



CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES

CALINCA BUENO LEVATTI

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL ANTIRRÁBICA EM
BEZERRAS HOLANDEAS SUPLEMENTADAS
COM ZINCO E SELÊNIO ORGÂNICOS**

Arapongas - PR
2015

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

Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação

L642r Levatti, Calinca Bueno
Resposta imune humoral antirrábica em bezerras holandesas suplementadas com zinco e selênio orgânicos / Calinca Bueno Levatti. Araçongas: [s.n], 2015. 58f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes). Universidade Norte do Paraná e Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho

1- Dissertação de mestrado – Medicina veterinária – UNOPAR/UUEL
2- Microminerais 3- Persistência de anticorpos 4- Raiva 5- Bovinos
6- Suplementação mineral I- Cunha Filho, Luiz Fernando Coelho
I- Universidade Norte do Paraná II- Universidade Estadual de Londrina.

CDU619: 636.085.2

CALINCA BUENO LEVATTI

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL ANTIRRÁBICA EM
BEZERRAS HOLANDEASAS SUPLEMENTADAS
COM ZINCO E SELÊNIO ORGÂNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho

Arapongas - PR
2015

CALINCA BUENO LEVATTI

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL ANTIRRÁBICA EM
BEZERRAS HOLANDEASAS SUPLEMENTADAS
COM ZINCO E SELÊNIO ORGÂNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina [UEL] e Universidade Norte do Paraná [UNOPAR]), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Fernando C. da Cunha Filho
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Werner Okano
Universidade Norte do Paraná

Arapongas, 11 de março de 2015.

Dedico

Ao primo-irmão Arlei Jesus Levatti Filho
(*in memoriam*) pois sei que mesmo longe,
estás perto.

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de mestrado, de muito estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização desse trabalho. Para tanto, registro aqui a importância que elas tiveram e ainda têm nessa conquista, e a minha sincera gratidão a todas elas.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Ailson Jesus Levatti e Cristina de O. Bueno Levatti, por me ensinarem a importância de valores éticos e morais. Agradeço ao apoio e incentivo recebido para a realização desse trabalho. Às minhas irmãs Cecília Bueno Levatti e Cíntia Bueno Levatti, por toda a receptividade em me acolher em Londrina, por todos os favores que me fizeram, desde a compra de materiais até a entrega de documentos na UEL, mas principalmente por fazerem parte da minha vida e me trazerem muitas alegrias, muitíssimo obrigada! Agradeço aos meus avós paternos, Airton e Valquíria, e maternos, Lineu e Marlene, e todos os tios, tias, primos e primas, por acreditarem e confiarem em mim, e por compreenderem meus momentos de ausência. A vocês, minha família, sou eternamente grata, por tudo que sou, por tudo que consegui conquistar e, sobretudo, por toda a felicidade que tenho.

Minha gratidão especial ao orientador e professor Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho, por todos os conhecimentos repassados, pela paciência e compreensão. Obrigada por sua dedicação, que o fez por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. Obrigada por ter acreditado e depositado sua confiança em mim.

Ao professor MSc. Flávio Antonio Barca Junior pelo apoio e colaboração estatística do trabalho. Aos demais professores do Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes, Dra. Lisiane D. de Lima, Dr. Flávio Guiselli Lopes, Dr. Selwyn Headley, Dr. Amauri Alfieri, Dr. Milton Yamamura, Dr. Elsa Helena Santana, Dr. Julio Lisboa, Dr. Odilon Vidotto, Dr. Itamar Navarro, e Dra. Fabíola A. Rego, os quais colaboraram muito para meu crescimento profissional e pessoal. À Dra. Neuza Maria Frazatti Gallina, coordenadora de Projetos de Desenvolvimento e Produção de Vacinas Virais do Instituto Butantan, pela realização dos testes para obtenção de títulos de anticorpos neutralizantes. Agradeço também ao coordenador do Mestrado em Saúde e

Produção de Ruminantes e componente da Banca de Qualificação e Defesa de Mestrado, professor Dr. Werner Okano, pela confiança, auxílio e disposição em ajudar sempre; e à professora Dra. Alice Fernandes Alfieri, também componente da Banca de Qualificação e Defesa de Mestrado, pelos conselhos e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste projeto.

À amiga e doutoranda Priscilla Gomes Carneiro Ferreira de Melo, por toda a dedicação e disposição em me ajudar, pelo conhecimento repassado, e pela paciência em me ensinar. Às amigas Janaína L. Pires e Maria de Fátima pela amizade, companheirismo e auxílio em técnicas laboratoriais. À equipe de trabalho da Vigilância Sanitária e Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Santo Antônio da Platina, que compreendeu a minha ausência durante este período.

Aos amigos e proprietários da chácara Lageado da Cachoeira (Arapoti - PR), Sr. Adriaan Bronkhorst, e seus filhos Arnald e Dalton Bronkhorst, por toda a disposição e apoio para a realização deste trabalho e auxílio nas coletas. Ao médico veterinário Gilberto Grade, por todo o apoio e paciência em suas visitas. Aos amigos médicos veterinários Isabela Gasparini e Lucas Bartholomei pelo auxílio nas coletas de materiais. À colega Geisi Guerra pela amizade e companhia durante os dois anos de trabalhos.

E por fim, o agradecimento mais importante: agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, me abençoando e iluminando cada passo meu. Obrigada por me guiar em todas as viagens a Londrina, Arapoti, São Paulo, Arapongas. Obrigada pela minha saúde e disposição para concluir esse trabalho. Obrigada por sempre me dar a fé e a força necessária para enfrentar todos os obstáculos, sem nunca desistir. Obrigada por colocar pessoas tão especiais na minha vida. Obrigada meu Pai, por me dar mais do que eu possa merecer. Sei que sem Ti, nada seria possível.

“A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

(John Ruskin)

LEVATTI, Calinca Bueno. **Resposta imune humoral antirrábica em bezerras holandesas suplementadas com zinco e selênio orgânicos**. 2015. 58f. Dissertação de Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes (Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2015.

RESUMO

A vacinação é uma importante ferramenta no controle e profilaxia da raiva animal, e microminerais como zinco e selênio têm sido utilizados na alimentação de ruminantes para obter melhor resposta imunológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação da dieta com zinco e selênio orgânicos na resposta imune humoral e na persistência de anticorpos antirrâbicos em bezerras holandesas primovacinas. Foram selecionadas aleatoriamente 37 bezerras holandesas de uma propriedade localizada no município de Arapoti, estado do Paraná, com idade média de três meses. As bezerras foram divididas em três grupos: grupo controle (GC, n=13), sem suplementação adicional, grupo zinco (GZn, n=13) suplementado com 2 gramas de zinco orgânico por animal por dia, e grupo selênio (GSe, n=11) suplementado com 0,5 gramas de selênio orgânico por animal por dia. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 90 dias, logo após foram vacinados contra raiva (dia 0), utilizando vacina comercial inativada, e foram mensurados os títulos de anticorpos antirrâbicos em sete momentos distintos (dia 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 390), pelo Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a titulação de anticorpos neutralizantes antirrâbicos igual ou superior a 0,5 UI/ml para proteger os indivíduos dos riscos da infecção com o vírus rábico. Os valores médios de títulos de anticorpos antirrâbicos encontrados 30 dias após a primovacinação foram de $2,15 \pm 1,49$ UI/ml no GC, $2,26 \pm 1,44$ UI/ml no GZn, e $1,69 \pm 0,94$ UI/ml no GSe; e no dia 390 foram de $0,78 \pm 0,62$ UI/ml no GC, $0,77 \pm 0,69$ UI/ml no GZn, e $1,27 \pm 1,35$ UI/ml no GSe, demonstrando títulos similares estatisticamente e protetores contra a doença em todos os grupos. A suplementação mineral oral de zinco e selênio orgânicos não incrementou a resposta imune humoral, entretanto após 390 dias da primovacinação, todos os grupos mantiveram médias de títulos protetores acima do recomendado pela OMS. Houve uma queda bastante acentuada da porcentagem dos animais protegidos entre os dias 180 e 240, justificando a importância da vacinação semestral em áreas consideradas endêmicas.

Palavras-chave: microminerais, persistência de anticorpos, raiva, bovinos, suplementação mineral.

LEVATTI, Calinca Bueno. **The humoral rabies immune response in holstein calves supplemented with organic zinc and selenium.** 2015. 58f. Dissertação em Saúde e Produção de Ruminantes (Mestrado Acadêmico Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2015.

ABSTRACT

The vaccination is an important tool in the control and prevention of animal rabies, and trace elements like zinc and selenium have been used in ruminant feed to get better immunological response. The aim of this research was to evaluate the effect of the supplementation of diet with organic zinc and selenium in the humoral immune response and in the persistence of rabies antibodies in Holstein calves first vaccination. Were randomly selected 37 Holstein calves, of a property located in the city of Arapoti, state of Paraná, with average age of three months, which have never been vaccinated against rabies. These calves were divided in three groups: control group (GC, n=13), without additional supplementation; zinc group (GZn, n=13), supplemented with 2.0 grams of organic zinc per calf per day; and selenium group (GSe, n=11), supplemented with 0.5 grams of organic selenium per calf per day. The animals were submitted to a period of adaptation of 90 days, and right after, they were antirabies vaccinated (day 0), using commercial vaccine inactivated, and it was measured the antirabies titration in seven different times (day 0, 30, 60, 120, 180, 240 and 390), by the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). The World Health Organization (WHO) recommends the titration of rabies neutralizing antibodies equal or higher than 0.5IU/ml to protect individuals from the risk of infection with the rabies virus. The average figures of rabies antibodies titers found 30 days after the first vaccination were 2,15±1,49IU/ml in the GC, 2,26±1,44 IU/ml in the GZn, and 1,69±0,94IU/ml in the GSe; and the figures found in the day 390 were 0,78±0,62IU/ml in the GC, 0,77±0,69UI/ml in the GZn, and 1,27±1,35UI/ml in the GSe, therefore showing statistically similar titers and protective against the disease in all groups. The oral mineral supplementation of organic zinc and selenium did not increment the humoral immune response, nevertheless, after 390 days of the first vaccination, all groups maintained averages protective titers above recommended by WHO. There was a very sharp drop in the percentage of protected animals between days 180 and 240, justifying the importance of the half-yearly vaccination in endemic areas.

Key words: trace elements, persistence antibodies, rabies, cattle, mineral supplement.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cu-ZnSOD	Enzima superóxido dismutase
D0	Dia 0, dia da primeira dose
D30	Dia 30, 30 dias após a primovacinação
D60	Dia 60, 60 dias após a primovacinação
D120	Dia 120, 120 dias após a primovacinação
D180	Dia 180, 180 dias após a primovacinação
D240	Dia 240, 240 dias após a primovacinação
D390	Dia 390, 390 dias após a primovacinação
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GC	Grupo Controle
GSe	Grupo Selênio
GSH-px	Enzima glutathionaperoxidase
GZn	Grupo Zinco
Kg	Kilograma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanometro
NRC	National Research Council
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNCRH	Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros
ppm	Partes por milhão
RFFIT	Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test
RNA	Ácido ribonucleico
UI	Unidades Internacionais
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 ZINCO	14
2.1.1 Disponibilidade e Suplementação	15
2.1.2 Zinco Orgânico e Inorgânico	17
2.1.3 Deficiência de Zinco e Toxicidade	17
2.1.4 Zinco e Imunidade	19
2.2 SELÊNIO	21
2.2.1 Disponibilidade e Suplementação	22
2.2.2 Selênio Orgânico e Inorgânico	22
2.2.3 Deficiência de Selênio e Toxicidade	23
2.2.4 Selênio e imunidade	24
2.3 RAIVA	26
2.3.1 Etiologia	26
2.3.2 Epidemiologia	27
2.3.3 Patogenia	27
2.3.4 Sinais Clínicos	28
2.3.5 Prejuízos	29
2.3.6 Medidas de Controle	29
2.3.6.1. Vacina	30
3 ARTIGO	32
CONCLUSÃO GERAL	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	49
ANEXO A – Concentrações dos macro e microminerais no organismo animal	49
ANEXO B – Títulos de anticorpos antirrábicos neutralizantes (UI/ml) em soros	

de bovinos do Grupo Controle, Grupo Zinco e Grupo Selênio	50
ANEXO C – Normas para preparação dos artigos científicos para submissão a publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira	53

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um dos sistemas mais importantes do organismo animal, pois compreende todos os mecanismos pelos quais o organismo se defende de invasores externos, como fungos, vírus, bactérias e protozoários (TIZARD, 2002). O bom funcionamento do sistema imune garante aos animais maior resistência às doenças, e melhor desempenho produtivo. Sabe-se que determinados nutrientes da dieta possuem efeito sobre a resposta imunológica e podem aumentar os mecanismos de defesa. Os elementos minerais desempenham um papel importante neste aspecto (YATOO et al., 2013).

Os elementos minerais são essenciais para o bom funcionamento do sistema imune, e sua deficiência aumenta a susceptibilidade a doenças. Diferentes células imunológicas e seus mecanismos de atividade fagocitária são afetados pela deficiência de minerais, e a suplementação pode estimular o sistema imunológico (YATOO et al., 2013).

O zinco e o selênio são microminerais que atuam também no sistema celular antioxidante, melhorando a resposta imunológica e contribuindo para o aumento da resistência às infecções, através da menor ação prejudicial de radicais livres (CORTINHAS et al., 2009).

No Brasil, é comum a exploração pecuária em terras de solo pouco fértil, o que predispõe não só a uma menor oferta de forragem, como a uma baixa qualidade do volumoso. Essa baixa qualidade se reflete, entre outros fatores, na quantidade de microminerais presentes na planta (DANTAS; NEGRÃO, 2010).

Segundo Peixoto e colaboradores (2005), animais que recebem dietas com quantidade insuficiente de minerais, ou rações não balanceadas que resultem na carência de um ou mais elementos, podem não desenvolver todo o seu potencial genético, além de se manterem mais susceptíveis a doenças.

A raiva é uma zoonose, causada por um vírus do gênero *Lyssavirus*, que afeta o sistema nervoso central de humanos e mamíferos domésticos e selvagens. Cerca de 84% das mortes por raiva humana ocorrem em áreas rurais (WHO, 2013), onde o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) é o

principal hospedeiro, transmitindo o vírus para diferentes espécies animais, como bovinos, equinos, caprinos e também para os humanos (LIMA; GAGLIANI, 2014).

Os membros da família *Rhabdoviridae*, no qual se enquadra o vírus rábico, possuem natureza proteica complexa, o que os torna bons indutores de imunidade, quando comparados a outros vírus. Isso significa que, os animais vacinados adequadamente, respeitando as indicações de conservação e aplicação da vacina, devem apresentar bom nível de anticorpos e imunidade duradoura (KOTAIT et al., 1998).

Devido à importância da vacinação na profilaxia da doença, e à ausência da garantia de total proteção desse método, vários pesquisadores têm buscado alternativas que fomentem a resposta imune dos animais. Entre estas alternativas, pode-se citar a suplementação da dieta com imunominerais.

No presente trabalho a raiva foi escolhida como modelo experimental, por ser uma zoonose e doença fatal em animais. Outro fator relevante é que a raiva induz boa resposta imune após a vacinação, devido ao fato da doença ser causada por uma partícula viral complexa, a qual possui em sua superfície apenas um tipo de glicoproteína (G), que induz uma grande quantidade de anticorpos neutralizantes, devido à repetição do determinante antigênico.

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a eficácia da suplementação da dieta com zinco e selênio orgânicos na resposta imune humoral antirrábica em bezerras holandesas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ZINCO

O zinco é um elemento químico, de número atômico 30. Em 1930 descobriu-se que o zinco era essencial para a vida, crescimento, produção e reprodução dos animais (CUMMINGS; KOVACIC, 2009).

Embora o mecanismo de ação exato do zinco ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que o mineral possui importância na proteção de mucosas, na diferenciação de células imunomediadas, e nos mecanismos de absorção ou secreção dos eletrólitos intra-luminais (GLOVER et al., 2013).

Estima-se que o zinco seja componente essencial de mais de 200 sistemas enzimáticos, e juntamente com o cobre, são os dois micronutrientes mais envolvidos em funções no organismo animal (HADDAD; ALVES, 2006).

O zinco é o micromineral mais abundante no meio intracelular, está envolvido em funções catalíticas, estruturais e regulatórias, além de participar do metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (PECHOVA et al., 2006). Sua principal função fisiológica é na formação de metalo-enzimas, e são conhecidas atualmente mais de mil enzimas e coenzimas, que são dependentes tanto para a função de componente estrutural quanto para a ativação do sistema enzimático, estando relacionadas com a replicação e a diferenciação celular (LUCAS; PRADO, 2011). O zinco também constitui várias moléculas que integram as membranas celulares, tanto citoplasmáticas, particularmente nos leucócitos, como de organelas (QUIROZ-ROCHA et al., 2000).

No sistema antioxidante, o zinco está presente na enzima superóxido dismutase (Cu-ZnSOD), que atua na redução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SPEARS; WEISS, 2008). Quando as ERO são geradas, ocorre prejuízo à saúde do animal, pelos danos às células e tecidos (YATOO et al., 2013).

Em ruminantes, trabalhos isolados sobre a suplementação de zinco em animais deficientes mostraram a ocorrência de melhoria sob todos os aspectos da saúde animal e na capacidade reprodutiva (MORAES et al., 2001).

Processos fisiológicos, como crescimento normal do pelo e queratinização da pele, necessitam de altas quantidades de zinco, já que esse mineral participa na síntese de proteínas e atua como cofator para a RNA e DNA polimerases sendo, portanto, de extrema importância na rápida proliferação celular (FRANÇA et al., 2008).

O zinco também desempenha papel fundamental na função reprodutiva das fêmeas, sendo essencial para todas as fases do processo reprodutivo, desde o estro até o parto e à lactação (PASA, 2010). Nos machos, é fundamental na formação da genitália externa e interna, na espermatogênese e multiplicação celular dos testículos (LUCAS; PRADO, 2011).

2.1.1 Disponibilidade e Suplementação

Diferentes tipos de minerais estão presentes em quantidades variáveis nos alimentos comumente oferecidos aos ruminantes. As forragens, base da dieta animal, são sistemas complexos, nos quais estão inter-relacionados fatores como solo e atmosfera. As propriedades físicas, químicas e biológicas das pastagens são muito variáveis e dinâmicas, e altamente afetadas pelo manejo a que são submetidas (MORAES, 2001).

A quantidade de zinco normalmente presente nas pastagens, raramente é capaz de suprir as necessidades dos animais em pastejo (LUCAS; PRADO, 2011). Em trabalho de Moraes (2001) a quantidade de zinco encontrada nas forragens estudadas (*Brachiarias spp.*) variou de 20 a 29 mg/Kg. Segundo Berchielli e colaboradores (2006), em um grupo de 2.615 forragens latino americanas avaliadas, 75% apresentaram níveis deficientes de zinco em sua composição.

Especialmente para os ruminantes em sistema de pastejo, a interação solo-planta-animal é de grande importância, pois os fatores do solo influenciam grandemente a quantidade de minerais presentes na forragem, que vai representar, na grande maioria das vezes, o maior consumo pelos animais (DANTAS; NEGRÃO, 2010).

A exigência de zinco para um bovino varia de acordo com a raça do animal, idade, intensidade ou taxa de produção, condições de meio ambiente,

grau de adaptação do animal, o nível e a forma química do mineral no alimento e suas relações com os outros nutrientes da dieta (CARVALHO et al., 2003; MENDONÇA JUNIOR et al., 2011).

De acordo com o National Research Council (NRC) (2001), recomenda-se teor de zinco na dieta na quantidade de 30 mg/Kg de matéria seca. Apesar disso, devido à deficiência nas pastagens de *Brachiarias*, a maioria dos nutricionistas trabalham com níveis superiores de suplementação, entre 100 e 150 mg/Kg de matéria seca, para compensar as deficiências na forragem (LUCAS; PRADO, 2011).

Ressalta-se também que as exigências de microminerais na dieta, necessárias para aperfeiçoar a função imunológica, na grande maioria das vezes são mais elevadas que o máximo recomendado para crescimento e prevenção de deficiência clínica (BORGES; PASCHOAL, 2013).

A fertilização das pastagens com compostos minerais, com objetivo de suprir as necessidades dos animais, não é viável, portanto a adequação nutricional dos minerais deve ser realizada pelas diferentes formas de suplementação (PEIXOTO et al., 2005).

Pasa (2010) enfatiza que alguns fatores podem interferir na absorção do zinco, ativando ou inibindo esse processo. Como ativadores da absorção pode-se citar o ácido picolínico, secretado pelo pâncreas, a vitamina B6 que aumenta a secreção de ácido picolínico, o citrato e aminoácidos como glicina, histidina, lisina e metionina. No grupo dos inibidores da absorção estão o cálcio, o ferro, o selênio, os taninos, os ácidos oxálico e fítico, e o teor de fibra na pastagem. O cálcio é o principal antagonista do zinco, sendo necessário monitorar os níveis desse macromineral para evitar a deficiência do zinco (QUIROZ-ROCHA et al., 2000).

Altas doses de cálcio reduzem a absorção de zinco, o mesmo acontece com cobre, ferro, cádmio e fitatos (HADDAD; ALVES, 2006).

Um importante fator que afeta a absorção e a utilização dos microminerais nas reações metabólicas é a sua forma química (KINAL et al., 2005).

2.1.2 Zinco Orgânico e Inorgânico

A biodisponibilidade de um mineral, ou seja, a quantidade do elemento presente no alimento que é realmente absorvida pelo animal e utilizada nas suas funções biológicas, depende de vários fatores, tais como: níveis do elemento ingerido, idade e estado nutricional do animal, condições ambientais, pH intestinal, presença de antagonistas e, principalmente, a fonte mineral, que pode ser orgânica ou inorgânica (HADDAD; ALVES, 2006).

As fontes minerais mais utilizadas na nutrição animal são as fontes inorgânicas de origem geológica ou industrial (óxidos, sulfatos, cloretos, carbonatos e fosfatos), por apresentarem um custo menor que o dos minerais orgânicos, porém o mineral zinco na forma orgânica possui maior biodisponibilidade (87-94%) quando comparados às fontes inorgânicas (15-35%) (MOTTIN et al., 2013).

Também chamados de minerais quelatados, as fontes minerais orgânicas são compostos produzidos por quelação, ou ligação, entre metais e aminoácidos, ou seja, são íons metálicos ligados quimicamente a uma molécula orgânica, formando estruturas estáveis de alta biodisponibilidade mineral (PEIXOTO et al., 2005).

O mecanismo de ação dos minerais quelatados no organismo animal é pouco elucidado. Por apresentarem maior biodisponibilidade e consequentemente maior solubilidade, estrutura química estável e natureza eletricamente neutra no trato digestivo, não participam de reações que podem transformar o íon metálico livre em complexos insolúveis indesejáveis. Essas características permitem melhor absorção, refletindo no desempenho geral do animal (MOTTIN et al., 2013).

2.1.3 Deficiência de Zinco e Toxicidade

A deficiência de zinco pode ser primária, quando o alimento não supre a quantidade suficiente do elemento, ou secundária, quando o alimento contém nível adequado de zinco, porém sua biodisponibilidade é reduzida por

elementos químicos antagonistas do zinco, como cobre, magnésio, cálcio, fosfatos, e compostos de ferro bivalente (RADWINSKA; ZARCZYNSKA, 2014).

A deficiência de zinco pode ser desencadeada pela presença de substâncias inibidoras da dieta, pela simples falta do elemento na dieta, em processos infecciosos agudos ou crônicos, e em condições de estresse prolongado. Quando ocorre estresse, há mobilização da proteína metalotioneína, dependente de zinco. Essa proteína funciona como agente vigilante do órgão que necessita de zinco para sua manutenção e função, assim mobiliza o zinco endógeno e armazena-o no fígado. Esse mecanismo tem a função de manter a integridade do sistema de defesa contra agentes infecciosos (bactérias, vírus) e toxinas, e atua na regeneração do tecido lesado (VILELA et al., 2011a).

Quando a deficiência de zinco se estabelece, ocorre atrofia do timo, principal órgão do sistema imune, com perda da função normal das células T (resposta celular) e diminuição das células B (resposta humoral) (VILELA et al., 2011b).

Em bovinos, principalmente nas raças Simental e Aberdeen Angus, a absorção de zinco pode ser prejudicada por um defeito congênito autossômico recessivo (RADWINSKA; ZARCZYNSKA, 2014).

A deficiência de zinco em ruminantes causa redução no crescimento, na ingestão de alimentos e na conversão alimentar, além de problemas ósseos e diminuição da imunidade (VILELA et al., 2011a).

Brunetto e colaboradores (2007) relatam que a deficiência de zinco resulta em extensivo dano aos linfócitos T, com atrofia do timo, alteração da síntese de linfócitos, resultando em imunossupressão; implica também em alterações epidérmicas associadas à maior penetração de agentes.

Para diagnosticar a deficiência, o teor de zinco sanguíneo é o mais comumente utilizado, sendo que teores entre 0,4 e 0,6 mg/dL são considerados deficientes, podendo causar lesões graves nos ruminantes (VILELA et al., 2011a).

Não há relatos de intoxicação por zinco em ruminantes, pois a tolerância ao excesso deste mineral na dieta é bastante elevada. Segundo Pasa (2010), a concentração máxima tolerável de zinco no organismo é de 500 mg/Kg.

2.1.4 Zinco e Imunidade

Os microminerais estão correlacionados com o sistema imune de diversas formas. Sua participação é fundamental no metabolismo antioxidante, como componente ou cofator de diversas enzimas, na produção e adequada função das células de defesa, entre outros.

Os mecanismos antioxidantes, nos quais o zinco está envolvido, servem para estabilizar os radicais livres, mantendo a integridade funcional e estrutural das células e são extremamente importantes para o correto funcionamento do sistema imune (BORGES; PASCHOAL, 2013). Segundo Yattoo e colaboradores (2013), a deficiência de zinco predispõe as células ao estresse oxidativo, pois os oxidantes não são neutralizados, o que afeta negativamente a saúde animal pelos danos nas células e tecidos causados pelos radicais livres ou oxidantes. Reações oxidativas descontroladas podem prejudicar o status imunológico, diminuindo a resposta imune dos animais.

O zinco desempenha importante papel no sistema imune, por ser componente essencial de mais de 300 enzimas, incluindo as envolvidas na síntese de DNA e RNA e, atua na replicação, proliferação e função das células imunes, como os neutrófilos, as células *natural killer*, e linfócitos T (SPEARS; WEISS, 2008).

Em condições de alto estresse, o zinco é priorizado para o sistema imunológico, a fim de fortalecer o mecanismo de defesa, podendo ocasionar alopecia e paraqueratose, visto que a síntese de queratina, proteína integrante da pele e dos pêlos, tem menor prioridade (VILELA et al., 2011b).

Na defesa da glândula mamária contra infecções, o zinco está ligado ao mecanismo de reconstrução da queratina presente no canal do teto entre as ordenhas, além do seu envolvimento com o metabolismo oxidativo, sendo também essencial para manter a integridade da pele, primeira linha de defesa deste órgão (BORGES; PASCHOAL, 2013).

Durante a reação imunológica o nível de zinco no sangue decresce drasticamente em razão da síntese de metalotioneína no fígado e, em contrapartida, a absorção é aumentada, causando maior exigência deste mineral (RIBEIRO et al., 2008).

Dietas com baixas concentrações de zinco, durante o período de gestação e na fase de aleitamento, podem afetar profundamente a formação do sistema imunológico das crias, causando atrofia do timo, perda da função normal das células T e diminuição de resposta das células B, o que reflete em alterações no perfil das imunoglobulinas e suas relações (MORAES et al., 2001).

O efeito protetor das vacinações é bastante prejudicado quando há deficiência de zinco, pois para a efetiva proteção vacinal é necessária uma memória imunológica máxima por parte do linfócito T, oriundo do timo (CARVALHO et al., 2003).

2.2 SELÊNIO

O selênio é outro micromineral essencial, com papel importante na saúde dos animais. Ele está envolvido no sistema antioxidante do organismo, por meio da enzima glutationaperoxidase (GSH-px), que converte peróxido de hidrogênio em água, protegendo os tecidos contra danos oxidativos, e deste modo, mantém a integridade física de células e tecidos (REIS et al., 2008).

A enzima glutationaperoxidase participa na estabilização dos peroxissomos dos fagócitos, contribuindo na inativação de agentes infecciosos, além de afetar a capacidade proliferativa dos linfócitos, bem como de todos os componentes do sistema imunológico (BRUNETTO et al., 2007).

O selênio também participa da atividade dos hormônios da tireóide, potencialização da resposta imunológica, locomoção do espermatozoide, metabolismo de ácidos graxos e síntese de DNA e RNA (HADDAD; ALVES, 2006). Na tireóide, o elemento possui importante função na produção de hormônios, participando da constituição da enzima iodotironinadeiodinase, responsável pela conversão de T4 em T3 (BECKEET; ARTHUR, 2005).

O selênio e a vitamina E apresentam uma forte relação de sinergismo, diminuindo as exigências de vitamina E na membrana celular e aumentando sua retenção no plasma sanguíneo. Por sua vez a vitamina E mantém o selênio corporal na forma ativa, diminuindo sua perda e prevenindo a oxidação de fosfolípidios da membrana (HADDAD; ALVES, 2006).

Tem importante função na reprodução e na prevenção de uma enfermidade conhecida por doença do músculo branco, embora o potencial tóxico do microelemento tenha mais atenção que sua essencialidade (DANTAS; NEGRÃO, 2010).

A absorção do selênio ocorre no duodeno, quando se fixa a uma proteína e é transportado do sangue para os tecidos, onde se incorpora como selenocisteína e selenometionina (BORGES; PASCHOAL, 2013).

2.2.1 Disponibilidade e Suplementação

O selênio é encontrado em diversos alimentos para ruminantes, como cereais, leguminosas e forragens. Nas pastagens brasileiras o selênio não é encontrado facilmente, pois como a grande maioria dos solos é altamente lixiviado e com baixo teor de matéria quelatada, o selênio se perde facilmente (PASA, 2010).

A concentração de selênio no solo pode variar pontualmente, ou seja, dentro de uma mesma propriedade podem existir áreas com níveis normais de selênio no solo, seguidas de áreas adjacentes com deficiência do elemento (GIERUS, 2007).

O nível de selênio nas plantas e nos grãos é altamente correlacionado com a concentração desse mineral no solo, gerando um baixo consumo desse elemento, pelo fato de seus níveis serem reduzidos no solo (VIERO et al., 2010).

De acordo com o NRC (2001), recomenda-se teor de selênio na dieta na quantidade de 0,3 mg/Kg de matéria seca, para todas as categorias de bovino de leite.

A ingestão de selênio através do conteúdo natural deste elemento nas plantas e, posteriormente, como componentes em dietas, é insuficiente para cobrir a exigência nutricional para bovinos leiteiros, sendo indispensável uma suplementação com misturas minerais contendo tal micromineral (GIERUS, 2007).

As formas mais comuns de selênio utilizadas na suplementação animal são os complexos de moléculas orgânicas, selenometionina e selenocisteína, e as leveduras enriquecidas, que crescem sobre um substrato contendo pouco enxofre e muito selênio. Já entre as formas inorgânicas, as mais utilizadas são selenito de sódio e selenato (GIERUS, 2007; VIERO et al., 2010).

2.2.2 Selênio Orgânico e Inorgânico

Na avaliação dos alimentos e suplementos nutritivos devem-se considerar a concentração e a biodisponibilidade dos minerais, sendo o termo

biodisponibilidade definido como a proporção do elemento ingerido que realmente é absorvida, transportada ao seu sítio de ação e convertida a uma forma fisiologicamente ativa (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011).

Os suplementos minerais podem possuir selênio na forma orgânica e inorgânica. A forma inorgânica mais comum utilizada em misturas minerais é o selenito de sódio, enquanto que as formas orgânicas estão disponíveis como leveduras enriquecidas, que crescem em um substrato contendo pouco enxofre e muito selênio (GIERUS, 2007).

O selênio na forma orgânica de selenometionina é absorvido pelo sistema digestório através de mecanismo ativo, semelhante ao da absorção da metionina, enquanto o selênio convencional e selenocisteína não são ativamente transportados. A selenometionina é rapidamente absorvida e retida no organismo, mas é vagarosamente convertida em selenocisteína, a qual é necessária para a síntese de proteínas funcionais (PASA, 2010).

O selênio na forma orgânica possui maior biodisponibilidade (88-90%) quando comparado à forma inorgânica (9-26%), devido principalmente à neutralidade elétrica (MOTTIN et al., 2013).

2.2.3 Deficiência de Selênio e Toxicidade

Ao contrário da maioria dos outros minerais, o selênio se caracteriza por um limite estreito entre a deficiência e a toxicidade (ARTHINGTON, 2004), sendo que as deficiências deste mineral são comuns nas dietas de animais de produção (REIS et al., 2009). Níveis inferiores a 0,1 mg/Kg de matéria seca são considerados deficientes em bovinos de leite, enquanto que acima de 2 mg/Kg de matéria seca podem ser tóxicos (VIERO et al., 2010).

As deficiências de selênio têm efeito oxidativo nas células, sendo os animais jovens os mais susceptíveis aos efeitos adversos (QUIROZ-ROCHA et al., 2000). Pode ainda causar miopatia esquelética e cardíaca crônica nos bovinos, conhecida como doença do músculo branco ou distrofia muscular nutricional, podendo afetar de 10 a 40% dos bezerros e causar mortalidade em todos os animais acometidos (REIS et al., 2009). Essa enfermidade é causada pela degeneração das fibras musculares, pelo efeito oxidativo causado pela

deficiência de selênio; em bezerros observa-se um retardo no crescimento, baixo ganho de peso e massa muscular deficiente (QUIROZ-ROCHA et al., 2000).

A relação entre deficiência de selênio e degeneração muscular, incluindo necrose do miocárdio, ocorre devido ao nível elevado de ácidos graxos poli-insaturados, fornecidos principalmente através do concentrado ofertado aos animais, o que causa danos nos tecidos pelos radicais livres (ENJALBERT, 2009).

A deficiência de selênio causa acúmulo de peróxidos nas membranas celulares causando necrose, com posterior fibrose e calcificação, principalmente nos músculos esquelético e cardíaco (PASA, 2010).

Nas fêmeas, a deficiência de selênio interfere no sistema reprodutivo, de forma que o animal apresenta maior incidência de retenção de placenta, manifestação de cios silenciosos, fracos e irregulares, baixa taxa de concepção, e maior ocorrência de cistos ovarianos; já nos machos, essa deficiência pode causar redução da motilidade espermática, que pode estar relacionada ao alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular dos espermatozoides (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011). Devido a essas características, demonstra-se a importância da realização de diagnóstico diferencial para doenças infecciosas reprodutivas.

O selênio em altas quantidades é tóxico para bovinos, e causa cegueira, sialorréia, cascos deformados, claudicação, dor abdominal, emagrecimento, necrose hepática, atrofia cardíaca, letargia e depressão (REIS et al., 2008).

A presença de altas concentrações de selênio na enzima glutationaperoxidase justifica a mensuração da atividade desta enzima para diagnóstico da deficiência do mineral (QUIROZ-ROCHA et al., 2000).

2.2.4 Selênio e Imunidade

A resposta imune é dependente de replicação celular e da síntese de compostos protéicos ativos. Sendo assim, é fortemente afetada pelo status nutricional do animal, o qual determina a habilidade metabólica celular e a

eficiência com que a célula responde aos estímulos, dando início ao sistema de proteção e autorreparação orgânicas (BRUNETTO et al., 2007).

Os níveis adequados de selênio no organismo têm demonstrado bastante importância para garantir a resistência a doenças e a eliminação de patógenos (imunidade não específica), visto que o elemento participa de diferentes mecanismos da resposta imune (HEFNAWY; PÉREZ, 2008).

Os efeitos benéficos à saúde, derivados da adequada concentração de selênio no organismo, têm sido atribuídos ao impacto desse elemento nas funções das células imunes (SORDILLO, 2013).

O selênio está fortemente relacionado com os mecanismos de defesa imunológica, e diminuição da resposta imune, celular e humoral, pode ocorrer, mesmo com níveis pequenos de deficiência (ENJALBERT, 2009). Segundo Carvalho e colaboradores (2003) e Borges; Paschoal (2013), a suplementação de selênio na dieta incrementou a resposta imune celular e humoral em bovinos.

A enzima glutathionperoxidase estimula a imunidade celular e favorece a adequada produção dos diferentes tipos de imunoglobulinas (QUIROZ-ROCHA et al., 2000). A baixa atividade desta enzima reduz a vida média dos macrófagos, afeta os mecanismos de apresentação antigênica e a resposta humoral, diminuindo a produção de imunoglobulinas (HEFNAWY; PÉREZ, 2008). A suplementação com selênio aumenta a concentração de imunoglobulinas M (RADWINSKA; ZARCZYNSKA, 2014).

O selênio está intimamente relacionado com a atividade de macrófagos e neutrófilos, pois várias selenoproteínas estimulam a atividade de encontrar e destruir os invasores microbianos no organismo de mamíferos. Essas selenoproteínas atuam no sistema imunológico de três formas: fornecendo aminoácidos e selênio para a síntese de glóbulos brancos pela medula óssea, permitindo que os glóbulos brancos saiam da corrente sanguínea para os tecidos (quando o tecido é atacado e sofre um processo inflamatório), e neutralizando os radicais livres liberados após uma reação inflamatória, evitando maiores danos às células e tecidos (CARVALHO et al., 2003).

Yatoo e colaboradores (2013) afirmam que a suplementação com selênio melhorou a capacidade fagocitária dos neutrófilos. Sordillo (2013) conseguiu resultados semelhantes suplementando vacas no periparto.

2.3 RAIVA

A raiva possui grande importância mundial, por ser uma zoonose bastante relevante na saúde pública (ARENAS et al., 2009). Possui prognóstico fatal em quase 100% dos casos e apresenta ampla distribuição geográfica (BABONI; MODULO, 2011). Pode acometer humanos e várias outras espécies de mamíferos (FERNANDES et al., 2013).

É caracterizada como uma enfermidade infecciosa viral aguda do sistema nervoso central dos mamíferos, e, no Brasil, o agente transmissor mais importante do vírus rábico para animais de produção é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (GENARO et al., 2014).

2.3.1 Etiologia

O vírus da raiva pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, e acomete o homem e várias espécies de mamíferos domésticos e selvagens (BRAGA et al., 2013).

A partícula completa do vírus rábico, denominada vírion, apresenta um formato característico que lembra uma bala de revólver, com um diâmetro de aproximadamente 75 nm e comprimento entre 100 e 300 nm (BATISTA et al., 2007).

O vírion contém um nucleocapsídeo recoberto por um envelope lipoprotéico; o genoma viral é formado por uma cadeia única de ácido ribonucleico (RNA) com polaridade negativa, e possui cinco genes, que codificam a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a glicoproteína (G), a proteína de matriz (M), e a RNA polimerase (L) (KANITZ et al., 2014).

A glicoproteína G é responsável pela adsorção do vírus à célula hospedeira e pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática. Além disso, a glicoproteína G é a principal responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, especialmente pela sua porção externa ao envelope, denominada domínio antigênico ou ectodomínio (BATISTA et al., 2007).

2.3.2 Epidemiologia

A raiva está presente em todos os continentes, exceto Austrália e Antártica; e alguns países como Inglaterra, Irlanda, Japão e países escandinavos, obtiveram sucesso na erradicação da doença (BATISTA et al., 2007).

O vírus é usualmente mantido num hospedeiro principal, que pode ser o cão, o gato, o homem, os carnívoros selvagens ou o morcego e, geralmente, uma espécie particular serve como reservatório importante para determinada região geográfica (BABBONI; MODOLO, 2011). Na América Latina, o principal vetor do vírus da raiva é representado por morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, bastante presentes em regiões de exploração agropecuária (BRAGA et al., 2013).

Fernandes e colaboradores (2013) relataram que o aumento da produção pecuária em determinada região do norte do Brasil foi associado ao aumento do número de casos de raiva bovina transmitida pelo morcego.

Observou-se maior prevalência da doença em bovinos com menos de dois anos, fato que pode estar relacionado com a menor imunidade dos animais jovens devido a não revacinação 30 a 40 dias após a primeira vacinação, ou a um retardo na idade da primovacinação que deve ser realizada entre os três e quatro meses de idade (Ribas et al., 2013).

Reis e colaboradores (2003) relataram que a maioria dos casos acometeu animais de zero a seis meses de idade, fato justificado por uma falha no manejo sanitário ou por uma baixa imunidade vacinal, visto que recomenda-se realizar a vacinação a partir de três meses de vida, quando o sistema imunológico dos bovinos jovens já está formado, porém é incapaz de responder plenamente aos antígenos aos quais estão expostos.

2.3.3 Patogenia

A transmissão da raiva se dá pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura e, mais raramente, pela

arranhadura ou lambadura de mucosas ou feridas abertas (BABBONI; MODOLO, 2011).

Depois de inoculado no novo hospedeiro, o vírus pode replicar-se nas células musculares, próximas ao local da inoculação, antes de invadir o sistema nervoso central. Essa replicação representa um passo de multiplicação necessário à invasão do sistema nervoso (BATISTA et al., 2007).

O vírus atinge diferentes porções do cérebro e dissemina-se centrifugamente para órgãos e glândulas salivares, onde também se replica e então é eliminado pela saliva das pessoas ou animais doentes (BABBONI; MODOLO, 2011).

2.3.4 Sinais Clínicos

O período de incubação geralmente varia entre 2 a 12 semanas, porém há relatos de casos com períodos de incubação superiores a um ano (BATISTA et al., 2007).

Passado o período de incubação, podem surgir diferentes sinais clínicos da doença, sendo a paralisia o mais comum, porém pode ocorrer a forma furiosa, levando o animal a atacar outros animais ou seres humanos (BRASIL, 2009). Pedroso e colaboradores (2012) identificaram como principais sinais clínicos da raiva em bovinos incoordenação motora, evoluindo para paresia e paralisia dos membros pélvicos, decúbito esternal e posteriormente lateral, além de tremores musculares, sialorréia e movimento de pedalagem. O animal acometido também pode apresentar isolamento em relação ao restante do rebanho, hiperexcitabilidade, dificuldade de deglutição, e posterior morte entre 4 a 6 dias após o início do quadro (REIS et al., 2003).

Entretanto é importante ressaltar que os sinais clínicos podem apenas induzir a uma suspeita de raiva, pois os sinais da doença não são específicos, e pode haver grandes variações de um animal para outro. Para obter um diagnóstico confiável é preciso identificar o vírus por meio de testes laboratoriais (FERREIRA et al., 2012).

2.3.5 Prejuízos

Historicamente, a raiva tem causado importantes perdas a rebanhos bovinos em várias regiões do país, causando um impacto econômico negativo à cadeia produtiva (KANITZ et al., 2014).

Segundo Ferreira e colaboradores (2009), na América Latina a raiva dos herbívoros é responsável por prejuízos econômicos estimados em 50 milhões de dólares ao ano, com a morte de 100.000 a 500.000 bovinos por ano. Entretanto, durante o ano de 2012, foram notificados oficialmente no Brasil apenas 1435 casos de raiva em bovinos, contabilizando-se apenas aqueles diagnosticados em laboratórios oficiais e credenciados (KANITZ et al., 2014). Ressalta-se que a subnotificação de casos de raiva em herbívoros é uma realidade, de forma que é praticamente impossível determinar o real número de perdas associadas à doença (BATISTA et al., 2007).

Além das perdas econômicas, o fato do Brasil ser um país endêmico para raiva, influencia negativamente o status de qualidade dos produtos pecuários brasileiros, afetando diretamente as exportações e desabonando o país a nível internacional.

2.3.6 Medidas de Controle

No Brasil, o órgão que gerencia o controle de raiva em herbívoros é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), enquanto que a raiva urbana (em cães e gatos) é de responsabilidade do Ministério de Saúde (MS) (FERREIRA et al., 2012).

A raiva dos herbívoros é controlada pela vacinação dos animais em áreas endêmicas e pelo controle das populações de morcegos hematófagos (BATISTA et al., 2007).

O Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) busca reduzir a prevalência da doença na população de herbívoros domésticos. Esta estratégia está baseada principalmente na vigilância epidemiológica, vacinação dos animais e controle do morcego *Desmodus rotundus* (BRASIL, 2009).

Para o controle das populações de morcegos hematófagos são geralmente empregados métodos baseados na aplicação de uma pasta contendo uma substância anticoagulante, a qual é aplicada topicamente em morcegos capturados e posteriormente liberados para retornar a sua colônia. Como os morcegos têm o hábito de limparem-se mutuamente, o anticoagulante aplicado deverá levar à eliminação de vários indivíduos na colônia (BATISTA et al., 2007).

2.3.6.1 Vacina

A vacinação é o melhor método de profilaxia da raiva por ser efetivo e de baixo custo, portanto é importante a busca por alternativas que possam aumentar a eficácia da vacinação contra o vírus rábico (ROSA et al., 2013).

Os cuidados para a correta conservação e aplicação da vacina são indispensáveis para alcançar uma prevenção de qualidade. Em surto descrito por Braga e colaboradores (2013), embora os proprietários relatassem a vacinação dos animais, as condições de conservação da vacina eram desconhecidas, e falhas relacionadas à dose ou via de aplicação da vacina podem ter ocorrido, influenciando a proteção inadequada dos animais.

A vacinação de bovinos, principalmente em áreas de alta concentração de morcegos hematófagos, não tem mostrado resultados plenamente satisfatórios, inclusive com registro de casos de raiva em animais vacinados (ALBAS et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a titulação de anticorpos neutralizantes antirrábicos igual ou superior a 0,5 UI/ml, para proteger os seres humanos dos riscos da infecção com o vírus rábico, sendo que diversos autores defendem a teoria de que este também é o título mínimo protetor para os bovinos (FERREIRA et al., 2009).

Para a vacinação, a tendência é a utilização de vacinas inativadas, que representam atualmente 95% das vacinas para bovinos comercializadas no Brasil (BATISTA et al., 2007).

Reis e colaboradores (2003) relatam que entre os animais diagnosticados com raiva, avaliados durante um determinado período, apenas

7,02% não haviam sido vacinados contra tal doença. Isso reforça a necessidade de estudos sobre a real eficácia das vacinas comercializadas, bem como sugere a pesquisa de métodos que estimulem uma adequada resposta imune.

No Brasil, após a primovacinação com a antirrábica, é comum ocorrer ineficiência da imunidade com as vacinas comercializadas, mesmo com seus valores antigênicos dentro do parâmetro recomendado, segundo seus fabricantes; sendo assim, é evidente a necessidade da busca de alternativas que aumentem a eficácia da vacinação (GENARO et al., 2014). A detecção sérica de anticorpos neutralizantes específicos evidencia a resposta imune da vacinação do animal (OLIVEIRA et al., 2000).

3. ARTIGO

RESPOSTA IMUNE HUMORAL ANTIRRÁBICA EM BEZERRAS HOLANDESAS SUPLEMENTADAS COM ZINCO E SELÊNIO ORGÂNICOS¹

Calinca B. Levatti², Luiz F. C. Cunha Filho³, Flavio A. Barca Junior⁴, Neuza M. F. Gallina⁵

RESUMO – Levatti C.B., Cunha Filho L.F.C., Barca Junior F.A. & Gallina N.M.F. 2015. Resposta imune humoral antirrábica em bezerras holandesas suplementadas com zinco e selênio orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Norte do Paraná, Rodovia PR-218, Km 1, Jardim Universitário, Arapongas, PR 86702-670, Brasil. E-mail: luiz.cunha@unopar.br

A vacinação é uma importante ferramenta no controle e profilaxia da raiva animal, e microminerais como zinco e selênio têm sido utilizados na alimentação de ruminantes para obter melhor resposta imunológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação da dieta com zinco e selênio orgânicos na resposta imune humoral e na persistência de anticorpos antirrâbicos em bezerras holandesas primovacinaadas. Foram selecionadas aleatoriamente 37 bezerras holandesas de uma propriedade localizada no município de Arapoti, estado do Paraná, com idade média de três meses. As bezerras foram divididas em três grupos: grupo controle (GC, n=13), sem suplementação adicional, grupo zinco (GZn, n=13) suplementado com 2 gramas de zinco orgânico por animal por dia, e grupo selênio (GSe, n=11) suplementado com 0,5 gramas de selênio orgânico por animal por dia. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 90 dias, logo após foram vacinados contra raiva (dia 0), utilizando vacina comercial inativada, e foram mensurados os títulos de anticorpos antirrâbicos em sete momentos distintos (dia 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 390), pelo Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a titulação de anticorpos neutralizantes antirrâbicos igual ou superior a 0,5 UI/ml para proteger os indivíduos dos riscos da infecção com o vírus rábico. Os valores médios de títulos de anticorpos antirrâbicos encontrados 30 dias após a primovacinação foram de 2,15±1,49UI/ml no GC, 2,26±1,44UI/ml no GZn, e 1,69±0,94UI/ml no GSe; e no dia 390 foram de 0,78±0,62UI/ml no GC, 0,77±0,69UI/ml no GZn, e 1,27±1,35UI/ml no GSe, demonstrando títulos similares estatisticamente e protetores contra a doença em todos os grupos. A suplementação mineral oral de zinco e selênio orgânicos não incrementou a resposta imune humoral, entretanto após 390 dias da primovacinação, todos os grupos mantiveram médias de títulos protetores acima do recomendado pela OMS. Houve uma queda bastante acentuada da porcentagem dos animais protegidos entre os dias 180 e 240, justificando a importância da vacinação semestral em áreas consideradas endêmicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: microminerais, persistência de anticorpos, raiva, bovinos, suplementação mineral.

¹Received on

Accepted for publication on

²Mestranda de Saúde e Produção de Ruminantes, Universidade Norte do Paraná, Rodovia PR-218, Km 1, Jardim Universitário, Arapongas, PR, 86702-670, Brazil. E-mail: calinca_levatti@hotmail.com

³Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Norte do Paraná, Rodovia PR-218, Km 1, Jardim Universitário, Arapongas, PR, 86702-670, Brazil. E-mail: luiz.cunha@unopar.br

⁴Departamento de Estatística, Universidade Norte do Paraná, Rodovia PR-218, Km 1, Jardim Universitário, Arapongas, PR, 86702-670, Brazil. E-mail: flavio.barca@unopar.br

⁵Departamento de Raiva, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, nº 1500, Butantã, São Paulo, SP, 05503-900, Brazil. E-mail: neuza.gallina@butantan.gov.br

ABSTRACT [The humoral rabies immune response in holstein calves supplemented with organic zinc and selenium] The vaccination is an important tool in the control and prevention of animal rabies, and trace elements like zinc and selenium have been used in ruminant feed to get better immunological response. The aim of this research was to evaluate the effect of the supplementation of diet with organic zinc and selenium in the humoral immune response and in the persistence of rabies antibodies in Holstein calves first vaccination. Were randomly selected 37 Holstein calves, of a property located in the city of Arapoti, state of Paraná, with average age of three months, which have never been vaccinated against rabies. These calves were divided in three groups: control group (GC, n=13), without additional supplementation; zinc group (GZn, n=13), supplemented with 2.0 grams of organic zinc per calf per day; and selenium group (GSe, n=11), supplemented with 0.5 grams of organic selenium per calf per day. The animals were submitted to a period of adaptation of 90 days, and right after, they were antirabies vaccinated (day 0), using commercial vaccine inactivated, and it was measured the antirabies titration in seven different times (day 0, 30, 60, 120, 180, 240 and 390), by the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). The World Health Organization (WHO) recommends the titration of rabies neutralizing antibodies equal or higher than 0.5IU/ml to protect individuals from the risk of infection with the rabies virus. The average figures of rabies antibodies titers found 30 days after the first vaccination were $2,15 \pm 1,49$ IU/ml in the GC, $2,26 \pm 1,44$ IU/ml in the GZn, and $1,69 \pm 0,94$ IU/ml in the GSe; and the figures found in the day 390 were $0,78 \pm 0,62$ IU/ml in the GC, $0,77 \pm 0,69$ IU/ml in the GZn, and $1,27 \pm 1,35$ IU/ml in the GSe, therefore showing statistically similar titers and protective against the disease in all groups. The oral mineral supplementation of organic zinc and selenium did not increment the humoral immune response, nevertheless, after 390 days of the first vaccination, all groups maintained averages protective titers above recommended by WHO. There was a very sharp drop in the percentage of protected animals between days 180 and 240, justifying the importance of the half-yearly vaccination in endemic areas.

INDEX TERMS: trace elements, persistence antibodies, rabies, cattle, mineral supplement.

INTRODUÇÃO

Os microminerais são essenciais para a saúde e imunidade, e sua deficiência aumenta a susceptibilidade a doenças (Yatoo et al. 2013). Alguns microminerais, entre eles zinco e selênio, atuam no sistema celular antioxidante, melhorando a resposta imunológica e contribuindo para o aumento da resistência às infecções, minimizando a ação prejudicial dos radicais livres (Borges & Paschoal 2013).

As células imunológicas e seus mecanismos de atividade fagocitária são afetados pela deficiência de microminerais e, conseqüentemente, a suplementação com estes elementos pode estimular o sistema imunológico (Yatoo et al. 2013).

A vacinação é a forma mais eficaz de profilaxia da raiva por ser efetivo e de baixo custo, portanto é importante a busca por alternativas que possam aumentar a eficácia da vacinação contra o vírus rábico (Rosa et al. 2013). Para que haja um estado imunitário suficiente para proteger os humanos expostos ao risco de infecção, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a avaliação de titulação de anticorpos e considera efetiva a imunização ao se atingir um título de anticorpos igual ou superior a 0,5 UI/ml (WHO 1992), sendo que este também é considerado o título mínimo protetor para bovinos (Ferreira et al. 2009).

Enquanto que em humanos é possível realizar a titulação de anticorpos neutralizantes antirrábicos para acompanhamento da proteção vacinal, em bovinos e outros ruminantes este procedimento é inviável, sendo portanto, recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a vacinação semestral compulsória em áreas consideradas endêmicas.

Pode ocorrer a ineficiência da imunidade na primovacinação das vacinas antirrábicas liberadas e comercializadas, mesmo com seus valores antigênicos dentro dos parâmetros de normalidade, segundo seus fabricantes; evidenciando assim, a necessidade de alternativas que aumentem a eficácia da vacinação (Genaro et al. 2014).

Deve-se ressaltar que a enfermidade raiva é apenas um modelo experimental, e o presente trabalho poderia ser desenvolvido utilizando qualquer outra doença, sendo escolhida a raiva por ser uma zoonose, 100% fatal em animais, e com adequada resposta imune após vacinação.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação da dieta com zinco e selênio orgânicos na resposta imune humoral e na persistência de anticorpos neutralizantes antirrábicos em bezerras holandesas primovacinadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no município de Arapoti, no estado do Paraná, situado na latitude 24°9'2" e longitude 49°49'33", pertencente a região considerada endêmica para raiva. O estudo foi desenvolvido no período de abril de 2013 a abril de 2014, em uma propriedade altamente tecnificada, com sistema de criação intensivo (*free-stall*), e produção média de 4600 litros de leite por dia, com 165 vacas em lactação. O sistema de produção utilizado no experimento foi o semi-intensivo, onde os animais eram confinados durante o dia, recebendo silagem de milho, concentrado próprio para bovinos de leite, e suplemento mineral contendo 6.050mg/Kg de zinco, 750 mg/Kg de zinco orgânico, e 30,1 mg/Kg de selenito, sendo o consumo estimado deste concentrado de 80 g/animal/dia. No período noturno tinham acesso às áreas de pastagens, formadas com Tifton 85 (*Cynodon ssp*).

Foram utilizadas trinta e sete bezerras da raça holandesa, filhas de mães vacinadas contra raiva, com idade média de três meses. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: treze animais no grupo controle (GC), treze animais no grupo suplementado com zinco orgânico (GZn) e onze animais no grupo suplementado com selênio orgânico (GSe). Todos os animais foram vermifugados e vacinados contra outras doenças (IBR, BVD, leptospirose, brucelose, rotavírus e febre aftosa), conforme o calendário sanitário pré-estabelecido na propriedade.

Inicialmente, todos os animais envolvidos no projeto foram avaliados clinicamente, considerando os parâmetros de peso e escore corporal. Também foram submetidos à venopunção jugular para coleta de sangue, em tubos Vacutainer®, para obtenção de hemossoro e titulação de anticorpos antirrábicos de origem passiva.

Os animais passaram por um período de adaptação, com duração de 90 dias, onde os animais do GZn receberam diariamente em sua dieta a suplementação adicional de 2 g de zinco orgânico/animal, e os animais do GSe receberam 0,5 g de selênio orgânico/animal, enquanto os animais do GC receberam apenas a quantidade de zinco e selênio na concentração já existente na dieta normal. As fontes de zinco e selênio orgânicos utilizados foram o Bioplex Zinco® e Sel-plex®, produzidos por Alltech do Brasil®.

Após o término desse período, no dia zero, todos os animais, com idade média de seis meses, foram submetidos à nova coleta de sangue e à primovacinação contra raiva, utilizando a vacina comercial inativada Alurabiffa® (Merial®), na dose de 2 ml, via subcutânea, na região da paleta, conforme orientação do fabricante. Trinta dias após esta imunização, de acordo com a recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, os animais receberam reforço vacinal. As vacinas utilizadas foram mantidas em caixas isotérmicas, com gelo descartável, respeitando a temperatura de conservação recomendada; e foram aplicadas utilizando seringa descartável e agulhas individuais.

Seguindo o mesmo método do início do trabalho, no dia zero foram realizadas novas coletas de sangue de todos os animais e, a partir deste momento, estas coletas foram realizadas nos dias 30, 60, 120, 180, 240 e 390. Em todas as coletas para avaliação da titulação de anticorpos neutralizantes antirrábicos, as alíquotas foram obtidas após centrifugação 4000 X G das amostras, durante dez minutos, e foram acondicionadas em frascos tipo Eppendorf®, conservadas a -20°C, até posterior envio ao Instituto Butantan, onde foi titulada pelo método RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test).

A suplementação mineral diferenciada foi fornecida junto à ração, uma vez ao dia, durante os 90 dias do período de adaptação, e durante os primeiros 270 dias do período experimental. Por este fato, exceto pela suplementação adicional com zinco e selênio orgânicos, que foi objeto de estudo deste trabalho, a qualidade de dieta entre os grupos foi semelhante.

O experimento foi realizado respeitando as normas do Comitê de Ética na utilização de animais em pesquisa (CEA/UNOPAR n° 005/13). Para análise estatística dos dados foi utilizado pacote estatístico Minitab 13.0, dados quantitativos por meio da análise de variância, com nível mínimo de significância de 5%, as médias foram comparadas através do teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste exato de Fischer, com nível mínimo de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados dos títulos de anticorpos neutralizantes antirrábicos estão demonstrados na tabela 1. A titulação de anticorpos neutralizantes antirrábicos de todos os grupos obtida no dia zero foi negativa (tabela 1).

Os valores médios de títulos de anticorpos neutralizantes antirrábicos encontrados 30 dias após a primovacinação (tabela 1) demonstram títulos similares estatisticamente entre todos os grupos, sendo $2,15 \pm 1,49$ UI/ml no GC, $2,26 \pm 1,44$ UI/ml no GZn, e $1,69 \pm 0,94$ UI/ml no GSe. Após o reforço vacinal, a titulação se manteve estatisticamente similar entre os grupos, com GC $28,68 \pm 20,00$, GZn $37,76 \pm 21,56$ e GSe $32,69 \pm 10,80$.

A resposta humoral antirrábica 390 dias após a primovacinação confirma que todos os grupos mantiveram títulos protetores (GC $0,78 \pm 0,62$, GZn $0,77 \pm 0,69$, e GSe $1,26 \pm 1,35$).

Ao final do experimento concluiu-se que os animais não tiveram doenças clínicas, não sofreram espoliação por morcegos hematófagos, e mantiveram o escore corporal e peso adequado para a faixa etária, demonstrando a não interferência de fatores extrínsecos nos resultados.

DISCUSSÃO

As bezerras ocupam uma posição especial na cadeia de produção do leite, devendo-se ressaltar que o manejo de cria a que forem submetidas refletirá sobre sua vida produtiva, influenciando significativamente seu futuro desempenho como produtora de leite.

A vacinação contra doenças virais como a raiva é uma das melhores alternativas para a prevenção da doença, porém não se pode afirmar que todos os animais vacinados estão efetivamente protegidos. Vários fatores podem interferir na resposta imune do animal, entre eles a idade, score corporal, manejo, dieta e presença de anticorpos passivos. Para minimizar essas falhas, estudos têm demonstrado que a suplementação da dieta com minerais pode ser uma alternativa para melhorar a resposta imune dos animais após a vacinação. Segundo Yattoo et al. (2013), a suplementação de bezerras com zinco e selênio orgânicos nos sistemas de criação pode estimular o sistema imune e melhorar a resposta humoral.

Diversos estudos têm sido realizados no Brasil para avaliar os níveis de anticorpos de bovinos vacinados contra raiva (Albas et al. 1998, Silva et al. 2000, Piza et al. 2003, Queiroz da Silva et al. 2003, Albas et al. 2005, Giometti et al. 2006, Ferreira et al. 2009, Maria et al. 2009).

O Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), visa o controle da doença, principalmente através da vacinação estratégica das espécies susceptíveis, a qual deve ser adotada em bovídeos e eqúdeos com idade igual ou superior a três meses, sendo que os animais primovacinação devem ser revacinados 30 dias após a primeira vacinação (Brasil 2009). Apesar desta recomendação, os animais foram primovacinação com idade média de 6 meses de idade, para evitar a influência de imunidade passiva.

As bezerras utilizadas neste estudo não apresentaram títulos de anticorpos no soro antes do início da vacinação, apesar de serem crias de mães vacinadas. Entretanto no dia 0, um dos animais do GSe foi excluído do experimento por apresentar titulação antirrábica de $0,4$ UI/ml, sendo considerada uma titulação alta para um animal não vacinado. Provavelmente, essa titulação decorreu da interferência de anticorpos colostrais maternos, por ser um dos animais mais novos do estudo.

Na vacinação antirrábica de animais jovens, a presença de anticorpos colostrais pode inibir o estabelecimento da imunidade ativa. Isso ocorre devido ao bloqueio da atividade do receptor da célula B, pela conjugação dos anticorpos específicos com os receptores de fragmento cristalizável de imunoglobulinas das células B, inibindo a produção adicional de mais anticorpos da mesma especificidade e impedindo sucesso na vacinação de animais jovens, pois os anticorpos maternos mascaram epítomos dos agentes vacinais impedindo seu reconhecimento pelas células B. Com isso, a resposta imune só se desenvolve quando os anticorpos maternos chegarem abaixo do limiar crítico. Esse período pode durar meses, dependendo da quantidade de anticorpos transferidos para o neonato e da meia vida da imunoglobulina (Tizard 2004).

Arnold, Stouraits & Salvatierra (1973) avaliaram a interferência de anticorpos antirrábicos colostrais em bezerros filhos de mães revacinadas seis meses antes do parto, e foram detectados anticorpos maternos até o 6º

mês de vida. Portanto a exclusão desse animal do grupo GSe garantiu que os resultados apresentados nesse estudo não sofressem influência da variável anticorpos colostrais.

Os três grupos apresentaram titulação satisfatória com apenas uma dose da vacina inativada, ou seja, no dia 30 (tabela 1), diferentemente dos resultados apresentados por Albas et al. (2005), onde os animais estudados não conseguiram atingir a titulação mínima de 0,5UI/ml com apenas uma dose da vacina antirrábica. Isso pode ter ocorrido devido à qualidade da dieta recebida pelos animais, bem como ao manejo intensivo ao qual eram submetidos, o que justifica também a boa performance do grupo controle. Outra característica que pode ter contribuído com a diferença de resultados é o fato de que Albas et al. (2005) trabalharam com animais zebuínos, enquanto que nesta pesquisa os animais estudados eram taurinos.

É importante ressaltar que apesar de pertencerem à mesma família (*Bovidae*) e espécie (*Bos taurus*), os zebuínos pertencem à subespécie *Bos taurus indicus*, enquanto que os taurinos pertencem à *Bos taurus taurus* e, portanto, apresentam algumas particularidades. Os animais taurinos possuem baixa tolerância ao clima tropical, menor resistência a ectoparasitas e endoparasitas, e possuem maior exigência nutricional para um bom desempenho produtivo, enquanto que os animais zebuínos são mais resistentes às adversidades climáticas e ambientais. Dessa forma, dependendo da época da vacinação e da subespécie vacinada, alguns fatores podem contribuir para uma resposta imune com maior ou menor eficácia.

Trabalhos realizados por Silva et al. (2000), Queiroz da Silva et al. (2003) e Piza et al. (2003) afirmam que a resposta imune induzida por apenas uma dose de vacina não infere em altos títulos. Entretanto, ao se observar os dados individuais na tabela 2, nota-se que, no dia 30, a porcentagem de animais considerados protegidos foi bastante elevada, apesar de ainda haver animais com titulação abaixo de 0,5UI/ml no GZn e GSe.

A resposta imune humoral antirrábica nos bovinos deste estudo foi bastante heterogênea, apresentando animais que não responderam a adequadamente à primeira dose da vacina, e apresentaram títulos de anticorpos bastante inferiores a 0,5UI/ml, intercalados com outros que apresentaram título protetor mínimo (próximo de 0,5UI/ml) ou elevados (acima de 1,0ml). Este fato também foi observado por Giometti et al. (2006) e Ferreira et al. (2009), que trabalharam com bovinos primovacinaados da raça Nelore, e também utilizaram vacina inativada. Portanto esta variação nos títulos de anticorpos em bezerros pode ser uma característica fisiológica individual da resposta imune humoral antirrábica em bovinos primovacinaados.

Os valores médios encontrados no dia 60, ou seja, 30 dias após o *booster* vacinal, confirmam o trabalho de Albas et al. (1998), que afirma que quando se utiliza doses de reforço, os títulos aferidos se tornam bastante superiores. No presente trabalho, pode-se observar um aumento de até 19 vezes, se comparado com a titulação após a primeira dose. Na tabela 2 pode-se observar ainda que no dia 60, todos os animais estudados estavam protegidos contra raiva, valor que se manteve no mínimo até o dia 120.

Carvalho, Barbosa & McDowell (2003) afirmam que o efeito protetor das vacinações é mais eficaz quando há um correto balanceamento nutricional, principalmente dos microminerais, pois para a efetiva proteção vacinal é necessária uma memória imunológica máxima por parte do linfócito T, sendo que sem essa característica não haverá uma boa resposta imune. De acordo com as condições a que os animais experimentados foram submetidos, pode-se afirmar que a dieta com alta qualidade, com níveis superiores de microminerais, influenciou uma eficiente resposta imune frente à vacinação contra raiva.

Aos 13 meses após a vacinação, 60,9% dos animais dos três grupos demonstraram ainda estar protegidos (tabela 2), apresentando um resultado contrário ao descrito por Queiroz da Silva et al. (2003) e Albas et al. (2005), que afirmam não haver mais títulos protetores após 180 dias da primeira vacinação.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) considera que, para efeito de revacinação, a duração da imunidade conferida pela vacina é de, no máximo, 12 meses. Entretanto, cada estado pode legislar complementarmente sobre a necessidade de vacinação compulsória e sistemática em áreas endêmicas (Brasil 2009). É importante também ressaltar que a vacina inativada é mais segura e pelo menos tão eficiente quanto à vacina de vírus vivo modificado, conforme Silva et al. (2000), sendo a recomendada pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH).

Observando a tabela 2, pode-se notar que até o dia 240 os grupos suplementados com minerais orgânicos apresentaram uma maior porcentagem de animais protegidos (GZn 84,6%, GSe 81,8%) quando comparados ao grupo sem adicional de minerais (GC 61,5%), embora essa diferença não seja significativa estatisticamente. Entretanto, ao se encerrar o fornecimento dos microminerais no dia 270, a porcentagem dos animais suplementados considerados protegidos apresentou uma queda brusca (GZn 61,5%, GSe 54,5%), enquanto que a quantidade de animais protegidos no grupo controle praticamente se manteve (GC 66,7%), o que

sugere um possível efeito positivo dos minerais orgânicos na persistência do título da resposta imune humoral dos animais.

Similares aos resultados apresentados neste estudo, Maria et al. (2009), afirmaram que bovinos nelore suplementados com zinco não apresentaram titulação antirrábica estatisticamente significativa maior do que animais não suplementados, embora os animais tratados apresentassem melhor resposta imune humoral. Cabe salientar que nesse trabalho o sistema de criação era extensivo, os animais eram zebuínos, e o zinco utilizado era na forma inorgânica. Em outro estudo (Genaro et al. 2014), ovinos suplementados com probiótico, e ovinos suplementados com probiótico e zinco apresentaram maior cobertura vacinal (86% em ambos os grupos), quando comparados a ovinos sem suplementação (53%), 60 dias após vacinação contra raiva.

Outro fator de destaque é que a imunoprofilaxia antirrábica em bezerras leiteiras se mostrou um modelo experimental imunológico adequado, devido ao método de transmissão da doença ao animal, através da espoliação do morcego contaminado, e à característica de altíssima mortalidade, facilitando assim as pesquisas que utilizam um maior período experimental, como os estudos com microminerais, que requerem vários meses de suplementação para que ocorra o efeito desejado.

CONCLUSÕES

A suplementação mineral oral de zinco e selênio orgânicos não incrementou a resposta imune humoral antirrábica, entretanto após 390 dias da primovacinação, todos os grupos mantiveram médias de títulos protetores acima do recomendado pela OMS. Houve uma queda bastante acentuada da porcentagem dos animais protegidos entre os dias 180 e 240, justificando a importância da vacinação semestral em áreas consideradas endêmicas.

REFERÊNCIAS

- Albas A., Pardo P.E., Gomes A.A.B., Bernardi F., Ito F.H. 1998. Effect of a booster-dose of rabies vaccine on the duration of virus neutralizing antibody titers in bovines. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.4, n.31, p.367-371.
- Albas A., Pardo P.E., Bremer Neto H., Gallina N.M.F., Mourão Fuches R.M., Sartori A. 2005. Vacinação antirrábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.2, p.153-159.
- Albas A., Fontolan O.L., Pardo P.E., Bremer Neto H., Sartori A. 2006. Interval between first dose and booster affected antibody production in cattle vaccinated against rabies. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.12, n.3, p.476-486.
- Arnold R.M., Stouraits P., Salvatierra J. 1973. Immunity against paralytic rabies in cattle following vaccination with ERA vaccine under ranch conditions in Bolivia. *Tropical Animal Health Production*, v.5, p.6-11.
- Borges L.E.M., Paschoal J.J. 2013. Influência dos micro-minerais (Cu, Mn, Se e Zn) no sistema imunológico dos bovinos. *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU*, v.3.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Programa Nacional de Controle de Raiva em Herbívoros. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS.
- Carvalho F.A.N., Barbosa F.A., McDowell L.R. 2003. *Nutrição de bovinos a pasto*. Belo Horizonte: Papel Form.
- Ferreira L.A., Pardo P.E., Frazatti-Gallina N.M., Mourão-Fuches R.M., Ventini D.C., Kronka S.N., Arenas S.E, Reis L.S.L.S. 2009. Avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos. *Semina: Ciências Agrárias*, v.30, n.3, p.655-660.

- Genaro S.C., Pardo P.E., Giuffrida R., Frazatti-Gallina N.M. 2014. Suplementação nutricional da produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados contra raiva. *Semina: Ciências Agrárias*, v.35, n.3, p.1359-1368.
- Giometti J., Chiacchio S.B., Albas A., Pardo P.E., Bremer Neto H., Giometti A.I., Reis L.S.L.S. 2006. Influência da suplementação com crômio na resposta imune humoral antirrábica em bovinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.4, p.421-427.
- Maria E.K., Pardo P.E., Frazatti-Gallina N.M., Paoli R.L., Mourão-Fuches R.M., Reis L.S.L.S. 2009. Suplementação com zinco não influencia a resposta imune humoral antirrábica em bovinos. *Archivos de Zootecnia*, v.58 (supl. 1), p.605-608.
- Piza A.T., Pieri K.M.S., Lusa G.M., Caporale G.M.M., Terreran M.T., Machado L.A., Zanetti C.R.B. 2003. Effect of contents and form of rabies glycoprotein on the potency of rabies vaccination in cattle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.2, p.265-268.
- Queiroz da Silva L.H., Cardoso T.C., Perri S.H.V., Pinheiro D.M., Carvalho C. 2003. Pesquisa de anticorpos antirrábicos em bovinos vacinados da região de Araçatuba, SP. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.70, n.4, p.407-413.
- Rosa E.R., Soares F.M., Pacheco A.M., Montanha F.P., Gallina N.M.F., Pardo P.E. 2013. Avaliação da resposta imune humoral em bovinos vacinados com a antirrábica e suplementados com probiótico. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Ano XI, n.20.
- Silva A.C.R., Caporale G.M.M., Gonçalves C.A., Targueta M.C., Comin F., Zanetti R., Kotait I. 2000. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.42, n.2, p.95-98.
- Tizard I.R. 2004. *Veterinary Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders, p.221-233.
- WHO. 1992. Expert Committee on rabies. WHO Technical Report Series 824. Geneva.
- Yatoo M.I., Saxena A., Deepa P.M., Habeab B.P., Devi S., Jatav R.S., Dimri U. 2013. Role of trace elements in animals: a review. *Veterinary World*, v.6, n.12, p.963-967.

Tabela 1: Média dos títulos (UI/ml) de anticorpos antirrábicos em bezerras holandesas vacinadas contra raiva e suplementadas com zinco e selênio orgânicos

	n	D0	D30	D60	D240	D390
Grupo Controle (GC)	13	N	2,155±1,494 aB	28,68±20,00 aA	1,027±1,171 aB	0,780±0,621 aB
Grupo Zinco (GZn)	13	N	2,264±1,444 aB	37,76±21,56 aA	1,217±1,131 aB	0,775±0,690 aB
Grupo Selênio (GSe)	11	N	1,689±0,944 aB	32,69±10,80 aA	1,711±1,875 aB	1,266±1,352 aB
p-valor			0,612	0,511	0,541	0,411

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam não haver diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam não haver diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Tabela 2: Porcentagem de animais com títulos protetores para raiva ($\geq 0,5$ UI/ml) após a vacinação

	D30	D60	D120	D180	D240	D390
Grupo Controle (GC)	100	100	100	92,3	61,5	66,7
Grupo Zinco (GZn)	83,3	100	100	92,3	84,6	61,5
Grupo Selênio (GSe)	91	100	100	90	81,8	54,5
p-valor	0,388	1,0	1,0	1,0	0,400	0,911

CONCLUSÃO GERAL

A suplementação mineral oral de zinco e selênio orgânicos não incrementou a resposta imune humoral antirrábica, entretanto após 390 dias da primovacinação, todos os grupos mantiveram médias de títulos antirrábicos protetores acima do recomendado pela OMS. Houve uma queda bastante acentuada da porcentagem dos animais protegidos entre os dias 180 e 240, justificando a importância da vacinação semestral em áreas consideradas endêmicas.

REFERÊNCIAS

Albas A, Pardo PE, Bremer Neto H, Gallina NMF, Mourão Fuches RM, Sartori A. Vacinação antirrábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, n.2, p.153-159, 2005.

Arenas SE, Reis LSLS, Frazzati-Gallina NM, Fujimura SH, Bremer Neto H, Pardo PE. Probiotic increase the antirabies humoral immune response in bovine. Archivos de Zootecnia, v.58, n.224, p.733-736, 2009.

Arthington JD. Nutrição mineral de gado de corte. In: Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos. Uberlândia: CONAPEC Jr., 2004.

Babboni SD, Modolo JR. Raiva: Origem, Importância e Aspectos Históricos. UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde, v.13, n.4, p.349-356, 2011.

Batista HBCR, Franco AC, Roehe PM. Raiva: uma breve revisão. Acta Scientiae Veterinariae, v.35, n.2, p.125-144, 2007.

Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. The Journal of Endocrinology, v.184, p.455-465, 2005.

Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep; 2006.

Borges LEM, Paschoal JJ. Influência dos micro-minerais (Cu, Mn, Se e Zn) no sistema imunológico dos bovinos. Cadernos de Pós-Graduação da FAZU, v.3, 2013.

Braga JFV, Souza FAL, Franklin FLAA, Beserra EEA, Barreto FM, Araújo Neto JC, Costa FAL, Silva SMMS. Surto de raiva em bovinos no estado do Piauí, Brasil. Acta Veterinaria Brasilica, v.7, n.2, p.176-179, 2013.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico. Brasília: MAPA/ACS, 2009.

Brunetto MA, Gomes MOS, Jeremias JT, Oliveira LD, Carciofi AC. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, n.2, p.230-232, 2007.

Carvalho FAN, Barbosa FA, McDowell LR. Nutrição de bovinos a pasto. Belo Horizonte: PapelForm; 2003.

Cortinhas CS, Botaro BG, Porcionato MAF, Reis CBM, Barreiro JR, Santos MV. Fornecimento de Fontes Orgânicas de Zinco, Cobre e Selênio para Vacas Leiteiras e Efeitos Sobre a Saúde da Glândula Mamária. In: Santos MV, Rennó FP, Silva LFP, Albuquerque R. *Novos Desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal*. Pirassununga: Editora 5D; 2009, p. 93-112.

Cummings JE, Kovacic JP. The ubiquitous role of zinc in health and disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.16, n.3, p.215-240, 2009.

Dantas CCO, Negrão FM. Funções e sintomas de deficiência dos minerais essenciais utilizados para suplementação dos bovinos de corte. *UNICiências*, v.14, n.2, p.199-223, 2010.

Enjalbert F. The relationship between trace elements status and health in calves. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.160, n.8-9, p.429-435, 2009.

Fernandes MEB, Costa LJC, Andrade FAG, Silva LP. Rabies in humans and non-human in the state of Pará, Brazilian Amazon. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.17, n.2, p.251-253, 2013.

Ferreira LA, Pardo PE, Frazati-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Ventini DC, Kronka SN, Arenas SE, Reis LSLS. Avaliação da vacinação antirrábica e da

suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos. Semina: Ciências Agrárias, v.30, n.3, p.655-660, 2009.

Ferreira RS, Almeida RMA, Nogueira DA, Oliveira NMS, Fiorini JE. Bovine rabies incidence in the state of Minas Gerais/Brazil, between 2002 and 2006. Arquivos do Instituto Biológico, v.79, n.2, p.287-291, 2012.

França J, Saad FMOB, Silva Junior JW, Numajiri LN, Pinto ABF, Chizzotti AF. Fontes suplementares de zinco para gatos adultos. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.9, n.3, p.449-459, 2008.

Genaro SC, Pardo PE, Giuffrida R, Frazati-Gallina NM. Suplementação nutricional da produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados contra raiva. Semina: Ciências Agrárias, v.35, n.3, p.1359-1368, 2014.

Gierus M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. Ciência Rural, v.37, n.4, 2007.

Glover AD, Puschner B, Rossow HÁ, Lehenbauer TW, Champagne JD, Blanchard PC, Aly SS. A double-blind block randomized clinical trial on the effect of zinc as a treatment for diarrhea in neonatal Holstein calves under natural challenge conditions. Preventive Veterinary Medicine, v.112, p.338-347, 2013.

Haddad CM, Alves FV. Novos conceitos e tecnologias na suplementação mineral de bovinos. II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, São Paulo, 2006.

Hefnawy AE, Pérez JT. Selenio y salud animal: importancia, deficiencia, suplementación y toxicidad. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v.11, n.2, p.153-165, 2008.

Kanitz FA, Kowalski AP, Batista HBCR, Carnieli Junior P, Oliveira RN, Weiblen R, Flores EF. Epidemiologia molecular de surto de raiva bovina na região central do Rio Grande do Sul, 2012. *Ciência Rural*, v.44, n.5, p.834-840, 2014.

Kinal S, Korniewicz A, Jamroz D, Ziemiński R, Slupczyńska M. Dietary effects of zinc, copper and manganese chelates and sulfates on dairy cows. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v.3, n.1, p.168-172, 2005.

Kotait I, Gonçalves CA, Peres NF, Souza MCAM, Targueta MC. Controle da raiva dos herbívoros. Manual Técnico do Instituto Pasteur. São Paulo, p.1-15, 1998.

Lima FG, Gagliani LH. Raiva: aspectos epidemiológicos, controle e diagnóstico laboratorial. *Revista UNIULUS Ensino e Pesquisa*, v.11, n.22, p.45-62, 2014.

Lucas WH, Prado TA. Importância da suplementação de zinco em bovinos de corte criados a pasto. *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU*, v.2, 2011.

Mendonça Junior AF, Braga AP, Rodrigues APMS, Sales LEM, Mesquita HC. Minerais: importância de uso na dieta de ruminantes. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v.07, n.1, p.1-13, 2011.

Moraes SS. Importância da suplementação mineral para bovinos de corte. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001.

Moraes SS, Nicodemo MLF, Vaz EC, Pires PP, Catanante MC, Thiago LRLS, Vieira JM, Fonseca EM. Avaliação da deficiência subclínica de zinco em vacas de cria e a relação com a higidez de seus bezerros. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 65, 2001.

Mottin C, Prado IN, Chefer DM, Eiras CE, Rivaroli DC. Suplementação com minerais quelatados em bovinos: uma revisão. *Revista Campo Digital*, v.8, n.2, p.59-70, 2013.

National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle, 6^a ed. Washington: Academy Press; 2001.

Oliveira AN, Andrade MCR, Silva MV, Moura WC, Contreiras EC. Immune response in cattle vaccinated against rabies. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.95, n.1, p.83-88, 2000.

Pasa C. Relação reprodução animal e os minerais. Revista Biodiversidade, v.9, n.1, p.101-122, 2010.

Pechova A, Pavlata L, Lokajova E. Zinc supplementation and somatic cell count in milk of dairy cows. Acta Veterinaria Brno, v.75, n.3, p.355-361, 2006.

Pedroso PMO, Colodel EM, Pescador CA, Arruda LP, Driemeier D. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imuno-histoquímica. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.29, n.11, p.899-904, 2009.

Pedroso PMO, Leal JS, Dalto AGC, Oliveira LGS, Driemeier D. Raiva em bovinos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil no período de 2002 a 2007. Acta Scientiae Veterinariae, v.40, n.1, p.1-6, 2012.

Peixoto PV, Malafaia P, Barbosa JD, Tokarnia CH. Princípios de suplementação mineral em ruminantes. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.25, n.3, 2005.

Quiroz-Rocha GF, Bouda J, Ordóñez VV. Importância do Diagnóstico de Deficiências de Cobre, Zinco e Selênio. In: González FHD, Borges JB, Cecim M (Eds.). Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000. p.43-45.

Radwinska J, Zarczynska K. Effects of mineral deficiency on the health of Young ruminants. *Journal of Elementology*, v.19, n.3, p.915-928, 2014.

Reis LSLS, Chiacchio SB, Pardo PE, Oba E, Giuffrida R, Frazzati-Gallina NM. Selenium supplementation enhances weight gain in cattle. *Archivos de Zootecnia*, v.57, n.218, p.271-274, 2008.

Reis LSLS, Chiacchio SB, Pardo PE, Takahira RT, Couto R, Oba E, Kronka SN. Efeito da suplementação com selênio sobre a concentração sérica de creatina kinase em bovinos. *Archivos de Zootecnia*, v.58, n.224, 2009.

Reis MC, Costa JN, Peixoto APC, Figueiredo LJC, Menezes RV, Ferreira MM, Sá JEU. Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística da Clínica de Bovinos (Oliveira dos Campinhos, Santo Amaro, Bahia), Universidade Federal da Bahia, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999 (Relato de caso). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.4, n.1, p.12-17, 2003.

Ribas NLKS, Carvalho RI, Santos AC, Valençuela RA, Gouveia AF, Castro MB, Mori AE, Lemos RAA. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.10, p.1183-1194, 2013.

Ribeiro AML, Vogt LK, Canal CW, Laganá C, Streck AF. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.4, 2008.

Rosa ER, Soares FM, Pacheco AM, Montanha FP, Gallina NMF, Pardo PE. Avaliação da resposta imune humoral em bovinos vacinados com a antirrábica e suplementados com probiótico. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Ano XI, n.20, 2013.

Sordillo LM. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. *Veterinary Medicine International*, v.2013, 2013.

Spears JW, Weiss WP. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal*, v.176, n.1, p.70-76, 2008.

Tizard IR. *Imunologia Veterinária: uma introdução*. 8ª ed. São Paulo: Roca; 2008.

Viero V, Fischer V, Machado SC, Zanela MB, Ribeiro MER, Barbosa RS, Stumpf Junior W, Cobuci JA. Efeito da suplementação com diferentes níveis de selênio orgânico e inorgânico na produção e na composição do leite e no sangue de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.2, 2010.

Vilela FG, Zanetti MA, Saran Netto A, Freitas Junior JE, Rennó FP, Barletta RV. Suplementação de dietas para bezerros nelore recém-desmamados com fontes de zinco orgânica e inorgânica. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.12, n.4, p.1008-1015, 2011a.

Vilela FG, Zanetti MA, Saran Netto A, Freitas Junior JE, Yoshikawa CYC. Biodisponibilidade de fontes orgânicas e inorgânicas de zinco em ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.2, 2011b.

WHO. Expert consultation on rabies. Second report. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, n.982, 2013.

Yatoo MI, Saxena A, Deepa PM, Habeab BP, Devi S, Jatav RS, Dimri U. Role of trace elements in animals: a review. *Veterinary World*, v.6, n.12, p.963-967, 2013.

ANEXOS

ANEXO A

Concentração dos macro e microminerais no organismo animal

Concentração dos minerais no organismo animal			
Macrominerais		Microminerais	
Elemento	Concentração (%)	Elemento	Concentração (ppm)
Cálcio (Ca)	1 – 2	Ferro (Fe)	80
Fósforo (P)	0,7 – 1,2	Zinco (Zn)	30
Potássio (K)	0,3	Cobre (Cu)	30
Enxofre (S)	0,25	Iodo (I)	0,4
Sódio (Na)	0,15	Manganês (Mn)	0,3
Cloro (Cl)	0,15	Cobalto (Co)	0,2
Magnésio (Mg)	0,045	Molibdênio (Mo)	1-4
		Selênio (Se)	0,02

Fonte: Adaptado de Mendonça Junior et al. (2011)

ANEXO B

Títulos de anticorpos antirrábicos neutralizantes (UI/ml) em soros de bovinos do Grupo Controle, Grupo Zinco e Grupo Selênio

GRUPO CONTROLE							
Bovino n°	D0	D30	D60	D120	D180	D240	D390
459	N	0,7	16,2	0,9	0,5	0,2	0,3
462	N	1,2	12,7	1,6	0,2	0,2	*
466	N	2,8	26,0	1,3	1,3	1,2	0,8
468	N	3,0	22,8	4,2	4,2	4,2	2,4
470	N	1,9	9,0	1,7	1,7	0,2	0,2
474	N	5,9	75,9	2,9	2,3	1,7	0,9
478	N	2,5	35,6	3,7	2,7	1,3	0,5
481	N	0,9	35,6	2,3	0,7	0,3	0,4
483	N	6,8	191,9	13,8	6,3	6,3	4,4
485	N	0,7	24,8	1,2	1,2	0,7	0,8
489	N	7,3	197,4	9,6	1,2	0,5	0,4
493	N	2,4	8,2	2,8	2,1	0,4	0,6
494	N	1,7	48,7	4,3	1,2	0,9	0,9

* Alíquota insuficiente para realização da avaliação da titulação

GRUPO ZINCO							
Bovino n°	D0	D30	D60	D120	D180	D240	D390
460	N	0,4	19,2	0,7	0,4	0,2	0,2
463	N	2,6	28,0	3,1	3,1	3,1	0,6
464	0,1	1,4	19,2	0,8	0,9	0,8	0,4
467	N	3,5	29,8	1,3	1,1	0,9	0,9
472	N	1,4	74,2	3,5	3,8	3,8	2,7
475	N	1,8	51,9	7,1	2,2	1,8	1,3
476	N	0,3	20,4	2,7	0,6	0,2	0,2
480	N	3,1	70,5	3,2	2,1	0,7	0,3
482	N	1,8	21,5	2,1	2,1	0,6	0,8
487	N	3,6	34,5	4,1	2,1	0,6	0,6
490	N	4,4	2,2	2,1	1,5	1,5	1,2
491	N	*	64,9	7,6	1,5	0,9	0,4
495	N	5,0	19,0	3,2	1,8	1,0	0,9

* Alíquota insuficiente para realização da avaliação da titulação

GRUPO SELÊNIO							
Bovino n°	D0	D30	D60	D120	D180	D240	D390
458	N	2,0	40,4	3,5	2,8	2,8	1,1
461	N	2,4	37,9	3,5	2,0	1,8	1,7
465	0,1	2,2	25,1	2,7	0,8	0,7	0,9
469	N	2,6	35,2	3,5	*	0,4	0,4
471	N	1,6	15,9	3,6	3,6	2,2	2,1
473	N	0,2	21,3	3,7	0,3	0,3	0,2
477	N	0,8	32,4	4,9	0,7	0,6	0,4
484	0,4	**	**	**	**	**	**
486	N	0,6	34,1	1,6	1,1	0,5	0,2
488	N	3,8	111,3	7,3	1,9	0,9	0,3
492	N	4,1	2,4	1,1	0,9	0,9	0,6
496	N	2,8	51,9	9,4	9,1	6,1	4,4

* Alíquota insuficiente para realização da avaliação da titulação

** Animal retirado do experimento

ANEXO C

Normas para preparação dos artigos científicos para submissão a publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as

informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian &

Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se

possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Pesq. Vet. Bras. 33(7), julho 2013