provenientes de humanos. O gubernáculo está presente e, de acordo com BORCHERT (1964), tem forma auricular e mede 71-80µm.

Através da visualização do formato e simetria dos espículos dos machos, pode-se distinguir os nematódeos adultos da espécie *T. colubriformis* de outras espécies do gênero, capazes de transitar entre lagomorfos e ruminantes, como *T. axei*, comum em bovinos, ou *T. retortaeformis*, do qual o coelho é considerado hospedeiro natural (AUDEBERT *et al.*, 2002).

As fêmeas podem atingir 12 mm de comprimento, têm vulva lisa, sem protuberância, e possuem ovejetor (URQUHART *et al.*, 1998). Seus ovos são alongados, têm pólos desiguais, casca fina, lisa e contêm grandes blastômeros (de oito a 32). Apesar das variações com os estágios de embriogênese, os ovos apresentam em média, o diâmetro maior de 85,0-89,3µm e o diâmetro menor de 44,2-48,6µm segundo CHRISTIE & JACKSON (1982); 73-96 x 40-43µm segundo BORCHERT (1964) e 79-101 x 39-47µm segundo SOULSBY (1987).

UENO & GONÇALVES (1994) alertaram para a impossibilidade de identificação dos gêneros incluídos na Super-família Strongyloidea através da observação microscópica dos ovos. Segundo os mesmos autores, as larvas infectantes dos gêneros *Trichostrongylus* e *Ostertagia* também são facilmente confundidas.

DIKMANS & ANDREWS (1933), citados por KEITH (1953), descreveram as larvas L3 (forma pré-parasitária infectante) apresentando bainha curta que afila-se abruptamente e a distância entre a ponta da cauda e a ponta da bainha (25-38µm) sendo menor que a distância ânus-ponta da cauda (76-105µm). O comprimento total da L3 pode variar de 674 a 749µm, de acordo com os autores.

As L3 obtidas de coprocultura mostram-se com maior infectividade quando mantidas em temperatura de 25°C, entretanto, quando estocadas por até 12 meses a 4°C não apresentam redução na viabilidade (ANDERSEN *et al.*, 1966; HERLICH, 1966 *apud* COUTINHO, 1983).

DOUVRES (1957) identificou e descreveu os aspectos morfológicos dos demais estágios de desenvolvimento parasitário, comparando-os com o de *T. axei*, e concluiu que a morfogênese é idêntica nas duas espécies.

O ciclo evolutivo do *T. colubriformis* é direto, com duas fases de desenvolvimento: uma fase de vida livre na pastagem (de ovo a L3) e uma fase de vida parasitária no hospedeiro. A infecção se dá por ingestão da L3 e o ciclo se completa com o parasita adulto eliminando ovos nas fezes. A taxa de ovopostura da espécie é considerada baixa, de 100 a 200 ovos por dia e a longevidade dos adultos nas espécies susceptíveis varia com a resistência imunológica do hospedeiro (SOULSBY, 1987). Ovinos infectados experimentalmente com doses de 30 a 50x10³ L3 permanecem com a infecção por cerca de quatro a seis semanas (GONÇALVES, 1965).

NIEZEN *et al.* (2002), afirmaram que a intensidade de prejuízos causados por esse endoparasita depende do grau de infecção do hospedeiro, e acrescentaram que este grau é influenciado por fatores inerentes ao hospedeiro, como estado imunológico, aporte nutricional, resistência natural ou genética e ciclo hormonal, além de fatores ambientais, como contaminação da pastagem e manejo do rebanho.

Os níveis de proteína na dieta reduzem substancialmente as perdas produtivas atribuídas à infecção por *T. colubriformis* e estão associados com o aumento da expulsão dos parasitas adultos em ovinos (HOUTERT *et al.*, 1995).

Ocorre maior susceptibilidade por parte de hospedeiros ovinos e caprinos, sendo que em caprinos, é provável que o contato com o parasita ao longo da vida não seja capaz de induzir a imunidade adquirida (SILVA *et al.*, 1998), como ocorre em ovinos (BARNES & DOBSON, 1993).

No hospedeiro ruminante, o desencapsulamento da L3 se dá, na maioria das vezes, no abomaso. Geralmente não ocorre rota migratória e o período pré-patente varia de duas a três semanas neste hospedeiro. Em vida livre, o desenvolvimento do ovo até o estágio infectante ocorre em uma a duas semanas, podendo esse tempo reduzir-se a quatro dias sob condições ótimas de temperatura, umidade e oxigenação. Ovos embrionados e larvas infectantes são resistentes a condições climáticas adversas, apresentando grande capacidade de sobrevivência à dessecação e ao frio extremo. Após período seco, a ocorrência de chuvas é capaz de reidratar larvas infectantes aparentemente dessecadas, tornando-as ativas e rapidamente disponíveis aos animais no pasto (URQUHART *et al.*, 1998).

GASTALDI *et al.* (2001), verificaram, em estudo com ovinos da Região de Jaboticabal, São Paulo, que o número de ovos de nematódeos tricostrongilídeos por grama de fezes apresenta variação sazonal. Entre os fatores que colaboram para as oscilações estão a menor disponibilidade de forragem associada à alimentação escassa e de pior qualidade no período seco. Essa menor disponibilidade de alimento resulta em maior concentração de larvas. Assim, ao praticarem pastejo mais baixo nessa época, os animais se infectam com maior intensidade, pois as larvas concentram-se mais próximas ao solo, abrigando-se dos raios solares e da pouca umidade. Nas épocas de chuvas torrenciais, estas podem promover a lavagem das pastagens, arrastando as formas larvares e os ovos ou degradando as massas fecais.

ANDERSEN & LEVINE (1968) afirmaram que a precipitação pluviométrica pode não ser tão importante para a disponibilidade larvar pois a umidade que há nas fezes de ruminantes pode ser suficiente para o desenvolvimento dos ovos de *T. colubriformis* até o estágio embrionado, relativamente resistente à dessecação. GRUNER *et al.* (1989), avaliando os efeitos da irrigação sobre o desenvolvimento de larvas infectantes de nematódeos parasitas de caprinos, concluíram que o desenvolvimento dos ovos de 7'.

colubriiformis em piquetes não irrigados não foi comprometido. Tal aspecto permite a sobrevivência e a disponibilidade de larvas infectantes por longos períodos, contribuindo para a perpetuação do parasitismo.

Variações de algumas características fenotípicas do nematódeo, como comprimento e número de ovos no útero, podem resultar de influência genotípica e do ambiente, sendo que na fase parasitária, o componente ambiental é determinado por fatores do hospedeiro, como fatores genéticos, hormonais e dietéticos (HOPKINS, 1979).

Há relato de que coelhos e lebres participem, mesmo com baixa exposição infecção, da manutenção e da disseminação de cepas do gênero *Trichostrongylus* resistentes a anti-helmínticos (SAULAI & CABARET, 1998). Estudos em biologia evolutiva sugerem que os membros da Superfamília Trichostrongyloidea tenham se adaptado a hospedeiros lagomorfos anteriormente à adaptação aos hospedeiros da Sub-ordem Ruminantia (DURETTE-DESSET *et al.*, 1999).

2.2 Infecção Experimental de *T. colubriiformis* em Coelhos

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*), Ordem Lagomorpha, é o único animal de laboratório que também é utilizado para alimentação (ANDRADE, 1994). Infecções naturais de populações de *T. colubriiformis* em coelhos já foram descritas (BULL, 1953; SAULAI & CABARET, 1998).

As alterações macro e microscópicas do intestino delgado, em infecção experimental no coelho, mostram-se semelhantes às descritas para os hospedeiros preferenciais. A mucosa intestinal sofre inflamação proliferativa crônica, com hiperemia, hemorragias petequiais ou generalizadas, atrofia das vilosidades, alongamento das criptas, presença de células mononucleares em diversas áreas e erosões epiteliais. Tal patologia compromete a digestão e resulta em perda protéica pela mucosa danificada. Estabelece-se, portanto, de acordo com a intensidade da infecção, o quadro clínico de síndrome de má absorção, que pode refletir-se em perda produtiva e importância econômica, já que o coelho é, também, um animal de produção (HERLICH, 1976; COUTINHO, 1983).

Em geral, estudos como o de HERLICH (1976), que utilizou o coelho como modelo para avaliar potencial anti-helmíntico de drogas, utilizam-se da dose de 10×10^3 larvas infectantes de *Trichostrongylus colubriiformis*; no entanto, HOPKINS (1979) afirmou que é possível obter sucesso na infecção e realizar testes a partir de $1,5 \times 10^3$ larvas.

HOPKINS (1979) constatou que a distribuição e o desenvolvimento do nematódeo têm relação com as diferentes dosagens de L₃ empregadas (1,5, 10, 25 e 100×10^3 larvas). Em baixos níveis (1,5 e 10×10^3 L₃), a maior parte dos parasitas estabelece-se na porção anterior do intestino delgado. Em altas doses (25 e 100×10^3 L₃), a proporção da população na primeira metade do intestino delgado é reduzida, comparada à população da porção posterior. À medida que as doses aumentam observa-se também aumento no número de estágios intermediários à necropsia. No entanto, o número total de parasitas encontrado “pós-mortem” tende a decrescer a partir de certo momento (16º dia após a infecção para as doses de 10 e 25×10^3 L₃), sendo que, se maior a dose, mais abrupta é a queda. Nos dias subseqüentes, os parasitas podem ser encontrados na porção posterior do intestino delgado e no intestino grosso. Isso sugere expulsão de helmintos adultos por resistência natural. O número de nematódeos fêmeas adultas obtidas à necropsia dos animais submetidos ao mesmo experimento também foi maior que o de machos, sugerindo maior expulsão destes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do Experimento

O experimento foi realizado no Setor de Doenças Infecto-contagiosas e Parasitárias do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) e nas instalações do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes - RJ.

3.2 Animais e Manejo

Foram utilizados 17 coelhos jovens, da raça Nova Zelândia, oriundos de criação comercial para corte. Todos os animais foram identificados em fichas individuais e submetidos a exame coproparasitológico pelo Método de Willis (WILLIS, 1927) e coprocultura (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950) para a certificação de estarem negativos para endoparasitas e passaram por um período de sete dias para aclimação desde que chegaram ao local do experimento. Os animais foram alimentados com ração comercial peletizada¹ e água *ad libitum*.

Cinco animais, com idade de 45 dias e denominados doadores, foram inoculados com cepa de *Trichostrongylus colubriformis* de ovinos para a multiplicação do nematódeo.

Doze animais foram identificados numericamente e separados em dois grupos de seis animais (grupo infectado e grupo controle), cada grupo contendo três machos e três fêmeas. Sexo, idade (variando de 28 a 32 dias) e peso inicial foram registrados em fichas individuais para distribuição horizontal entre os grupos.

3.3 Obtenção do Inóculos e Infecção Experimental

As larvas infectantes (L3) que constituíram os primeiros inóculos foram obtidas de cepa de *Trichostrongylus colubriformis* de ovinos naturalmente infectados da Região de Campos dos Goytacazes, RJ, através de coprocultura de macerado de fêmeas adultas. A espécie foi identificada através da morfologia de nematódeos adultos colhidos do intestino delgado de 16 ovinos abatidos em frigorífico municipal.

As larvas infectantes foram acondicionadas com água destilada, em tubos de ensaio identificados, e conservadas em refrigerador (4-6°C). No momento da inoculação, as larvas foram ativadas em estufa (35°C) e redistribuídas em tubos, de modo a padronizar o tempo de conservação. Após a certificação da infectividade através da motilidade das larvas, transferiu-se, com pipeta automática, alíquotas de 100µL da solução homogênea para lâminas, em triplicata. Logo em seguida, as larvas foram imobilizadas e coradas com uma gota de solução de lugol para serem contadas. O valor médio da contagem das lâminas foi multiplicado por 10 para se obter o número de larvas em 1,0 mL da suspensão. Os inóculos foram padronizados de modo que cada animal recebesse a dose média de 3×10^3 L₃ suspensas em água destilada, em volume variando de 2,0 a 6,0 mL. A inoculação foi feita por via oral, utilizando-se seringa e sonda plástica. Os seis animais do grupo infectado foram inoculados com as larvas obtidas dos cinco coelhos doadores. O grupo não infectado recebeu apenas água destilada.

¹ Muitivita, Proxial®

3.4 Aspectos Parasitários, Clínicos e Zootécnicos

Após a inoculação, os animais foram diariamente submetidos a exames de fezes pelo Método de Willis para o estabelecimento do período pré-patente. Após o início da patência os exames de fezes passaram a ser efetuados pelo Método de Gordon e Whitlock (GORDON & WHITLOCK, 1939) modificado, em triplicata, utilizando-se câmaras McMaster e 4g de fezes para 56mL de solução hipersaturada de NaCl, multiplicando-se o resultado pelo fator 50 (UENO & GONÇALVES, 1994). Nos mesmos dias, o total das fezes diárias excretadas foram pesadas, a fim de estimar o número total de ovos eliminados por cada animal. As fezes também foram submetidas à coprocultura e as larvas contadas para a avaliação da viabilidade dos ovos. Foram contadas as larvas infectantes extraídas de coprocultura em 100µL da suspensão em água destilada, em triplicata. Para esta coprocultura utilizou-se 10g de fezes de cada animal.

Na avaliação dos parâmetros clínicos, os animais foram inspecionados diariamente para o registro de qualquer alteração no comportamento (estado de alerta, presença de coprofagia) e nos aspectos da pele, dos pêlos e das mucosas aparentes. Os aspectos zootécnicos registrados foram ganho de peso, consumo diário de ração, em matéria seca, e conversão alimentar.

Amostras da ração comercial oferecida, das fezes e das sobras de ração dos animais passaram pela pré-secagem em estufa à 60°C por 72 horas, pela moagem e pela secagem propriamente dita (105°C/12 horas) para os cálculos da matéria seca.

A conversão alimentar foi calculada dividindo-se o consumo de matéria seca (g/dia) pelo ganho de peso (g/dia) referente ao mesmo intervalo de tempo.

3.5 Procedimentos de Identificação e Contagens

Os animais infectados assim permaneceram por quatro semanas. Vinte e oito dias após a infecção, estes foram pesados, sacrificados e necropsiados mediante jejum de 24 horas. Os animais do grupo controle foram pesados e submetidos a exame de fezes para constatação da manutenção da negatividade para endoparasitas.

Foi retirado todo o conjunto de vísceras, cuidadosamente para não haver perfuração, e depois transferido para um saco plástico limpo e devidamente identificado.

Estômago, intestino delgado e intestino grosso foram separados por isolamento de duplo ligamento com barbante (para que os helmintos não se deslocassem em direção a outros órgãos e para que não se perdesse material). Cada uma das partes foi aberta longitudinalmente, lavada com solução fisiológica e suas mucosas foram raspadas cuidadosamente com as hastes de uma pinça. Todo o conteúdo da bandeja foi transferido para um becker, de capacidade para 500mL, identificado com o órgão do trato gastrointestinal, e este ficava em repouso para sedimentação do conteúdo durante 20 minutos. Então, o líquido sobrenadante foi extraído, o sedimento homogeneizado e o recipiente completado com água destilada. Este procedimento foi repetido até a clarificação do conteúdo.

Os materiais clarificados foram transferidos para beckers de capacidade para 150mL e mantidos tampados. Os conteúdos não examinados dentro de 24 horas foram adicionados de solução de formol salina à 0,2% e refrigerados. Os nematódeos foram coletados de alíquotas de 15mL (10%), em duplicata, dos lavados intestinais. Foi utilizado agulha

histológica e placas de Petri sobre fundo preto. A sexagem e a contagem foram realizadas sob microscópio estereoscópico com aumentos variáveis de 2 a 3X e ocular de 10X.

A identificação, em estereomicroscopia, foi baseada na visualização de caracteres morfológicos como espículos, gubernáculo, ovejetor e extremidade posterior das fêmeas e, à microscopia óptica, foi confirmada com a mensuração das estruturas. Alguns espécimes (20 machos e 20 fêmeas) tiveram seus comprimentos mensurados através de régua milimetrada. Amostra de 40 ovos encontrados nas fezes dos animais e escolhidos aleatoriamente tiveram seus diâmetros mensurados através de micrômetro ocular e objetiva de 40x. Do mesmo modo, 40 larvas tiveram comprimento total e distâncias entre ponta da cauda-ponta da bainha e ânus-ponta da cauda mensurados. As mensurações foram realizadas com uso de microscópio óptico e ocular micrométrica Carl Zeiss. Foi calculado o índice morfométrico para os ovos pela divisão do diâmetro maior pelo diâmetro menor.

Vinte fêmeas adultas de *T. colubriformis* obtidas de cada animal foram coradas com solução de lugol para observação e contagem dos ovos presentes no interior do útero. Todos os estágios evolutivos dos ovos foram contados. A observação foi feita através de microscopia óptica e aumento de 40x.

Para as microfotografias, foi utilizado microscópio óptico Nixon Eclipse E400 e câmera fotográfica digital Nikon Coolpix 995.

3.6 *Delineamento Experimental*

O experimento foi conduzido segundo delineamento em blocos completos casualizados, sendo o sexo considerado elemento de controle local, tendo-se dois tratamentos e três repetições. Os atributos zootécnicos foram avaliados por intermédio de análise de variância, adotando-se $\alpha=0,05$. As características morfométricas dos helmintos foram relatadas em associação ao intervalo de confiança com 95% de probabilidade para a média. As demais características avaliadas foram apresentadas por intermédio de estatísticas descritivas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Animais Doadores

Dos cinco animais infectados inicialmente com cepa obtida de ovinos, dois apresentaram período pré-patente de 19 dias e três de 20 dias. A média da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), avaliada semanalmente por 40 dias desde o início da patência, foi de $401,30 \pm 94,58$. Foi constatada a viabilidade dos ovos pela obtenção de larvas infectantes com motilidade, por coprocultura.

Um dos animais foi sacrificado e necropsiado, 40 dias após a infecção, para a obtenção de nematódeos adultos, confirmando que a espécie *T. colubriformis* era a única espécie presente. Foram recuperados 221 fêmeas e 108 machos adultos no conteúdo de intestino delgado. O total de adultos representou 10,97% da quantidade de larvas utilizadas para a infecção. A média de ovos contados no útero de 20 espécimes fêmeas do nematódeo foi de $16,62 \pm 2,97$.

4.2 Morfologia

Os ovos eliminados nas fezes apresentaram morfologia elipsóide típica, dentro das dimensões expressas na Tabela 1. Tais mensurações coincidem com as de SOULSBY (1987) e CHRISTIE & JACKSON (1982), apenas conflitando-se com as de BORCHERT (1964), no que se refere ao diâmetro menor. As características das larvas infectantes e dos espécimes adultos mensurados (Tabela 1) estão de acordo com KEITH, (1953) BORCHERT (1964), SOULSBY (1987) e URQUHART (1998), ou seja, não apresentaram alterações após a passagem pelo coelho. A Figura 1 mostra o formato característico de estruturas de formas evolutivas do nematódeo.

Tabela 1 Medidas de formas de *Trichostrongylus colubriformis* obtidos de coelhos através de exame coproparasitológico, coprocultura e necropsia, a partir de infecção experimental com 3×10^3 larvas infectantes, por via oral.

Característica	Média (µm)	Limites IC95% ¹		EPM	N
		LI	LS		
Ovos					
Diâmetro Maior	85,91	85,75	88,07	0,572	40
Diâmetro Menor	45,59	44,87	46,31	0,357	40
Índice Morfométrico	1,91	1,87	1,95	0,021	40
Larvas Infectantes					
Comprimento Total	717,1	710,35	723,85	3,336	40
Distância PC-PB	30,1	28,88	31,32	0,601	40
Distância A-PC	88,14	83,07	93,21	2,508	40
Adultos Machos					
Comprimento Total	6,0 x 10 ³	5,34 x 10 ³	6,66 x 10 ³	0,313	20
Espículos	145,5	139,35	151,65	2,938	20
Gubernáculo	80,37	77,26	83,48	1,487	20
Adultos Fêmeas					
Comprimento Total	8,7 x 10 ³	8,14 x 10 ³	9,26 x 10 ³	0,268	20
Ovejeter	404,0	385,61	422,39	8,788	20

¹ Limites Inferior (LI) e Superior (LS) do Intervalo de Confiança (IC) para a Média

EPM - Erro Padrão da Média; N - Número de observações

PC – Ponta da Cauda, PB - Ponta da Bainha, A – Anus



Figura 1 *Trichostrongylus colubriformis* A) Ovo. B) Larva infectante. C) Ovejeto em fêmea. D) Bolsa copulatória permitindo visualização dos espículos, simétricos e em forma de ponta de arpão, e do gubernáculo em macho.

4.3 Aspectos Clínicos e Zootécnicos

Durante o período experimental não foram observadas alterações comportamentais e sinais clínicos nos animais. Todos permaneceram ágeis, bem dispostos e com apetite. As fezes apresentavam consistência e aspecto aparentemente normais, a pele, o pêlo e as mucosas também não mostraram alteração em nenhum animal.

De acordo com os resultados de HOPICINS (1979), coelhos infectados com a dose de $1,5 \times 10^3$ larvas não apresentam substancial redução de ganho de peso em relação ao grupo controle. No entanto, o autor afirmou que com doses maiores (10 e 25×10^3 larvas) pode haver, além de perda de peso, diarreia a partir do 16º dia após a infecção.

Neste estudo, não foram constatados efeitos significativos sobre as variáveis ganho de peso, peso vivo final, consumo de matéria seca e conversão alimentar, relativos ao parasitismo (Tabela 2). A ausência de sinais clínicos, mudança de comportamento ou óbitos decorrentes das inoculações identificam-se com as observações de COUTINHO (1983). No entanto, ao contrário do observado pela autora, no presente estudo não foi constatada redução de peso nos animais infectados ou diferença significativa no ganho, quando comparados ao grupo controle. As doses infectantes, utilizadas por COUTINHO (1983), variaram de 5 a 30×10^3 larvas e a autora ainda relatou que houve maior sucesso na infecção com larvas de *T. colubriformis* obtidas a partir de fezes de ovinos do que de bovinos.

Neste estudo, o sexo dos hospedeiros não influenciou nos resultados relativos infecção ($P>0,05$), em concordância com o que afirmaram PURVIS & SEWELL (1972) e COUTINHO (1983).

Tabela 2 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM-g/dia), consumo de matéria seca (CMS-g/dia) e conversão alimentar (CA-g/g), de acordo com os grupos de animais infectados e não infectados.

Ítem	Grupo		CV (%)
	Coelhos não infectados	Coelhos infectados	
GPM ¹	11,8	11,0	5,16
CMS ¹	76,9	79,7	1,47
CA ¹	6,79	7,29	5,15

¹ Efeito relativo a tratamentos não-significativo pelo teste F ($P>0,05$)

4.4 Aspectos Parasitários

Segundo COUTINHO (1983), o período pré-patente pode variar, em coelhos, de 12 a 21 dias para *T. colubriformis* obtidos de ovinos e, de 20 a 29 dias para os parasitas obtidos de bovinos. Neste trabalho, o período pré-patente de 18-19 dias, averiguado nos seis animais infectados com cepa de coelho, inclui-se no intervalo observado pela referida autora. Os animais controle permaneceram negativos ao exame coproparasitológico durante todo o experimento.

O fato de os animais não terem apresentado perda de peso e não terem seus ganhos afetados pode ter associação com o período de tempo em que a infecção foi mantida. As perdas poderiam se agravar quando os nematódeos estivessem exigindo maior energia para a fase de cópula e produção de ovos no período patente, fase esta que pode não ter permanecido por tempo suficiente nos animais, para refletir-se sobre o desempenho. Isto porque os nematódeos estavam com apenas oito dias de patência, quando os animais foram necropsiados e, além disso, estes não apresentaram anorexia neste período. Portanto, parece não ter havido prejuízos no desempenho, unicamente atribuídos à evolução das formas infectantes, até a instalação das formas adultas na mucosa entérica.

Se, após a quarta semana da infecção, já se observa a morte natural dos helmintos nos hospedeiros ovinos (GONÇALVES, 1965), as perdas, em infecções naturais, podem estar fortemente associadas às reinfecções. Obviamente, há também associação com: carga parasitária, virulência da cepa, idade, nutrição e estado imunológico do hospedeiro, bem como com a resistência natural atribuída a fatores genéticos (NIEZEN *et al.*, 2002).

No trabalho de HOPIUNS (1979), a eliminação de ovos nas fezes diárias de coelhos infectados com $1,5 \times 10^3$ larvas, obtidas de ovinos, variou entre as médias de 15 a 30×10^3 ovos totais. Enquanto que, nos animais infectados com cepa obtida de coelhos, na mesma dose, a contagem total de ovos eliminados nas fezes diárias chegou a mais de 60×10^3 aos 24 dias da infecção.

No presente estudo, as análises de OPG informaram que da primeira para a segunda mensuração, os animais apresentaram redução na contagem de ovos. Em geral, a média diária estimada esteve abaixo da taxa de ovopostura da espécie, de 100 a 200 ovos por dia, citada por SOULSBY (1987), considerando a contagem dos adultos fêmeas no intestino. A eliminação dos ovos nas fezes pode não representar boa indicação da carga parasitária real ou a taxa de ovopostura do nematódeo esteve reduzida no coelho.

As médias estimadas de larvas, extraídas da coprocultura de cada animal estão na Tabela 4 e, com isto, confirmou-se a viabilidade dos ovos eliminados.

Tabela 3 Período pré-patente, estimativa do número de ovos por grama de fezes e do número total de ovos diários eliminados por cada coelho infectado, de acordo com o sexo

Coelho	Sexo	PPP (dias)	OPG ¹		Média do número total de ovos ($\times 10^3$) ¹	
			1	2	1	2
1	M	19	400	300	23,71	18,46
2	M	18	500	350	29,64	21,54
3	M	18	550	450	32,61	27,69
4	F	18	400	400	22,53	21,51
5	F	18	350	300	19,71	16,13
6	F	18	600	450	33,79	24,20
Média (EPM)	-	-	467 (40)	375 (28)	27,00 (2,37)	21,59(1,67)

PPP - Período Pré-Patente; OPG - Ovos Por Grama de fezes; EPM - Erro Padrão da Média.

¹ Avaliações aos 22 e aos 27 dias após a infecção.

Sobre a recuperação de nematódeos adultos, nos seis animais infectados com cepa obtida de coelhos foram encontrados espécimes vivos, no intestino delgado (Tabela 4). Não foram observadas formas imaturas do parasita nos conteúdos examinados.

Mesmo considerando as diferenças entre origem dos animais, cepas utilizadas e possíveis fatores de manejo, é notável a divergência do desenvolvimento de parasitas adultos neste estudo (16,00 a 32,33%) e no estudo anterior de COUTINHO (1983), que obteve taxas entre 0,013 e 10,98%.

A obtenção de altos percentuais de nematódeos em relação ao número de larvas inoculadas permite sugerir que a idade dos animais, de aproximadamente um mês, utilizada neste estudo, pode ser fator determinante para isso. O fato está de acordo com a afirmação de PURVIS & SEWELL (1972), no que se refere à resistência ao parasitismo nos animais mais velhos. Estes autores observaram que coelhos mais velhos (17,5 semanas de idade) desenvolvem resistência ao parasitismo mais rapidamente que indivíduos mais novos (7,5 semanas de idade), o que sugere imunidade adquirida lentamente. Porém, contrasta com a observação da não interferência da idade citada por COUTINHO (1983). PURVIS & SEWELL (1972) ainda mencionaram que o sexo parece não influenciar na aquisição da imunidade, e, COUTINHO (1983), acrescentou que a dieta baseada no leite parece exercer algum efeito sobre o desenvolvimento de *T. colubriformis*, pois seus resultados mostram que os coelhos inoculados que permaneceram lactentes foram encontrados com menor número de parasitas em relação aos coelhos inoculados que foram desmamados.

Houve, neste experimento, maior taxa de desenvolvimento dos nematódeos nos coelhos inoculados com cepas de coelhos (16,00-32,33%) em relação ao animal necropsiado após infecção com cepa de ovino (10,97%).

Obteve-se maior número de nematódeos fêmeas em relação ao de machos. A obtenção de fêmeas em maior número corrobora os resultados de HOPKINS (1979) e COUTINHO (1983), e pode sugerir maior expulsão de machos nos níveis de infecção próximos a 3×10^3 larvas. Ainda para este nível de infecção, também está de acordo com tais autores, o fato da distribuição dos nematódeos adultos ter estado concentrada no intestino delgado. A distribuição de *T. colubriformis* em coelhos tem maior prevalência na porção duodenal, podendo ocorrer quadro errático, segundo HERLICH (1976) e COUTINHO (1983).

Segundo HOPKINS (1979), a fecundidade parasitária pode ser *avaliada* através da observação e contagem de ovos no útero das fêmeas. Aqui, as médias de ovos variaram de 13,3 a 18,6 (Tabela 4) e estão de acordo com os resultados do autor.

Infecções parasitárias do trato gastrintestinal com helmintos são freqüentemente associadas a processos adaptativos, desenvolvidos durante a co-evolução das duas espécies, parasita e hospedeiro. Mecanismos retroativos são capazes de manter a baixa virulência do agente parasitário e permitir que o hospedeiro mantenha seu trato digestivo funcional. Desse modo, favorece-se a sobrevivência do hospedeiro e conseqüentemente a propagação da espécie parasita. A infecção parasitária representa o único modelo para a pesquisa sobre essa adaptação (HOSTE, 2001). No entanto, há fatores, como reações próprias do organismo ou fatores externos, que limitam o desenvolvimento e a adaptação de parasitas em hospedeiros não naturais, os quais lhes confere ou não susceptibilidade a eles.

Tabela 4 Números de larvas infectantes, de nematódeos adultos e sua relação (%) com a dose infectante de 3×10^3 L₃ e ovos no útero de espécimes obtidas dos coelhos experimentalmente infectados

Coelho	Sexo	L ₃ (x10) ¹	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> adultos ²					Ovos ³
			Machos	Fêmeas	Total	Velma:Macho	%	
1	M	255	240	370	610	1,54:1,00	20,33	15,7±0,65
2	M	235	200	280	480	1,40:1,00	16,00	17,8±0,54
3	M	190	270	405	675	1,50:1,00	22,50	13,3±0,78
4	F	180	240	330	570	1,38:1,00	19,00	18,6±0,49
5	F	205	280	690	970	2,46:1,00	32,33	15,9±0,83
6	F	310	285	380	665	1,33:1,00	22,17	14,2±0,74

¹ Número estimado de larvas infectantes recuperadas de 10g de fezes, após coprocultura dos animais infectados

² Formas obtidas no intestino delgado dos animais necropsiados

³ Número médio de ovos no útero de 20 fêmeas do nematódeo

Para que a carga parasitária seja um parâmetro que estabeleça a eficácia anti-helmíntica de uma droga, é necessário haver: uniformidade no desenvolvimento do teste, produção de número de ovos suficiente para promover larvas infectantes para a próxima geração e ausência do fenômeno de autocura ou perda espontânea da população parasitária (HOPKINS, 1979). A busca pela homogeneidade genética pode ser atendida pela criação de linhagens isogênicas de animais de laboratório.

Analisando os resultados de 100% de positividade do parasitismo, tanto nos coelhos infectados com cepa de *Trichostrongylus colubriformis* oriunda de ovinos, como nos infectados com larvas oriundas de coelhos, verificou-se que o nematódeo é adaptável a esta espécie (*Oryctolagus cuniculus*). Portanto, de acordo com os resultados de HERLICH (1976) e HOPKINS (1979), o coelho confirma-se como modelo experimental adequado para a multiplicação de *T. colubriformis* em laboratório, bem como para estudos em helmintologia e testes preliminares de eficácia anti-helmíntica frente a esta espécie, visto que não se observou eliminação espontânea durante o período do experimento.

5 CONCLUSÕES

Perante os resultados obtidos neste estudo, com a utilização do modelo de infecção experimental de *Trichostrongylus colubrifomis* em coelhos, pode-se inferir que:

- a) O coelho confirmou-se como modelo adequado para a multiplicação de *T. colubrifomis* obtidos de ovinos, tornando possível a realização de testes preliminares de eficácia anti-helmíntica em laboratório.
- b) O sexo dos coelhos não interferiu nos aspectos parasitários, clínicos e zootécnicos avaliados frente à infecção.
- c) Foi obtido maior número de nematódeos fêmeas de *T. colubrifomis* em relação a machos, nos coelhos necropsiados.
- d) Os animais não manifestaram sinais clínicos durante o período experimental, bem como não houve alteração significativa no consumo de matéria seca, ganho de peso e conversão alimentar.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, F. L.; LEVINE, N. D. Effect of desiccation on survival of the free living stages of *Trichostrongylus colubriformis*. *Journal of Parasitology*, v.54, p.117-128, 1968.

ANDERSEN, F. L.; WANG, G. T.; LEVINE, N. D. Effect of temperature on survival of the free-living stages of *Trichostrongylus colubriformis*. *The Journal of Parasitology*, v.52, n.4, p.713-721, 1966.

ANDRADE, A. *Manual para técnicos em animais de laboratório*. Rio de Janeiro: CICT/Fiocruz, 1994. 134 p.

AUDEBERT, F.; HOSTE, H.; DURETTE-DESSET, M. C. Life cycle of *Trichostrongylus retortaeformis* in its natural host, the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Helminthology*, v.76, p.189-192, 2002.

BARNES, E. H.; DOBSON, R. J. Persistence of acquired immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep after termination of infection. *International Journal for Parasitology*, v.23, n.8, p.1019-1026, 1993.

BORCHERT, A. *Parasitologia Veterinaria*, Zaragoza: Editorial Acribia, 1964. 745 p.

BULL, C. P. Distribution of the nematode *Trichostrongylus retortaeformis* in the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* L. *New Zealand Journal of Science Technology Section B*, v.34, p.449-456, 1953.

CAUTHEN, G. E. Inefficiency of rabbits for testing anthelmintics to be used against gastrointestinal nematodes in ruminants. *Journal of Parasitology*, v.44, p.246, 1958.

CHRISTIE, M.; JACKSON, F. Specific identification of strongyle eggs in small samples of sheep faeces. *Research in Veterinary Science*, v.32, p. 113-117, 1982.

CONDER, G. A.; JOHNSON, S. S.; GUIMOND, P. M.; COX, D. L.; LEE, B. L. Cocurrent infections with the ruminant nematodes *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in jirds, *Meriones unguiculatus*, and use of this model for anthelmintic studies. *Journal of Parasitology*, v.77, n.4, p.621-623, 1991.

COUTINHO, Vanda. *Infecções experimentais no coelho (Oryctolagus cuniculus L) com nematódeos gastrintestinais de ovinos, bovinos e equinos*. 1983. 70 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1983.

DIKMANS, G.; ANDREWS, J. S. A comparative morphological study of the infective larvae of the common nematodes parasitic in the alimentary tract of sheep. *Transactions of American Microscopical Society*, v.52, n.1, p.1-25, 1933.

- DOUVRES, F. K. Key to the identification and differentiation of the immature parasitic stage of gastrointestinal nematodes of cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v.18, n.66, p.81, 1957.
- DURETTE-DESSET, M. C.; HUGOT, J. P.; DARLU, P.; CHABAUD, A.G. A cladistic analysis of the Trichostrongyloidea (Nematoda). *International Journal for Parasitology*, v.29, n.7, p.1065-1086, 1999.
- FLEURY, G. C.; CORREA, M. O.; AMATO NETO, V. Identification of *Trichostrongylus colubriformis* as a human parasite. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.12, n.4, p.288-292, 1970.
- GASTALDI, K. A.; SILVA SOBRINHO, A. G.; COSTA, A. J.; ROCHA, U. F. Variação estacional do número de ovos por grama de fezes de nematódeos parasitas de ovinos na Região de Jaboticabal, São Paulo. *ARS Veterinária*, v.17, n.2, p.124-129, 2001.
- GONÇALVES, P. C. *Notas de verminose ovina e bovina*. Apostila do Curso de Introdução A Pesquisa Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1965. 29p.
- GORDON, H. McL.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Commnw. Sci. And Indst. Organization*, v.12, n.1, p.50-52, 1939.
- GRATION, K. A. F.; BISHOP, B. F.; MARTIN-SHORT, M. R.; HERBERT, A. A new anthelmintic assay using rats infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v.42, p.273-279, 1992.
- GRUNER, L.; BERBIGIER, P.; CORTET, J.; SAUVE, C. Effects of irrigation on appearance and survival of infective larvae of goat gastro-intestinal nematodes in Guadalupe (French West Indies). *International Journal for Parasitology*, v.19, n.4, p.409-415, 1989.
- HERLICH, H. The rabbit – *Trichostrongylus axei*: *T. colubriformis* system as a preliminary screen for testing potential anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, v.2, p.377-383, 1976.
- HOPKINS, P. G. *The experimental establishment of populations of Nematodirus battus and Trichostrongylus colubriformis, nematode parasites of the intestine of sheep, in laboratory rabbits: dose dependent fratures of the establishment, and use of surch populations in the study of resistance to anthelmintics*. 1979. 228 p. Thesis (Ph.D. of Philosophy in the Faculty of Science) University of Edinburgh, Edinburgh, 1979.
- HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.231-244, 2001.
- HOSTE, H.; MALLET, S.; KOCH, C. *Trichostrongylus colubriformis* infection in rabbits: persistence of the distal adaptive response to parasitism after anthelmintic treatment. *Journal of Comparative Pathology*, v.113, n.2, p.145-153, 1995.

- HOUTERT, M. F.; BARGER, I. A.; STEEL, J. W.; WINDON, R. G.; EMERY, D. L. Effects of dietary protein intake on responses of young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v.56, n.1-3, p.163-180, 1995.
- IORI, A.; CANCRINI, G. Indagini morfologiche comparative tra esemplari di *Trichostrongylus colubriformis* solati da infestazioni umane e *T. colubriformis* ottenuti da infestazioni sperimentali di *Ovis aries* con larve di provenienza umana. *Parassitologia*, v.25, p.17-20, 1983.
- KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Australian Journal of Zoology*, v.1, n.2, p.223-235, 1953.
- KIRSCH, R. Comparative biological and chemotherapeutic experiments with small laboratory animals used in helminth screening. In: V SYMPOSIUM INTERNATIONAL COMMITTEE LABORATORY ANIMALS, 1973, *Proceedings...* p.53-61, 1973.
- NIEZEN, J. H.; WAGHORN, G. C.; GRAHAM, T.; CARTER, J. L.; LEATHWICK, D. M. The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae *in vitro* and on pasture. *Veterinary Parasitology*, v.105, p.269-283, 2002.
- ORTLEPP, R. J. Can hares and rabbits act as host of sheep and goat bankrupt worms (*Trichostrongylus sp.*) in South Africa? *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, v.10, p.166-169, 1939.
- PURVIS, G. M.; SEWELL, M. M. H. *Trichostrongylus colubriformis*: age resistance in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Experimental Parasitology*, v.32, p.191-195, 1972.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.1, p.99-102, 1950.
- SAULAI, M.; CABARET, J. Limited role of lagomorphs (*Oryctolagus cuniculus* and *Lepus capensis*) in the dispersion of parasite nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology*, v.77, p.301-304, 1998.
- SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; COSTA, A. L. Natural evolution of gastrointestinal nematodes in goats (*Capra hircus*) in the semi-arid ecosystem of the Paraiba backwoods, northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.80, p.47-52, 1998.
- SOULSBY, E. J. L. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domesticos*. 7 ed. México D.F.: Interamericana, 1987. 823 p.
- UENO, H.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 3ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166 p.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. *Parasitologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. 273 p.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia*, v. 8, p.375-376, 1927.

CAPÍTULO II

EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA DA DORAMECTINA E DOS NOSÓDIOS *Trichostrongylus colubriformis* 30CH E FATOR VERMES® SOBRE *Trichostrongylus colubriformis* EM COELHOS

1 INTRODUÇÃO

O emprego de tratamento baseado no princípio da semelhança tem sua menção mais antiga em um papiro datado de 1.500 a.C.. Com Hipócrates (460-350 a C), cuja obra é um marco das ciências médicas, foi introduzida a avaliação metódica dos sinais e sintomas como base para o diagnóstico das enfermidades (CORRÊA et al., 1997).

Hipócrates acreditava que dois métodos terapêuticos poderiam ser utilizados com sucesso: a “cura pelos contrários” (*Contraria Contrariis Curentur*), consolidada por Galeno (129-199 d.C.) e Avicena (980-1037) e a cura pelos semelhantes (*Similia Similibus Curentur*) resgatada no século XVI por Paracelso (1493-1591) e consolidada com as experimentações de Hahnemann (1755-1843) (CORREA et al., 1997).

Embora, hoje, alopátia e homeopatia constituam dois métodos distintos de abordagem terapêutica, no momento histórico da origem das leis que conduziriam a doutrina médica, o princípio da semelhança e o princípio dos contrários não se opunham no pensamento filosófico da época (CORREA et al., 1997).

Atualmente, a homeopatia é muito questionada por não apresentar um mecanismo de ação de seus princípios ativos de modo plausível e aceito pela comunidade científica. No entanto, a despeito de todos os preconceitos, é crescente o interesse de pesquisadores pelos efeitos positivos observados por essa modalidade terapêutica.

No Brasil, publicou-se a primeira edição oficial da Farmacopéia Homeopática em 1977. Em 1980, o Conselho Federal de Medicina reconheceu oficialmente a homeopatia como especialidade médica, fato também ocorrido no Conselho Federal de Medicina Veterinária no ano de 1995.

Especialmente na área das ciências veterinárias, a expansão das práticas que restringem o uso de medicamentos alopáticos em animais de produção ecológica, devido a seus efeitos indesejados, desperta a necessidade de comprovação científica das propriedades terapêuticas e atividades farmacológicas da homeopatia. Espera-se que, com a compreensão dos seus mecanismos terapêuticos, seja obtido o aprimoramento contínuo das técnicas de prescrição dos medicamentos, a fim de disponibilizar sociedade, uma alternativa econômica e segura para uma melhor qualidade de vida aos homens e aos animais.

A doramectina, base anti-helmíntica amplamente utilizada no controle da verminose dos animais, tem sua eficácia comprovada sobre *Trichostrongylus colubrifomis*, tendo sido testada em ratos Wistar (GOUDIE et al., 1993).

A avaliação de anti-helmínticos *in vivo* requer uma sustentável relação parasita-hospedeiro. Mesmo que o ideal seja a avaliação de compostos contra parasitas em seus hospedeiros naturais, é desejável que primeiramente se faça um teste preliminar em modelo laboratorial. O estabelecimento da sobrevivência e a confirmação da patência do *Trichostrongylus colubrifomis* no coelho sugerem uma relação parasita-hospedeiro que forma a base de um modelo adequado para teste preliminar de eficácia anti-helmíntica.

Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento da terapêutica homeopática, este estudo avaliou a atividade anti-helmíntica dos nosódios *Trichostrongylus colubrifomis* 30CH e Fator Vermes® sobre a espécie *Trichostrongylus colubrifomis*, utilizando a doramectina como padrão de referência e o coelho como modelo experimental.

RESUMO

MACHADO, Helaíne Haddad Simões. Eficácia anti-helmíntica da doramectina e dos nosódios *Trichostrongylus colubriformis* 30CH e Fator Vermes® sobre *Trichostrongylus colubriformis* em coelhos. Seropédica: UFRRJ, 2003. 55p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva).

Trinta coelhos Nova Zelândia tipo carne, de aproximadamente um mês de idade, foram utilizados com a finalidade de se avaliar a atividade anti-helmíntica de dois preparados homeopáticos sobre a espécie *Trichostrongylus colubriformis*. Os animais foram distribuídos em cinco grupos de seis (três machos e três fêmeas), sendo que três grupos receberam medicações e dois grupos serviram como controles positivo e negativo. Todos eram alimentados com ração peletizada comercial e água *ad libitum*. Cada coelho foi inoculado oralmente com a dose estimada de 3×10^3 larvas infectantes suspensas em água destilada, obtidas por cultura de fezes de coelhos. Apenas um grupo composto de seis animais não foi infectado, com a finalidade de se avaliar aspectos clínicos, comparando-os com os animais tratados. Foram utilizados os nosódios *Trichostrongylus colubriformis* 30CH e Fator Vermes®. A doramectina foi o medicamento escolhido como padrão de referência. Aspectos clínicos, zootécnicos e parasitários foram avaliados. Os animais infectados foram necropsiados e alíquotas de 10%, em duplicata, do conteúdo intestinal, foram examinadas para a estimativa da carga de helmintos adultos. A doramectina apresentou eficácia de 100%. Os nosódios testados também exerceram ação positiva sobre a remoção do nematódeo, sendo que o *Trichostrongylus colubriformis* 30CH apresentou eficácia de 36,65% enquanto que o Fator Vermes® apresentou eficácia de 18,64%, de acordo com o protocolo seguido neste estudo. Não foram observadas diferenças significativas em relação a ganho de peso, consumo de matéria seca e conversão alimentar, bem como não foram observadas alterações clínicas, em relação aos diferentes tratamentos.

Palavras chave: *Trichostrongylus colubriformis*, homeopatia, *Trichostrongylus colubriformis* 30CH, Fator Vermes®, doramectina.

ABSTRACT

MACHADO, Helaine Haddad Simões. **Anthelmintic efficacy of doramectin and *Trichostrongylus colubriformis* 30CH and Fator Vermes® nosodes on *Trichostrongylus colubriformis* in rabbits.** Seropédica: UFRRJ, 2003. 55p. (Dissertation, Master of Science in Veterinary Medicine).

Thirty New Zealand meat type rabbits, of approximately one month of age, were used with the purpose of evaluating the anthelmintic activity of two prepared homeopathic on *Trichostrongylus colubriformis* specie. The animals were distributed in five groups of six (three males and three females), and three groups received medications and two groups served as positive and negative controls. For all was given commercially pelleted feed and water *ad libitum*. Each rabbit was inoculated orally with the average dose of 3×10^3 infective larvae suspended in distilled water, obtained of culture of faeces of rabbits. Just a group composed of six animals was not infected, with the purpose of to evaluate clinical aspects, comparing them with the animals treated. The *Trichostrongylus colubriformis* 30CH and Fator Vermes® nosodes were used. The doramectin was the chosen medicine as reference pattern. Clinical, zootechniques and parasitary aspects were evaluated. The infected animals were necropsied and duplicate 10% aliquots of intestinal content were examined to obtain estimates of adult worm burdens. The doramectin presented 100% of efficacy. The tested nosodes also exercised positive action in the removal of the nematode, and *Trichostrongylus colubriformis* 30CH presented effectiveness of 36,65% while the Fator Vermes® presented effectiveness of 18,64%, in agreement with the following protocol in this study. Significant differences were not observed in relation to weight gain, dry matter consumption and alimentary conversion, as well as it was not observed clinical alterations, in relation to the different treatments.

Key words: *Trichostrongylus colubriformis*, homeopathy, *Trichostrongylus colubriformis* 30CH, Fator Vermes®, doramectin.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle Medicamentoso da *Trichostrongilose*

Os helmintos trichostrongilídeos, dentre os quais encontra-se o *Trichostrongylus colubriformis*, são causadores de doença parasitária do trato gastrointestinal, notadamente em pequenos ruminantes, conduzindo a prejuízos econômicos principalmente pelas manifestações subclínicas e atrasos na produtividade (URQUHART *et al.*, 1998).

Embora o desenvolvimento das diferentes categorias de anti-helmínticos tenha representado um importante avanço para o controle das nematodioses gastrointestinais de ruminantes, o uso contínuo e/ou inadequado dessas substâncias, associado à falta de diagnóstico, permite a seleção de espécies resistentes, principalmente frente aos grupos de amplo espectro. Sabe-se que a interação com helmintos em condições de baixa carga parasitária e bom estado de saúde e manejo é capaz de induzir o desenvolvimento de imunidade por parte do hospedeiro, até por questões adaptativas (BARNES & DOBSON, 1993; HOSTE, 2001); portanto, intervir a fim de eliminar o parasitismo, em condições de infecções leves e não-patogênicas, pode representar uma ação desfavorável para o animal.

WALLER *et al.* (1996) afirmam que o parasitismo por nematódeos constitui a mais importante causa de doença em caprinos e ovinos na América do Sul e chamam a atenção para a falta de adoção de esquemas preventivos de controle. Os autores argumentam que o uso de anti-helmínticos de forma curativa, associado a perdas e ao reconhecimento da doença no rebanho, não se mostra vantajoso pois a presença de manifestações clínicas freqüentemente coincide com a presença de grande número de larvas infectantes na pastagem; então, imediatamente após o tratamento, a reinfecção é inevitável.

VIEIRA & CAVALCANTE (1999) comentam que a espécie caprina absorve e metaboliza mais rapidamente os anti-helmínticos utilizados do que os ovinos, o que torna necessário o uso de doses mais elevadas para esta espécie. Os autores confirmam, portanto, que o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica está diretamente ligado ao uso freqüente dos medicamentos, A. não consideração de fatores epidemiológicos e à não realização de esquema rotacional de drogas.

Ao contrário do que se observa com freqüência a campo, o controle químico das helmintoses deve basear-se no uso de bases eficazes de forma profilática e estratégica, ou de forma curativa somente para tratar surtos clínicos já instalados. Deve-se realizar diagnósticos e evitar tratamentos a curtos intervalos, além de valorizar o uso de anti-helmínticos de ação específica (HOSTE *et al.*, 2002; SILVESTRE & HUMBERT, 2002).

Em pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul, ECHEVARRIA *et al.* (1996) constataram resistência de nematódeos parasitas de ovinos em 97% das propriedades estudadas, sendo que as espécies do gênero *Trichostrongylus* apresentaram resistência frente aos benzimidazoles, ao levamisole, à ivermectina e à combinação benzimidazole/levamisole. AMARANTE *et al.* (1992) relataram, também no Brasil, resistência múltipla de *Trichostrongylus* sp. em ovinos frente ao oxfendazole, à ivermectina e ao levamisole. VIEIRA & CAVALCANTE (1999) relataram, em caprinos, a presença de cepas resistentes a benzimidazóis e imidazóis.

Diante dessa situação drástica e antes da completa ausência de opções no mercado, de um protocolo efetivo para o controle parasitário, é importante investir em avaliações do potencial de métodos alternativos de controle, complementares aos estudos epidemiológicos locais, fundamentais para aplicações estratégicas (ECHEVARRIA *et al.*, 1996).

Estudos buscando conhecer a eficácia de novas opções de tratamento para as nematodioses de animais de produção estão sendo realizados. Entre essas novas alternativas estão o controle biológico com fungos nematófagos (GOMES *et al.*, 2000, KNOX & FAEDO, 2001), com *Bacillus thuringiensis* (HASSANAIN *et al.*, 2001), o uso de vacinas a partir de parasitas viáveis (WEDRYCHOWICZ *et al.*, 1992) e o uso de plantas medicinais (AMORIM *et al.*, 1996) e de homeopatia (CABARET *et al.*, 2002).

A doramectina, 25-ciclohexil-5-*O*-dimetil-25-di(1-metilpropil)avermectinA_{1a}, é tida como uma base eficaz no tratamento e controle de ecto e endoparasitoses de bovinos, suínos e ovinos, recebendo a denominação de endectocida. Dentro de seu espectro de ação inclui-se a espécie *T. colubriformis*. Em ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. colubriformis*, a dose estimada para a remoção de 95% dos nematódeos foi 0,089 mg/Kg, por via subcutânea. Em coelhos, a dose utilizada para o tratamento eficaz de *Psoroptes cuniculi* foi de 100 µg/Kg, por via subcutânea (GOUDIE *et al.*, 1993).

2.2 Medicamentos Homeopáticos

A Homeopatia teve sua teoria elaborada por Samuel Hahnemann, médico alemão vivido no século XVIII, e baseia-se na Lei das Semelhanças e na ação de substâncias preparadas em doses mínimas (JONAS *et al.*, 2001).

Atualmente, é observada a difusão do uso de tratamentos homeopáticos em populações de animais de produção agroecológica para diversas enfermidades parasitárias (KEATINGE *et al.*, 2003). Entretanto, reconhece-se a necessidade de uma revisão de alguns conceitos abstratos relacionados com o paradigma “holístico”, muitas vezes empregado como única justificativa para o uso de determinada metodologia (JONAS *et al.*, 2001). Tal aspecto em muito limita a expansão dessa terapêutica no campo da pesquisa científica (BIOLCHINI, 1995).

Os medicamentos homeopáticos são preparados pela técnica das dinamizações, que se refere a diluições e triturações e/ou sucussões sucessivas. Essas substâncias são capazes de produzir, em indivíduos sadios e sensíveis à sua ação, sinais semelhantes às de suas indicações clínicas, produzindo uma “doença artificial” denominada patogenesia. Esses sinais ou sintomas patogenéticos são catalogados nas chamadas Matérias Médicas (HAHNEMANN, 1995).

O fármaco é dinamizado em água destilada com a finalidade de desenvolver o potencial medicamentoso, isto é, a potência, que agirá estimulando a reação do organismo contra a disfunção ou lesão orgânica, podendo ser conservado em insumo *inerte* adequado – veículo que pode ser álcool, sacarose ou lactose. As potências são representadas por escalas (proporções de insumo ativo: insumo inerte) que são: a centesimal hahnemanniana (1:100 e símbolo CH), a decimal hahnemanniana (1:10 e símbolo DH) e a cinquenta milesimal (1:50.000 e símbolo LM ou Q) (HAHNEMANN, 1995).

Para a escolha e prescrição do(s) medicamento(s), deve-se coletar os sintomas do indivíduo doente e consultar o Repertório Homeopático – índice de medicamentos referentes a cada sintoma. Para cada sintoma, são listados respectivos medicamentos, cada um com uma pontuação de um a três. Essa pontuação refere-se à frequência com que este medicamento causou o respectivo sintoma quando utilizado para gerar patogenesia em indivíduo saudável. Com os medicamentos que mais pontuaram em mãos, consulta-se a Matéria Médica para a seleção do medicamento cuja patogenesia é a mais semelhante ao quadro clínico a ser medicado. Hahnemann menciona ainda que a prescrição deve ser sempre

de um único medicamento pois o efeito de mais de um medicamento homeopático fornecidos juntos pode ser imprevisível (HAHNEMANN, 1995). Para se tratar rebanhos de animais, procede-se da mesma maneira, porém, coleta-se e repertoriza-se os sintomas da população e não do indivíduo (WYNN, 1998, SECO *et al.*, 1998).

A homeopatia apresenta poucos estudos experimentais que relatam a ação das diferentes potências de um mesmo medicamento. Observa-se, na prática, a prescrição de potências mais baixas (até 6CH) em doses repetidas e com intervalos curtos (mais de uma vez ao dia), potências médias (geralmente 12CH) repetidas com intervalos maiores (mais de uma vez por semana) e potências mais altas (acima de 30CH) em doses únicas ou repetidas com intervalos maiores (de semanas ou meses).

Preparações homeopáticas obtidas a partir de produtos biológicos e/ou patológicos, coletados do paciente (como secreções, tecidos ou órgãos lesados) ou obtidas de produtos de origem etiológica (como microorganismos, parasitas, toxinas ou alergenais) são chamadas de nosódios, bioterápicos ou isoterápicos. Essas preparações são usadas no tratamento e na prevenção de infecções. Teste experimental avaliando nosódio, quanto à indução de proteção natural para infecção por *Francisella tularensis* em camundongos, mostrou decréscimo na mortalidade do grupo tratado; porém, a proteção conferida mostrou-se bem menor que a dos animais vacinados (JONAS, 1999).

SECO *et al.* (1998) discutiram observações de resultados satisfatórios com homeoterápicos usados em populações de bovinos. Os autores sugerem que a ação medicamentosa se dá através de uma interação física entre átomos de oxigênio presentes em moléculas de água que compõem o medicamento e informações genéticas dos indivíduos tratados. Essas moléculas teriam suas intensidades vibracionais aumentadas, por meio de agitações sucessivas que sofrem durante o preparo do medicamento homeopático.

Ainda sobre os efeitos produzidos pela ação de campos magnéticos em água, alterados na presença de substâncias, um estudo afirma que a resposta biológica aplicação da água, após ter sido submetida a estes arranjos experimentais, parece reproduzir qualitativamente as respostas esperadas pela solução real utilizada como referência dentro do campo (PORTO, 1998).

DÍAZ *et al.* (1998) mostraram resultados positivos de aumento no ganho de peso, com o uso de homeoterápicos em coelhos. Já TAYLOR *et al.* (1989) e CABARET (1996) não sugerem diferenças significativas entre grupos de animais tratados e não tratados com homeoterápicos contra helmintoses, com fins profiláticos e curativos.

Relata-se, ainda, a boa aceitação de coelhos para a administração de medicamentos homeopáticos (DÍAZ *et al.*, 1998).

Não foram encontrados, para esta revisão, trabalhos científicos que inferissem sobre a eficácia anti-helmíntica dos homeoterápicos escolhidos para este estudo.

2.3 Métodos de Testes de Eficácia Anti-helmíntica para Nematódeos

A eficácia dos anti-helmínticos deve ser estabelecida antes de se indicar qualquer princípio ativo para o controle de verminoses (MATTOS & CASTRO, 2002).

Os testes úteis na avaliação de eficácia anti-helmíntica dividem-se em duas classes: *in vitro* e *in vivo*. Técnicas *in vitro* podem ser úteis para uma rápida e prévia interpretação de ação anti-helmíntica (JENKINS *et al.*, 1986), mas não são suficientes para determinar respostas definitivas de nematódeos frente a anti-helmínticos (MOSKEY & HARWOOD, 1941; HOPKINS, 1979).

Os testes *in vivo* podem ser subdivididos em: comparação de contagem de ovos em fezes antes e após tratamento; teste crítico - no qual todos os helmintos expelidos e os remanescentes são contados após necrópsia - e teste controlado - no qual dois grupos de animais artificialmente infectados são usados, sendo um grupo tratado e outro controle, e as cargas residuais de parasitas de cada grupo de hospedeiros após necrópsia são comparadas (MOSKEY & HARWOOD, 1941).

A contagem de ovos nas fezes não representa boa indicação da carga parasitária presente em infecções naturais. Tem como desvantagem a possibilidade de ocorrência de infecções mistas, visto que o método convencional de contagem de ovos não possibilita distinguir com clareza ovos de gêneros como *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Bunostomum* e *Oesophagostomum*. Além disso, os ovos podem não aparecer efetivamente nas fezes, já que alguns nematódeos podem ser mais fecundos que outros e podem apresentar o fenômeno de hipobiose – interrupção no desenvolvimento frente a condições desfavoráveis (MOSKEY & HARWOOD, 1941; HOPKINS, 1979).

Tanto o teste crítico como o teste controlado podem resultar em informações relevantes se executados com critérios. A combinação de mais de um método pode ser recomendada. Determinados casos, no entanto, podem requerer o desenvolvimento de novos métodos ou de modificações dos métodos citados (MOSKEY & HARWOOD, 1941).

O teste controlado tem sido muito utilizado para o estabelecimento preliminar do potencial de drogas ou para o diagnóstico de resistência. Muitas vezes utilizam-se animais acometidos por infecções naturais, porém, para avaliar a atividade de um medicamento sobre uma espécie isolada ou para avaliar resistência, recomenda-se a infecção artificial (HERLICH, 1976; HOPKINS, 1979). Outros autores também confirmam que o método mais definitivo para a análise de eficácia é através de um teste, *in vivo*, controlado (POWERS *et al.*, 1982; ALBERTI *et al.*, 2001).

Para que um antiparasitário de uso veterinário seja licenciado, é necessário seguir-se normas básicas de experimentações. Os critérios estabelecidos para a eficácia nos hospedeiros naturais são: altamente efetivos (eficácia > 98%); moderadamente efetivos (eficácia entre 80-89%); insuficientemente ativos (eficácia < 80% - não registrável) (PEREIRA, 1997).

O efeito de anti-helmínticos ou de diferentes doses do mesmo medicamento sobre a fecundidade do parasita também representa um parâmetro útil para a avaliação da pressão seletiva que a droga possa exercer. A fecundidade pode ser avaliada através da observação e contagem de ovos no útero das fêmeas (HOPKINS, 1979).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Localização do Experimento*

O experimento foi realizado no Setor de Doenças Infecto-contagiosas e Parasitárias do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) e nas instalações do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes – RJ.

3.2 *Animais e Manejo*

Foram utilizados 30 coelhos jovens, de aproximadamente um mês de idade, tipo carne, da raça Nova Zelândia, oriundos de criação comercial. Todos os animais tiveram sexo, idade e peso inicial registrados para distribuição horizontal entre os grupos e foram identificados com resenha. A distribuição dos grupos que receberam os diferentes tratamentos estão na Tabela 1. Os animais eram mantidos em gaiolas com bandejas forradas, em área coberta e higienizada diariamente. A alimentação consistia em ração comercial¹, isenta de aditivo medicamentoso, e água potável *ad libitum*.

Todos os animais passaram por um período de sete dias para aclimação desde que chegaram ao local do experimento. Os parâmetros avaliados foram registrados em fichas individuais (Anexo). Todos os animais foram submetidos a exame coproparasitológico pelo Método de Willis (WILLIS, 1927) e coprocultura (ROBERTS & O' SULLIVAN, 1950) para a certificação de estarem negativos para endoparasitas antes da inoculação das larvas de *Trichostrongylus colubriformis*.

¹ Multivita, Proxial.

Tabela 1 Distribuição dos grupos de coelhos tratados e controles

Animal	Sexo	Idade (dias)	Peso (g)	Tratamento
1	M	32	395	NI
2	M	32	418	NI
3	M	32	489	NI
4	F	28	330	NI
5	F	28	434	NI
6	F	28	336	NI
7	M	28	443	I
8	M	32	552	I
9	M	28	424	I
10	F	32	503	I
11	F	28	442	I
12	F	32	558	I
13	M	32	522	ITTc
14	M	32	523	ITTc
15	M	28	432	ITTc
16	F	28	442	ITTc
17	F	32	487	ITTc
18	F	32	476	ITTc
19	M	32	504	ITFV
20	M	28	433	ITFV
21	M	28	471	ITFV
22	F	32	468	ITFV
23	F	32	518	ITFV
24	F	32	579	ITFV
25	M	28	390	ITD
26	M	32	479	ITD
27	M	28	288	ITD
28	F	32	496	ITD
29	F	32	443	ITD
30	F	28	306	ITD

M - Macho; F - Fêmea; NI - Não Infectados; I - Infectados; ITTc - Infectados e Tratados com *Trichostrongylus colubriformis* 30CH; ITFV - Infectados e Tratados com Fator Vermes®; ITD - Infectados e Tratados com Doramectina

3.3 Infecção Experimental

As larvas infectantes (L₃) que constituíram os inóculos foram obtidas através de coprocultura a partir de fezes de coelhos infectados experimentalmente com cepa de *Trichostrongylus colubriformis* de ovinos. A espécie foi identificada através da morfologia de nematódeos adultos.

No momento da inoculação, as larvas foram ativadas em estufa (35°C) e redistribuídas em tubos, de modo a padronizar o tempo de conservação. Após a certificação da motilidade, as larvas foram imobilizadas com lugol e contadas em alíquotas de 100µL, em triplicata.

Os inóculos foram padronizados de modo que os animais dos grupos que receberam os tratamentos I, ITTc, ITFV e ITD fossem inoculados, via oral, com a dose média de 3×10^3 L₃ suspensas em água destilada. O volume variou entre 2,0 e 6,0 mL da suspensão homogênea. Os animais do grupo NI receberam apenas água destilada.

3.4 Medicamentos Homeopáticos e Padrão de Referência

Por tratar-se de uma infecção experimental, onde os animais não apresentaram sintomas da doença que pudessem ser utilizados pelo método da repertorização, preconizado por HAHNEMANN, (1995), para a prescrição homeopática, optou-se, neste estudo, pela utilização de um nosódio vivo e de um medicamento comercial, também à base de nosódios, e amplamente difundido em criações ecológicas.

O grupo ITTc recebeu o nosódio *Trichostrongylus colubriformis* 30CH na forma de tabletes, na dose de oito tabletes diários, triturados, umedecidos e incorporados ração, a partir do momento que se estabeleceu a patência em todos os animais do grupo, ou seja, 21 dias após a infecção. Os animais desse grupo foram necropsiados sete dias após o início da medicação.

O medicamento homeopático *Trichostrongylus colubriformis* 30CH foi manipulado em farmácia homeopática especializada* a partir de uma amostra das larvas infectantes usadas na infecção dos animais, ou seja, obtidas, por coprocultura, de fezes de coelhos infectados experimentalmente. A amostra remetida à farmácia continha aproximadamente 2×10^3 L₃ vivas e com intensa motilidade.

No tratamento ITFV, administrou-se o produto comercial Fator Vermes®** na dose de 5 g diárias, umedecido e incorporado à ração, a partir do quinto dia após a infecção. Tal produto traz em sua formulação nosódios de nematódeos de ruminantes, entre eles o *Trichostrongylus colubriformis* na potência 12CH.

Os dois medicamentos homeopáticos foram devidamente mantidos em local sombreado, longe de aparelhos elétricos, de outros medicamentos e de substâncias que exalam odor.

Os animais do grupo ITD receberam o anti-helmíntico utilizado como padrão de referência - Dectomax® (Doramectina)*** – na dose única de 200 µg/Kg, por via subcutânea, 21 dias após a infecção. Assim como os animais do grupo ITTc, estes foram necropsiados com sete dias de medicação.

3.5 Parâmetros Avaliados

Foram avaliados aspectos parasitários, clínicos e zootécnicos.

Após a inoculação, os animais foram diariamente submetidos a exames de fezes pelo Método de Willis para o estabelecimento do período pré-patente. Após o início da patência, os exames de fezes foram efetuados em três momentos, pelo Método de Gordon & Whitlock (GORDON & WHITLOCK, 1939) modificado, em triplicata, utilizando-se Câmara

* Farmácia Homeopática Átomo Dr. Roberto Costa, Rio de Janeiro, RJ.

** Laboratório Fauna & Flora Arenales, Presidente Prudente, SP.

*** Laboratório Pfizer, Guarulhos, SP.

McMaster e 4g de fezes para 56mL de solução hipersaturada de NaCl, multiplicando-se o resultado pelo fator 50 (UENO & GONÇALVES, 1994). As fezes também foram submetidas à coprocultura e as larvas obtidas foram contadas para a avaliação da viabilidade dos ovos. Contou-se as larvas infectantes extraídas de coprocultura em 100µL da suspensão em água destilada, em triplicata. Para esta coprocultura utilizou-se 10g de fezes de cada animal.

Todos os animais foram necropsiados 28 dias após a infecção, exceto os animais do grupo NI, que foram apenas pesados para o registro do peso vivo final e submetidos a exames de fezes para constatação da manutenção da negatividade para endoparasitas.

Para a recuperação dos helmintos à necrópsia, seguiu-se a metodologia descrita por UENO & GONÇALVES (1994). Do mesmo modo que no trabalho de HERLICH (1976), somente foram considerados para o cálculo da eficácia dos tratamentos, os helmintos recuperados no intestino delgado dos animais.

Vinte fêmeas adultas de *T. colubriformis* obtidas de cada animal foram coradas com solução de lugol para observação e contagem dos ovos presentes no interior do útero. Todos os estágios evolutivos dos ovos foram contados. A observação foi feita através de microscopia óptica e aumento de 40x.

As contagens de ovos por grama de fezes (OPG) individuais foram aqui realizadas em três momentos para todos os grupos. No dia 21, após a infecção (antes da medicação dos grupos ITTc e ITD), no dia 22 e no dia 27 após a infecção.

Na avaliação dos parâmetros clínicos, os animais foram inspecionados diariamente para o registro de qualquer alteração no comportamento (estado de alerta, presença de coprofagia) e aspectos da pele, dos pêlos e de mucosas aparentes. Os aspectos zootécnicos registrados foram ganho de peso, consumo diário de ração, em matéria seca, e conversão alimentar.

Amostras da ração comercial oferecida, das fezes e das sobras de ração dos animais passaram pela pré-secagem em estufa a 60°C por 72 horas, pela moagem e pela secagem propriamente dita (105°C/12 horas) para os cálculos da matéria seca.

A conversão alimentar foi calculada dividindo-se o consumo de matéria seca (g/dia) pelo ganho de peso (g/dia) referente ao mesmo intervalo de tempo.

3.6 Delineamento Experimental e Cálculo da Eficácia

Utilizou-se o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), onde a unidade experimental era o coelho e o bloco era o sexo, com cinco tratamentos e três repetições.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de Análise de Variância e testes para comparação de médias ($P < 0,05$).

As contagens de ovos por grama de fezes (OPG) foram avaliadas segundo arranjo de medidas repetidas no tempo com comparações por análise de perfil, devido a grande variação dos dados.

O efeito dos medicamentos sobre a remoção dos helmintos adultos foi avaliado através de um teste controlado. Segundo CONDER *et al.* (1991) e CHARTIER *et al.* (1995), a eficácia de um tratamento anti-helmíntico pode ser expressa em termos de percentuais através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de eficácia} = [(\text{média de helmintos}^* \text{ do grupo controle} - \text{média de helmintos}^* \text{ do grupo tratado}) / \text{média de helmintos}^* \text{ do grupo controle}] \times 100$$

* helmintos recuperados à necrópsia

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Atividade da Doramectina

4.1.1 Aspectos Clínicos e Zootécnicos

Não foram observados sinais clínicos nos animais, tanto do grupo ITD como do grupo I. Apenas observou-se a presença de muco nas fezes de três animais, nos dois dias seguintes à medicação, o que as caracterizava como fezes amolecidas, com sibalas formadas porém aderidas umas às outras.

Não houve sinal de intoxicação pela droga nos animais. No entanto, não foram realizados exames específicos para avaliar a toxicidade nos coelhos, o que não permite inferir a respeito da segurança da dose aplicada.

Os dados relativos aos aspectos zootécnicos avaliados encontram-se nas Tabelas 2 e 3. Ganho de peso médio, peso vivo final e peso de carcaça, bem como consumo de matéria seca e conversão alimentar, não sofreram alterações mediante os tratamentos.

O delineamento em blocos separados pelo sexo permitiu averiguar que os coelhos machos e fêmeas apresentaram semelhantes respostas frente ao medicamento ($P>0,05$).

Tabela 2 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM - g/dia), consumo de matéria seca (CMS - g/dia) e conversão alimentar (CA - g/g), de acordo com os diferentes tratamentos.

Ítem	Tratamento			Valor-P	CV(%)
	NI	I	ITD		
GPM ¹	11,8	11,0	11,4	0,2771	13,0
CMS ¹	76,9	79,7	84,7	0,6940	11,6
CA ¹	6,79	7,29	7,5	0,3831	10,5

¹ Efeito relativo a tratamentos não-significativo pelo teste F ($P>0,05$), onde NI - Não Infectados; I - Infectados; ITD - Infectados e Tratados com a Doramectina

Tabela 3 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis peso vivo final (PVF) e peso de carcaça (PC), de acordo com os diferentes tratamentos

Ítem	Tratamento*			Valor-P	CV(%)
	NI	I	ITD		
PVF	757,4 a	795,2 a	763,5 a	0,6412	13,7
PC	-	375,0 a	395,4 a	0,5000	12,3,5

* Médias na mesma linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P<0,05$), onde NI - Não Infectados; I - Infectados; ITD- Infectados e Tratados com a Doramectina)

4.1.2 Aspectos Parasitários

O período pré patente variou de 17 a 19 dias nos 12 animais dos grupos ITD e I. A contagem de ovos por grama de fezes está expressa através de médias e coeficiente de variação, na Tabela 4. Houve clara diferença entre os grupos após a medicação (teste F, $P<0,05$), visto que o grupo medicado não apresentou ovos nas fezes.

Tabela 4 Médias das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais infectados (I) e infectados e tratados com doramectina (ITD)

Item*	Tratamento		Valor-P	CV(%)
	I	ITD		
OPG1	466,7	381,5	0,1469	20,4
OPG2	483,3	0	-	-
OPG3	375,0	0	-	-

* Avaliações realizadas em três diferentes momentos: 21 dias após a infecção e antes da medicação (OPG1); 22 e 27 dias após a infecção (OPG2 e OPG3)

4.1.3 Eficácia

A eficácia, para o medicamento Dectomax®, foi de 100%, visto que não foram recuperados nematódeos *A. necropsia* de todos os animais, bem como não foram encontrados ovos nas fezes e larvas infectantes, por coprocultura, após a medicação.

O efeito anti-helmíntico exercido pela doramectina é atribuído ao seu mecanismo de ação primário, que consiste em alterar a atividade de troca de íons cloro no sistema nervoso dos agentes (adultos e larvas de quarto estágio), bloqueando os receptores que aumentam a permeabilidade da membrana. Isto inibe a atividade elétrica das células nervosas e musculares, causando paralisia e morte dos helmintos (GOUDIE *et al.*, 1993).

4.2 Avaliação da Atividade do *Nosódio Trichostrongylus colubriformis* 30CH

4.2.1 Aspectos Clínicos e Zootécnicos

Todos os animais permaneceram clinicamente sadios, alimentando-se normalmente e sem modificações de comportamento durante todo o período das avaliações.

As análises estatísticas dos resultados revelaram não haver alteração significativa nos aspectos zootécnicos entre os grupos de animais controle e o grupo tratado (Tabelas 5 e 6). Como o período estudado da infecção não provocou sintomatologia nos animais, não foi possível registrar a ação terapêutica do medicamento homeopático sobre os aspectos clínicos.

Nesta etapa do trabalho, também se verificou a não influência do sexo dos hospedeiros sobre os resultados.

Tabela 5 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM - g/dia), consumo de matéria seca (CMS - g/dia) e conversão alimentar (CA - g/g), de acordo com os diferentes tratamentos.

Ítem	Tratamento			CV(%)
	NI	I	ITTc	
GPM ¹	11,8	11,0	12,6	16,8
CMS ¹	76,9	79,7	79,2	1,9
CA ¹	6,79	7,29	6,29	7,4

¹ Efeito relativo a tratamentos não-significativo pelo teste F ($P > 0,05$), onde NI - Não Infectados; I - Infectados; ITTc- Infectados e Tratados com *Trichostrongylus colubriformis* 30CH

Tabela 6 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis peso vivo final (PVF) e peso de carcaça (PC), de acordo com os diferentes tratamentos

Ítem	Tratamento*			CV(%)
	NI	I	ITTc	
PVF	757,4 a	795,2 a	846,0 a	5,6
PC	-	375,0 a	441,7 a	11,5

* Médias na mesma linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), onde NI - Não Infectados; I - Infectados; ITTc - Infectados e Tratados com *Trichostrongylus colubriformis* 30CH

4.2.2 Aspectos Parasitários

Os resultados de período pré-patente e contagem de ovos por grama de fezes (OPG) estão apresentados na Tabela 7 e na Figura 1, respectivamente. Nas análises de OPG pode-se constatar que da primeira para a segunda mensuração, o grupo de animais infectados (I) manteve o nível da eliminação de ovos, ao passo que os animais medicados (ITTc) tiveram uma redução significativa estatisticamente no OPG. No entanto, da segunda para a terceira avaliação, os animais do grupo ITTc mantiveram o nível de OPG enquanto os animais não medicados (I) apresentaram redução na contagem de ovos, aproximando-se do grupo tratado.

Devido à enorme variação dos resultados nas contagens de OPG, utilizou-se a transformação logarítmica para que os dados pudessem ser analisados com maior confiança. Essa variação indica que o teste de redução na contagem de OPG, como método de investigação de tratamentos antiparasitários, pode apresentar falhas que limitam sua eficiência.

Segundo ALBERTI *et al.* (2001), para algumas espécies nem sempre existe uma correlação direta entre a prolificidade da fêmea do parasita e o número de parasitas presentes. Além disso, a contagem de ovos pode ser temporariamente suprimida por conta de diversas razões. O número de indivíduos examinados também pode ter contribuído para a ocorrência das oscilações.

Os animais do grupo não infectado (NI) permaneceram negativos ao exame coproparasitológico por todo o período experimental.

Tabela 7 Período pré-patente (PPP) e contagem de ovos por grama de fezes dos coelhos infectados (I) e infectados e tratados com *Trichostrongylus colubriformis* 30CH (ITTc)

Animal	Sexo	Tratamento	PPP (dias)	OPG1 ¹	OPG2 ¹	OPG3 ¹
1	M	I	19	400	400	300
2	M	I	18	500	450	350
3	M	I	18	550	600	450
4	F	I	18	400	500	400
5	F	I	18	350	450	300
6	F	I	18	600	500	450
7	M	ITTc	18	600	550	450
8	M	ITTc	18	400	300	350
9	M	ITTc	19	400	300	300
10	F	ITTc	18	250	400	350
11	F	ITTc	19	250	450	400
12	F	ITTc	18	550	350	300

¹ Avaliações realizadas em três diferentes momentos: 21 dias após a infecção e antes da medicação (OPG1); 22 e 27 dias após a infecção (OPG2 e OPG3)

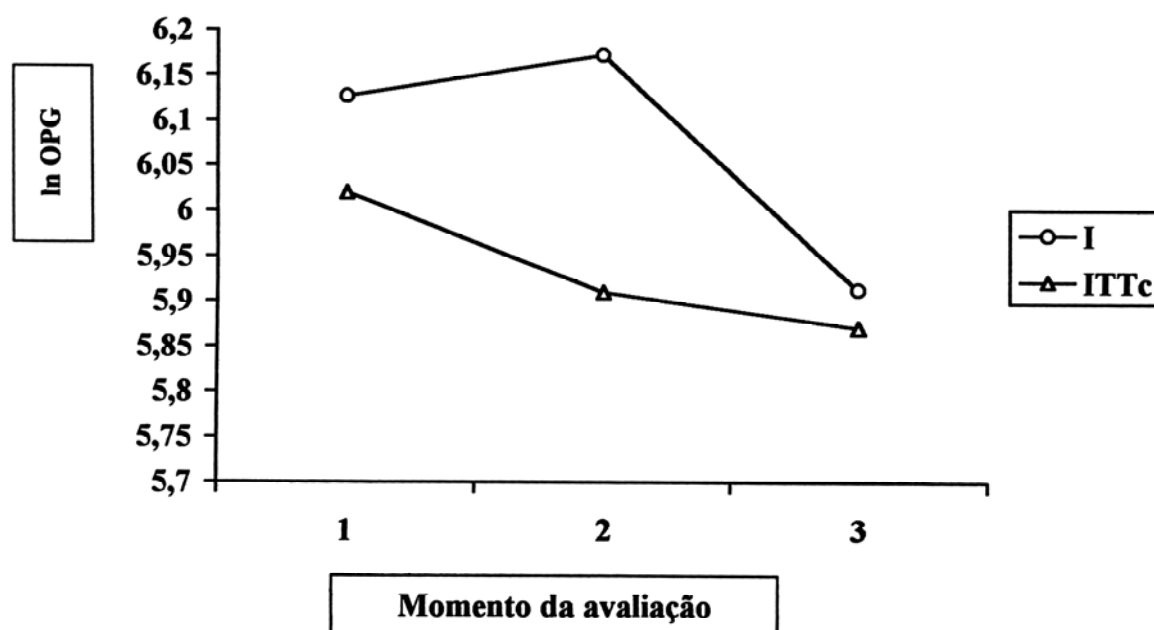


Figura 1 Comportamento descritivo para o logaritmo natural da contagem fecal de ovos (OPG) (ln ovos/grama de fezes), de acordo com os diferentes tratamentos, sendo os momentos das avaliações referentes a 21, 22 e 27 dias após a infecção

Em todos os animais infectados, recuperou-se nematódeos adultos vivos, no intestino delgado. A intensidade média de helmintos machos e fêmeas, além da relação entre o número de nematódeos obtidos e o número de larvas infectantes do inóculo estão expressos na Tabela 8. Verificou-se índices mais elevados de adultos, em relação ao número de larvas infectantes inoculadas, mesmo nos animais medicados, quando comparados aos índices obtidos por COUTINHO (1983). A população de adultos variou de 11,67 a 32,33% em relação ao

inóculo. Segundo HERLICH (1976), a obtenção de uma população de adultos variando de 10 a 50%, após a passagem pelo coelho, somada a característica de sobrevivência e infectividade das larvas de *T. colubriformis*, que se mantêm por longo período sob refrigeração, promovem uma base suficiente para triagens anti-helmínticas, com dados conclusivos podendo ser obtidos em curto espaço de tempo.

Na Tabela 9, pode ser evidenciado a comparação das médias das contagens de adultos (machos, fêmeas e total), de larvas infectantes recuperadas de coprocultura após medicação e de ovos no útero do nematódeo.

Em concordância com HOPKINS (1979), aqui também foram recuperados, de um modo geral, nematódeos fêmeas em maior número (Tabela 8). Observa-se (Tabela 9) que o tratamento ITTc exerceu efeito significativo sobre a população global de helmintos, de machos e de fêmeas.

Não houve diferença significativa para as médias de larvas obtidas de cultura das fezes após o tratamento, bem como para a contagem de ovos no útero, o que indica que não houve efeito do tratamento sobre a viabilidade dos ovos e a fecundidade parasitária.

Tabela 8 População estimada de nematódeos machos, de nematódeos fêmeas e população global, obtidas nos coelhos infectados, e sua relação (%) com a dose infectante de 3×10^3 L₃

Tratamento	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> adultos				
	Machos	Fêmeas	Total	Fêmeas:Machos	%
I	240	370	610	1,54:1,00	20,33
I	200	280	480	1,40:1,00	16,00
I	270	405	675	1,50:1,00	22,50
I	240	330	570	1,38:1,00	19,00
I	280	690	970	2,46:1,00	32,33
I	285	380	665	1,33:1,00	22,17
ITTc	170	255	425	1,50:1,00	14,17
ITTc	150	205	355	1,37:1,00	11,83
ITTc	115	235	350	2,04:1,00	11,67
ITTc	155	255	410	1,65:1,00	13,67
ITTc	185	300	485	1,62:1,00	16,17
ITTc	165	325	490	1,97:1,00	16,33

I - Infectados; ITTc – Infectados e Tratados com *Trichostrongylus colubriformis* 30CH

Tabela 9 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis número de larvas infectantes obtidas sete dias após medicação (Larvas); população de nematódeos machos à necropsia (Machos); população de nematódeos fêmeas à necropsia (Fêmeas); população global (Total) e número de ovos no útero (Ovos)

Item	Tratamento*		CV(%)
	I	ITTc	
Larvas	2291,7 a	2175,0 a	19,7
Machos	252,5 a	156,7 b	24,9
Fêmeas	409,2 a	262,5 b	17,2
Total	661,7 a	419,2 b	18,6
Ovos	15,9 a	15,0 a	22,4

* Médias na mesma linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), onde I - Infectados; ITTc - Infectados e Tratados com *Trichostrongylus colubriformis* 30CH

4.2.3 Eficácia

A eficácia calculada para o tratamento ITTc, utilizando o nosódio *Trichostrongylus colubriformis* 30CH, foi de 36,65%.

A eficácia comprovada por este estudo não torna o protocolo testado suficiente para efeito de uso regular em programas de controle parasitário que inclua a espécie *Trichostrongylus colubriformis*, havendo a necessidade de novas pesquisas que ampliem o conhecimento para outros aspectos da atividade da preparação.

É importante ressaltar que este trabalho expressa uma avaliação preliminar da atividade anti-helmíntica de um produto, e, embora a eficácia do nosódio tenha se mostrado pouco expressiva perante as normas de licenciamento de medicamentos veterinários (PEREIRA, 1997), a abordagem homeopática pode ser útil apesar da não eliminação plena do agente.

4.3 Avaliação da Atividade do Nosódio Fator Vermes®

4.3.1 Aspectos Clínicos e Zootécnicos

Tanto os animais tratados com Fator Vermes® como os animais controle não apresentaram nenhuma alteração de comportamento ou sinais clínicos durante o período das observações.

Os resultados das análises estatísticas revelaram que não houve alteração significativa nos aspectos zootécnicos entre os grupos de animais controle e tratados, avaliados nessa etapa do experimento (Tabelas 10 e 11).

Também não houve diferença nos resultados ($P > 0,05$), atribuída a influência do sexo dos hospedeiros.

Tabela 10 Médias de mínimos quadrados e coeficientes de variação (CV) para as variáveis ganho de peso médio (GPM - g/dia), consumo de matéria seca (CMS - g/dia) e conversão alimentar (CA - g/g), de acordo com os diferentes tratamentos

Ítem	Tratamento			CV(%)
	NI	I	ITTc	
GPM ¹	11,8	11,0	13,0	8,4
CMS ¹	76,9	79,7	77,2	1,9
CA ¹	6,79	7,29	5,95	10,1

¹ Efeito relativo a tratamentos não-significativo pelo teste F ($P>0,05$), onde NI - Não Infectados; I - Infectados; ITFV - Infectados e Tratados com Fator Vermes®

Tabela 11 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis peso vivo final (PVF) e peso de carcaça (PC), de acordo com os diferentes tratamentos

Ítem	Tratamento*			CV(%)
	NI	I	ITFV	
PVF	757,4 a	795,2 a	868,7 a	7,0
PC	-	375,0 a	433,3 a	10,2

* Médias na mesma linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P<0,05$), onde NI - Não Infectados; I - Infectados; ITFV - Infectados e Tratados com Fator Vermes®

4.3.2 Aspectos Parasitários

Os resultados de período pré-patente e contagem de ovos por grama de fezes (OPG) estão apresentados na Tabela 12 e na Figura 2, respectivamente. Nas análises de OPG pode-se constatar que da primeira para a segunda mensuração, o grupo de animais infectados (I) manteve o nível da eliminação de ovos, ao passo que os animais medicados (ITFV) tiveram uma redução significativa no OPG. No entanto, da segunda para a terceira avaliação, os animais do grupo ITFV mantiveram o nível de OPG enquanto os animais não medicados (I) apresentaram redução na contagem de ovos, aproximando-se do grupo tratado, do mesmo modo que no teste para o tratamento ITTc.

Nesta etapa do trabalho, também se observou grande variação dos resultados de contagens de OPG; portanto, utilizou-se a transformação logarítmica para que os dados pudessem ser analisados estatisticamente. Como a contagem de ovos pode ser temporariamente suprimida por fatores inerentes ao hospedeiro, e devido também ao número de avaliações de OPG, não se pôde inferir sobre a atuação do produto neste aspecto.

Os animais do grupo não infectado (NI) permaneceram negativos ao exame coproparasitológico, por todo o período experimental.

Tabela 12 Período pré-patente (PPP) e contagem de ovos por grama de fezes dos coelhos infectados (I) e infectados e tratados com Fator Vermes® (ITFV)

Animal	Sexo	Tratamento	PPP (dias)	OPG1 ¹	OPG2 ¹	OPG3 ¹
1	M	I	19	400	400	300
2	M	I	18	500	450	350
3	M	I	18	550	600	450
4	F	I	18	400	500	400
5	F	I	18	350	450	300
6	F	I	18	600	500	450
13	M	ITFV	19	350	200	250
14	M	ITFV	18	250	300	250
15	M	ITFV	18	400	300	300
16	F	ITFV	20	500	600	550
17	F	ITFV	20	650	600	500
18	F	ITFV	18	550	350	400

¹ Avaliações realizadas em três diferentes momentos: 21 dias após a infecção e antes da medicação (OPG1); 22 e 27 dias após a infecção (OPG2 e OPG3)

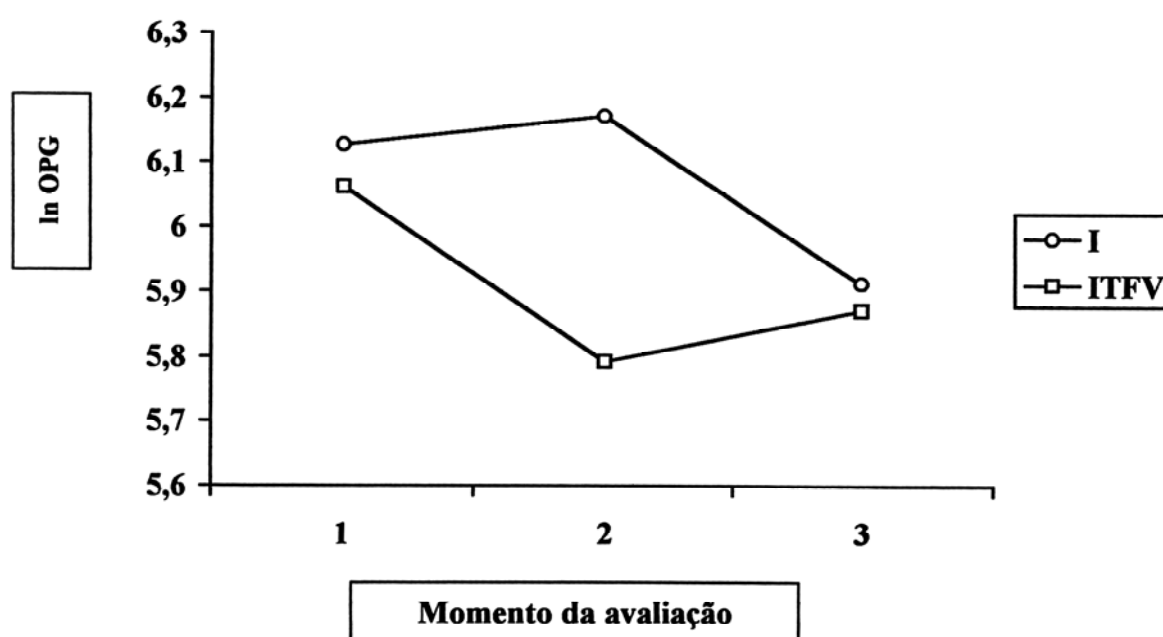


Figura 2 Comportamento descritivo para o logaritmo natural da contagem fecal de ovos (OPG) (ln ovos/grama de fezes), de acordo com os diferentes tratamentos, sendo os momentos das avaliações referentes a 21, 22 e 27 dias após a infecção

Em todos os animais infectados, foram recuperados nematódeos adultos vivos, no intestino delgado. A intensidade média de helmintos machos e fêmeas, além da relação entre o número de nematódeos obtidos e o número de larvas infectantes do inóculo estão expressos na Tabela 13. Em confirmação aos resultados mostrados no Capítulo I e no teste com o tratamento ITTc, sobre o desenvolvimento de maior número de adultos comparando-se ao

trabalho de COUTINHO (1983), aqui também se verificou índices mais elevados, mesmo nos animais medicados. Com um número maior de animais nesta etapa, reforça-se a hipótese de que coelhos mais jovens são mais sensíveis à instalação da infecção, também reportada por PURVIS & SEWELL (1972). A população de adultos variou de 15,83 a 32,33% em relação ao inóculo.

A Tabela 14 mostra a comparação das médias das contagens de adultos (machos, fêmeas e total), de larvas infectantes recuperadas de coprocultura após medicação e de ovos no útero do nematódeo.

Recuperou-se, em todos os animais, nematódeos fêmeas em maior número (Tabela 13), o que se assemelha aos resultados de HOPKINS (1979). Observa-se (Tabela 14) que o tratamento ITFV não afetou significativamente o número de machos mas exerceu efeito significativo sobre o número de fêmeas e sobre a população global de helmintos. Pode-se especular que o tratamento ITFV tenha efeito inicial sobre as fêmeas, ou, ainda, que a condição das fêmeas de estarem em maior número, tenha facilitado sua expulsão.

Não houve diferença significativa para as médias de larvas obtidas de cultura das fezes após o tratamento, bem como para a contagem de ovos no útero do nematódeo, indicando que aqui também não houve efeito do tratamento sobre a viabilidade dos ovos e a fecundidade parasitária.

Tabela 13 População estimada de nematódeos machos, de nematódeos fêmeas e população global, obtidas nos coelhos infectados, e sua relação (%) com a dose infectante de 3×10^3 L₃

Tratamento	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> adultos				
	Machos	Fêmeas	Total	Fêmeas:Machos	%
I	240	370	610	1,54:1,00	20,33
I	200	280	480	1,40:1,00	16,00
I	270	405	675	1,50:1,00	22,50
I	240	330	570	1,38:1,00	19,00
I	280	690	970	2,46:1,00	32,33
I	285	380	665	1,33:1,00	22,17
ITFV	160	315	475	1,97:1,00	15,83
ITFV	195	290	485	1,49:1,00	16,17
ITFV	280	360	640	1,29:1,00	21,33
ITFV	240	380	620	1,58:1,00	20,67
ITFV	235	285	520	1,21:1,00	17,33
ITFV	190	300	490	1,58:1,00	16,33

I - Infectados; ITFV - Infectados e Tratados com Fator Vermes®

Tabela 14 Médias e coeficientes de variação (CV) para as variáveis número de larvas infectantes obtidas sete dias após medicação (Larvas); população de nematódeos machos à necropsia (Machos); população de nematódeos fêmeas à necropsia (Fêmeas); população global (Total) e número de ovos no útero (Ovos)

Item	Tratamento*		CV(%)
	I	ITFV	
Larvas	2291,7 a	2250,0 a	17,6
Machos	252,5 a	216,7 a	27,8
Fêmeas	409,2 a	321,7 b	37,9
Total	661,7 a	538,3 b	32,2
Ovos	15,9 a	16,9 a	23,5

* Médias na mesma linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), onde I - Infectados e ITFV - Infectados e Tratados com Fator Vermes®

4.3.3 Eficácia

A eficácia calculada para o tratamento ITFV, utilizando o produto Fator Vermes®, foi de 18,64%.

Há de se considerar que o produto utilizado em ITFV não tem indicação para coelhos, assim como o produto à base de doramectina usado como padrão de referência. Para o produto homeopático, esse fato pode ser bastante relevante, pois em se tratando de um bioterápico, manipulado a partir de material biológico, a origem desse material pode provocar maior ou menor resposta reativa do hospedeiro. Talvez o fato do tratamento mais efetivo (ITTc) ter utilizado um nosódio preparado com material extraído de coelhos tenha influenciado positivamente sua ação.

Na literatura consultada, não há relatos de experimentos utilizando os medicamentos aqui avaliados, para o tratamento da tricostrongilose, sendo este o primeiro relato sobre tais protocolos. Isso significa que muitos parâmetros ainda podem ser estudados, utilizando estas ou outras posologias, ou ainda a combinação de nosódios com outros princípios ativos. Embora isso não seja proposto pela teoria inicial da homeopatia (HAHNEMANN, 1995), que preconiza o unicismo – ou prescrição do medicamento único, CASTILHOS *et al.* (2003) obtiveram sucesso no tratamento de ovariopatias císticas de bovinos utilizando um protocolo com três medicamentos homeopáticos.

O fato é que houve a ação dos produtos homeopáticos, individualmente testados neste estudo, sobre a remoção de uma parcela de helmintos. E isto não pode ser relegado diante de um problema que não será erradicado, mas deve sim ser controlado, que é a verminose em animais de produção. Obviamente, são necessárias as repetições, o aprimoramento de uma metodologia científica cada vez mais próxima dos conceitos homeopáticos, testes em hospedeiros naturais e estudos paralelos sobre os aspectos epidemiológicos e de manejo em uma população animal acometida. Sob essa nova perspectiva científica, a homeopatia poderá ser, ainda mais efetivamente, uma importante aliada na luta por baixar o custo do tratamento anti-parasitário e minimizar o uso de produtos tóxicos e poluentes na produção de alimentos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, com coelhos infectados experimentalmente com *Trichostrongylus colubrifomis* e, de acordo com os protocolos utilizados, permitiram as seguintes conclusões:

- a) A eficácia anti-helmíntica do tratamento utilizando a Doramectina foi de 100%.
- b) A eficácia anti-helmíntica dos tratamentos utilizando os nosódios *Trichostrongylus colubrifomis* 30CH e Fator Vermes®, em relação ao número de nematódeos adultos recuperados à necropsia, foram de 36,65% e 18,64%, respectivamente.
- c) Não houve diferença significativa no comportamento, consumo de matéria seca e conversão alimentar, peso vivo final e peso de carcaça dos animais, entre os diferentes tratamentos.
- d) Não houve diferença significativa no número de larvas infectantes obtidas por coprocultura, entre os grupos controle e tratados com os nosódios.
- e) Foi obtido maior número de nematódeos fêmeas de *T. colubrifomis* em relação a machos, em todos os coelhos necropsiados.
- f) Não houve diferença significativa no número de ovos no útero do nematódeo, entre os grupos controle e tratados com os nosódios.
- g) O sexo dos coelhos não influenciou nos aspectos clínicos, zootécnicos e parasitários avaliados frente aos tratamentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI, H.; ALBERTI, A. L. L.; BORDIN, B. E. L.; SILVA JR., C. I. F. Algumas considerações sobre a resistência dos parasitos aos antiparasitários e métodos de avaliação. *A Hora Veterinária*, v.21, n.123, p.36-40, 2001.
- AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Survey of anthelmintic treatment with oxfendazole, ivermectin and levamisole in sheep flocks. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.29, n.1, p.31-38, 1992.
- AMORIM, A.; RODRIGUES, M. L. A.; BORBA, H. R. Ação anti-helmíntica de plantas XII. Influência de extratos vegetais in vitro na viabilidade de larvas de nematódeos gastrointestinais de bovinos. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.77, n.2, p.47-48, 1996.
- BARNES, E. H.; DOBSON, R. J. Persistence of acquired immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep after termination of infection. *International Journal for Parasitology*, v.23, n.8, p.1019-1026, 1993.
- BIOLCHINI, J. C. A. O contexto científico atual da homeopatia. *Homeopatia Brasileira*, v. 2, n. 1, p.242-246, 1995.
- CABARET, J. The homeopathic Cina does not reduce the egg output of digestive-tract nematodes in lambs. *Revista de Medicina Veterinária*, v.146, p. 445-446, 1996.
- CABARET, J.; BOUILHOL, M.; MAGE, C. Managing helminthes of ruminants in organic farming. *Veterinary Research*, v.5, p.625-640, 2002.
- CASTILHOS, L. R.; SOUZA, J. C.; PINTO, L. F.; ALBUQUERQUE, F. T.; FILGUEIRAS, E. P. Avaliação da terapêutica homeopática nas ovariopatias císticas de bovinos leiteiros. *Homeopatia Brasileira*, v.9, n.1, p.5-15, 2003.
- CHARTIER, C.; PORS, I.; BENOIT, C. Efficacy of pyrantel tartrate against experimental infections with *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goats. *Veterinary Parasitology*, v.59, p.69-73, 1995.
- CONDER, G. A.; JOHNSON, S. S.; GUIMOND, P. M.; COX, D. L.; LEE, B. L. Cocurrent infections with the ruminant nematodes *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in jirds, *Meriones unguiculatus*, and use of this model for anthelmintic studies. *Journal of Parasitology*, v.77, n.4, p.621-623, 1991.
- CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. *Similia similibus curentur*: notação histórica da medicina homeopática. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, n.4, p.347-351, 1997.
- COUTINHO, Vanda. *Infecções experimentais no coelho (Oryctolagus cuniculus L.) com nematódeos gastrintestinais de ovinos, bovinos e eqüinos*. 1983. 70 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1983.

DÍAS, J. M. C.; NOSEDA, B. B.; DODERO, J. A. A.; SANCHEZ, J. M.; RUIPÉREZ, F. H. Investigación en conejos com productos homeopáticos. *Lagomorpha*, n. 97. p. 29-34. 1998.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.62, p.199-206, 1996.

GOMES, A. P. S.; RAMOS, M. L.; VASCONCELLOS, R. S.; JENSEN, J. R.; VIEIRA-BRESSAN, M. C. R.; ARAÚJO, J. V. *In vitro* activity of brazilian strains of the predatory fungi *Arthrobotrys* spp. on free-living nematodes and infective larvae of *Haemonchus placei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, n.6, p.873-876, 2000.

GORDON, H. McL.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep *faeces*. *J. Commnw. Sci. And Indst. Organization*, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

GOUDIE, A. C.; EVANS, N. A.; GRATION, K. A., F.; BISHOP, B. F.; GIBSON, S. P.; HOLDOM, K. S.; KAYE, B.; WICKS, S. R.; LEWIS, D.; WEATHERLEY, A., J.; BRUCE, C. I.; HERBERT, A.; SEYMOUR, D. J. Doramectin - a potent novel endectocide. *Veterinary Parasitology*, v.49, p.5-15, 1993.

HAHNEMANN, S. Tradução por GEHSP “Benoit Mure” *Exposição da doutrina homeopática ou Organon da arte de curar*. 6 ed. São Paulo: GEHSP “Benoit Mure”, 1995. 191p.

HASSANAIN, M. A.; ABD EL AZIZ, M. M.; ABOU EL EZZ, N. M. Nematicidal effect of *Bacillus thuringiensis* on *Trichostrongylus colubriformis* infesting rabbits. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION WORLD CONGRESS, 2001, Vancouver. *Proceedings...* Vancouver, 2001.

HERLICH, H. The rabbit – *Trichostrongylus axei*: *T. colubriformis* system as a preliminary screen for testing potential anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, v.2, p.377-383, 1976.

HOPKINS, P. G. *The experimental establishment of populations of Nematodirus battus and Trichostrongylus colubriformis, nematode parasites of the intestine of sheep, in laboratory rabbits: dose dependent fratures of the establishment, and use of surch populations in the study of resistance to anthelmintics*. 1979. 228 p. Thesis (Ph.D. of Philosophy in the Faculty of Science) University of Edinburgh, Edinburgh, 1979.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.231-244, 2001.

HOSTE, H.; LE FRILEUX, Y; POIVIMARET, A. Comparison of selective and systematic treatments to control nematode infection of the digestive tract in dairy goats. *Veterinary Parasitology*, v.106, n.4, p.345-355, 2002.

JENKINS, D. C.; RAPSON, E. B.; TOPLEY, P. The aggregation response of *Trichostrongylus colubriformis*: a basis for the rapid interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. *Parasitology*, v.93, p.531-537, 1986.

JONAS W. B. Do homeopathic nosodes protect against infection? An experimental test. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, v.5, n.5 p.36-40, 1999.

JONAS, W. B.; ANDERSON, R. L.; CRAWFORD, C. C.; LYONS, J. S. A systematic review of the quality of homeopathic clinical trials. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.1, n.12, 2001.

KEATINGE, R. ; GRAY, D.; THAMSBORG, S. M.; MARTINI, A.; PLATE, P. EU. Regulation 1804/1999 – The implications of limiting allopathic treatment. In : *Proceedings of the Second NAWOA Workshop*. Disponível em ... Acesso em: 29 set. 2003.

KNOX, M. R.; FAEDO, M. Biological control of field infections of nematode parasites of young sheep with *Duddingtonia flagrans* and effects of spore intake on efficacy. *Veterinary Parasitology*, v.101, n.2, p.155-160, 2001.

MATTOS, M. J. T.; CASTRO, E. S. Utilização de anti-helmínticos no controle de verminose caprina no Estado do Rio Grande do Sul. *A Hora Veterinária*, v.22, n.130, p.52-54, 2002.

MOSKEY, H. E.; HARWOOD, P. D. Methods of evaluating the efficacy of anthelmintics. *American Journal of Veterinary Research*, v.2, p.55-59, 1941.

PEREIRA, E. A. M. *Portaria nº 48. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário*. Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 1997.

PORTO, M. E. G. *Alterações de propriedades biológicas e físico-químicas da água induzidas por campos magnéticos*. 1998. 111 p. Dissertação (Mestrado em Físico-Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

POWERS, K. G.; WOOD, J. B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World association for the advancement of parasitology, guidelines for evaluating to efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Veterinary Parasitology*, v.10, p.265-284, 1982.

PURVIS, G. M.; SEWELL, M. M. H. *Trichostrongylus colubriformis*: age resistance in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Experimental Parasitology*, v.32, p.191-195, 1972.

ROBERTS, F. H. S.; O' SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.1, p.99-102, 1950.

SECO, J. L.; MAYER, C.; VON BERNARD, H. Interpretación de algunas observaciones realizadas com remedios homeopáticos en poblaciones de bovinos. *Homeopatia*, v.63, p.346-353, 1998.

SILVESTRE, A.; HUMBERT, J. F. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *International Journal for Parasitology*, v.32, p.921-928, 2002.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Veterinary Research*, v.33, n.5, p.563-573, 2002.

SUNDRUM, A. Organic livestock farming, a critical review. *Livestock Production Science*, v.67, p.207-215, 2001.

TAYLOR, B. M.; MALLON, T. R.; GREEN, W. P. Efficacy of a homoeopathic prophylaxis against experimental infection of calves by the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Veterinary Record*, v.124, p.15-17, 1989.

TURRA, F. S. *Instrução normativa nº 007. Dispõe sobre normas para produção de produtos orgânicos vegetais e animais*. Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 1999.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 3ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166 p.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. *Parasitologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. 273 p.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n.3, p.112-117, 1998.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.19, n.3-4, p.99-103, 1999.

WALLER, P. J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Veterinary Parasitology*, v. 62, p.181-187, 1996.

WEDRYCHOWICZ, H.; ROMANIK, I.; SZCZGIELSKA, E.; BEZUBIK, B. The effect of adjuvant and specific or non-specific vaccination on development of protective immunity of rabbits against *Trichostrongylus colubriformis* infection. *International Journal for Parasitology*, v.22, n.7, p.991-996, 1992.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia*, v. 8, p.375-376, 1927.

WYNN, S. G. Studies on use of homeopathy in animals. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.212, n.5, p.719-724, 1998.

7 ANEXO

Modelo da ficha para o acompanhamento experimental

Coelho N°

Sexo ()M ()F

Idade:

Grupo

Peso inicial:

DIA (DATA)	INF	TRAT	SAC	PESO	ING (g)	FEZES	COMP	PL/PO	MUC	OPG	COP
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30											
31											
32											
33											
34											
35											
36											
37											
38											
39											
40											

INF - Infecção; TRAT - Tratamento; SAC - Sacrifício; ING - Ingestão de ração; COMP - Comportamento; PL/PO - Pele e Pêlos; MUC - Mucosas; OPG - Ovos por Grama de fezes; COP - Coprocultura

Período Pré-Patente:

Consumo em Matéria Seca (g):

Ganho de Peso Médio (g):

Conversão Alimentar:

Data da necrópsia:

Coelho	Nº de <i>Trichostrongylus colubriformis</i>
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Nº médio do grupo:

Nº médio do controle:

Eficácia (%) = [(média do grupo I - média do grupo TT) ÷ média do grupo I] x 100

Helminhos (sp./nº)	Localização	Tamanho	Sexo	Ovos no útero

Observações: