

**SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM PROBIÓTICO COM OU SEM ADIÇÃO
DE ZINCO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS CONTRA O VÍRUS
RÁBICO EM OVINOS VACINADOS CONTRA RAIVA**

SANDRA CRISTINA GENARO

**SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM PROBIÓTICOS COM OU SEM
ADIÇÃO DE ZINCO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS CONTRA O
VÍRUS RÁBICO EM OVINOS VACINADOS CONTRA RAIVA**

SANDRA CRISTINA GENARO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre na Área de Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo

636.208 51 Genaro, Sandra Cristina.

G324a

Suplementação nutricional com probiótico com ou sem adição de zinco na produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados contra raiva / Sandra Cristina Genaro. – Presidente Prudente, 2012.

43 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2012.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo

1. Raiva. 2. Probiótico. 3. Zinco. 4. Ovinos. I. Título.

SANDRA CRISTINA GENARO

**SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM PROBIÓTICOS COM OU SEM
ADIÇÃO DE ZINCO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS CONTRA O
VÍRUS RÁBICO EM OVINOS VACINADOS CONTRA RAIVA**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 09 de março de 2012

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Paulo E. Pardo
Universidade do Oeste Paulista
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Rogerio Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Antonio Cláudio Goulart Duarte
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro - RJ

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me dado forças nas horas em que precisei, por tudo o que tem feito em minha vida e por tudo que irá fazer.

Aos meus pais Oscar Genaro e Neide Bibiana Sanches Genaro, por serem meu porto seguro.

Ao meu filho Bruno Genaro Tanus, razão das minhas lutas.

Aos meus irmãos Vítor Genaro e André Genaro pela força e pelo apoio que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Eduardo Pardo, por ter acreditado em mim, pelos aconselhamentos, paciência e orientação.

Ao Prof. Dr. Antonio Cláudio Goulart Duarte, pelo carinho e amizade.

Aos professores, colaboradores e funcionários, em especial à Mariana Renata Panceira, que fizeram parte desta pesquisa e processo.

À coordenadora do Curso de Nutrição, Grace Facholli Garcia, pelo coleguismo e organização dos meus horários de aula para que pudesse me dedicar ao mestrado.

Ao Angelo José Garcia Borges, pela paciência nos meus momentos de estresse.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”.

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Suplementação nutricional com probióticos com ou sem adição de zinco na produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados contra raiva

Esse estudo avaliou o efeito da suplementação do probiótico com ou sem zinco (Zn), adicionado à mistura mineral, na produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados com uma única dose de vacina. Quarenta e cinco ovinos machos, mestiços Santa Inês, com idade de 6 meses foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (15 ovinos/grupo): Grupo controle (GC) recebeu 10 gramas de suplemento mineral/animal/dia, grupo probiótico (GP) recebeu 10 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico/animal/dia e grupo Probiótico e Zinco (GPZn) recebeu 10 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico e 14,4 mg de sulfato de zinco/animal/dia adicionado ao probiótico. Os títulos individuais de anticorpos foram determinados por meio da técnica de soroneutralização baseado no *RapidFluorescent Focus Inhibition Test* (RFFIT) e no *FluorescentInhibitionMicrotest* (FIMT). Não houve diferenças estatísticas significativas entre as médias de concentrações séricas entre os grupos. Conclui-se que a administração de probióticos com ou sem zinco não melhora a resposta imune humoral antirrábica.

Palavras-chave: Anticorpos, raiva, ovinos.

ABSTRACT

Nutritional supplementation with probiotics with or without added zinc on production of sericos antibodies against the virus rabico in ovine vaccinated against rabies

This study evaluated the effect of probiotics supplementation with or without Zinc (Zn), added to the mineral mixture, in humoral immune response in sheep vaccinated with a single dose of rabies vaccines. Forty-five malecrossbred rams Santa Inês, aged 6 months were randomly divided into 3 groups (15 animals / group): Control group (CG) received 10 grams of mineral / animal / day, the probiotics group (GP) received 10 grams of mineral added 4 grams of probiotics / animal / day and Probiotics and Zinc group (GPZn) received 10 grams of mineral added 4 grams of probiotics and 14.4 mg of zinc sulfate per animal per day added to the probiotics. The individual titles of neutralizing antibodies were determined using the technique of neutralization-based Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) and Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT). There were no statistically significant differences between the mean serum concentrations between groups. It was concluded that the probiotics administration with or without zinc did not improve the immune humoral response of antibody rabies.

Keywords: Antibody, rabies, sheep.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.	12
2.1 Raiva	12
2.2 Probiótico	13
2.3 Ovinos e Probióticos	17
2.4 Zinco.....	18
3 OBJETIVO.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
5 ARTIGO CIENTÍFICO.	27

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos, causada por um vírus neurotrópico, (GIOMETTI et al., 2006; ACHKAR et al., 2007; CONSALES; BOLZAN, 2007; REIS et al., 2008), onde no Brasil, o principal agente transmissor é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (ALBAS et al., 2006; SCHEFFER et al., 2007), que quando infectado transmite o vírus rábico pela saliva aos animais ao se alimentar de seu sangue (WRIGHT et al., 2002; RIBAS et al., 2003; HANKINS; ROSEKRANS, 2004).

A vacinação é o melhor método de controle da raiva por ser efetivo e de baixo custo (ALBAS et al., 2005, 2006), sendo assim, faz-se necessária a busca por alternativas que aumentem a eficácia da vacinação contra o vírus rábico. O uso de adjuvantes tem revelado bons resultados na restauração da resposta imunitária e na potencialização de vacinas em relação a diversos agentes patógenos (RODRIGUES et al., 2005)

Uma das estratégias para aumentar a resposta imunológica dos animais à imunidade induzida ou às infecções provocadas por vírus ou bactérias é o uso de probióticos (ARENAS, et al., 2009; FERREIRA et al., 2009) ou zinco (MARIA et al., 2009) ao suplemento mineral utilizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Raiva

Considerada uma das zoonoses de maior importância em Saúde Pública, não só por sua evolução drástica e letal, como também por seu elevado custo social e econômico (BRASIL, 2005a), a raiva é uma enfermidade infecciosa que causa encefalite fatal em todos os mamíferos (BRASIL, 2009). O vírus possui aspecto de um projétil e seu genoma é constituído por RNA. Apresenta dois antígenos principais: um de superfície, constituído por uma glicoproteína, responsável pela formação de anticorpos neutralizantes e adsorção vírus-célula, e outro interno, constituído por uma nucleoproteína, que é grupo específico (BRASIL, 2009).

O morcego hematófago *Desmodus rotundus* é o principal reservatório desta enfermidade (ALBAS et al, 2006; SCHEFFER et al., 2007; FERREIRA et al., 2009), onde o modo mais comum de transmissão da raiva se dá pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura e, mais raramente, pela arranhadura e lambadura de mucosas (BRASIL, 2009; OMS, 2009). O vírus penetra no organismo, multiplica-se no ponto de inoculação, atinge o sistema nervoso periférico e, posteriormente, o sistema nervoso central. A partir daí, dissemina-se para vários órgãos e glândulas salivares, onde também se replica e é eliminado pela saliva das pessoas ou animais enfermos. Todos os mamíferos são susceptíveis à infecção pelo vírus da raiva, (BRASIL, 2009) que é responsável por enormes prejuízos econômicos (FERREIRA et al., 2009; MARIA et al., 2009). Na América Latina, o prejuízo é da ordem de 30 milhões de dólares/ano, sendo que no Brasil este valor se aproxima de 15 milhões de dólares, com a morte de cerca de 40.000 cabeças bovinas. Os prejuízos indiretos, no Brasil, estão calculados em 22,5 milhões de dólares. (INSTITUTO PASTEUR, 2012).

Além das mortes de milhares de herbívoros, ocorrem também gastos indiretos com a vacinação e inúmeros tratamentos pós exposição (sorovacinação) de pessoas que mantiveram contato com animais suspeitos (BRASIL, 2005a).

A vacinação contínua é o método mais efetivo, de menor custo e reduz perdas econômicas (REIS et al., 2007; FERREIRA et al., 2009; MARIA et al., 2009),

pois a imunidade é conferida através de vacinação, acompanhada ou não por soro (BRASIL, 2005b).

Para que haja um estado imunitário suficiente para proteger indivíduos expostos ao risco de contaminação, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a avaliação da imunidade antirrábica através da titulação desses anticorpos e considera um título igual ou maior que 0,5 UI/mL (Unidades Internacionais/mL) (ALBAS, 2006, CHABEL et al., 2009). Entretanto, Rubi et al. (2003) relataram que o título de anticorpos antirrábicos protetores em ovinos seria de 1,10 UI/mL.

No Brasil, é comum 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 (MARIA et al., 2009). Portanto, é necessário buscar alternativas para aumentar a eficácia da vacinação contra o vírus da raiva (FERREIRA et al., 2009).

2.2 Probiótico

O termo probiótico deriva do grego, que significa “para a vida” (REID et al., 2003; PARDO; REIS, 2008).

Probióticos são suplementos alimentares que contém microrganismos vivos, que administrado em quantidade adequada, produzem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (animais e seres humanos) (MILES, 2007; HOLANDA et al., 2008), promovendo a saúde e não a cura de doenças (MORAES; COLLA, 2006; KARKOW; FAINTUCH; KARKOW., 2007; GUIAS..., 2008; PARDO; REIS, 2008; FERREIRA et al., 2009). É definido também como “uma preparação ou produto contendo determinado (s) microrganismo (s) viável (eis), em quantidades suficientes, que alteram a microbiota em um determinado compartimento do hospedeiro exercendo, deste modo pelo menos um efeito benéfico” (SCHREZENMEIR, 2001). Estes microrganismos são mundialmente utilizados como preparações farmacêuticas ou produtos fermentados. Em adição ao seu valor nutritivo, as leveduras parecem modular beneficemente os distúrbios do ecossistema gastrointestinal (MARTINS et al., 2005; PARDO; REIS, 2008).

A eficácia de utilização dos probióticos é estritamente dependente da quantidade e características das cepas de microrganismos utilizados na elaboração

do produto a ser utilizado como aditivo alimentar. As espécies bacterianas mais comuns para o preparo deste tipo de produtos são: *Lactobacillus bulgaris*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarium*, *L. reuteri*, *L. johonsie*, *Streptococcus thermophilus*, *Enderococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium ssp*, *Bacillus subtilis*, *B. toyoi*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* (MATOS, 2008).

Para um produto probióticos apresentar a alegação de promoção de saúde, no seu rótulo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece que a quantidade mínima viável da cultura deva estar entre 10^8 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por porção do produto (HOLANDA et al., 2008).

A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Os efeitos benéficos destes microrganismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano. O que se faz neste caso é a utilização, em grande quantidade, daqueles que possuem eficácia comprovada, podendo ser constituintes normais da microbiota (MARTINS et al., 2005). Para os animais, não há toxicidade e também nem deixam resíduos tóxicos nas carcaças, que muitas vezes são destinadas ao consumo humano (PARDO; REIS, 2008).

Uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde é a implementação de novas terapias que não atuem como uma forte pressão seletiva, propiciando a geração de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes (MARTINS et al., 2005). Esses produtos vêm substituindo outros promotores de crescimento, como os antibióticos, cujo uso na produção animal é indesejável porque sua utilização indiscriminada favorece o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos (PARDO; REIS, 2008).

O sistema digestório contém milhões de bactérias, o equilíbrio entre elas é muito importante inclusive para função imunológica. A microflora intestinal enfrenta desafios diários que podem causar um desequilíbrio entre bactérias saudáveis e patogênicas, como por exemplo, a má alimentação, o uso de antibióticos, estresse, intoxicação alimentar, dentre outros. Ao ingerir alimentos com probióticos, bactérias saudáveis que sobrevivem às secreções digestivas, chegam ao intestino grosso e são capazes de colonizar este ambiente, favorecendo o equilíbrio microbiano (MILES, 2007).

A microflora intestinal desempenha um importante papel na fermentação da fibra, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). AGCCs aumentam o fluxo de sangue para o cólon e fornecem às células da parede do intestino um combustível metabólico, principalmente sob a forma de butirato. Os AGCC também diminuem o pH do intestino grosso, o que cria um ambiente que impede o crescimento de bactérias nocivas. Um pH mais baixo também ajuda na absorção de minerais, como cálcio e magnésio (MILES, 2007).

O uso de probióticos e os efeitos da manipulação da microflora intestinal foi inicialmente observado por Metchnikoff (1907), que relatou os efeitos benéficos das bactérias produtoras de ácido láctico em prevenção e tratamento de doenças intestinais (DOSTA et al., 2009). A interação entre a cepa probiótica e a microflora intestinal pode ser baseada na competição com as bactérias patogênicas por sítios de adesão aos receptores epiteliais de nutrientes e produção de substâncias específicas, tais como bacteriocinas (MILES, 2007; DOSTA et al., 2009).

As bacteriocinas são substâncias peptídicas com atividades antimicrobianas produzidas por síntese ribossomal e são segregadas por um grande número de bactérias para inibir o crescimento de outros microorganismos competidores. Essas substâncias são produzidas por diferentes bactérias probióticas e podem servir como barreiras antimicrobianas e ajudar a reduzir os níveis de microorganismos patogênicos, melhorarem a digestibilidade e aumentar a atividade imunológica de muitas espécies animais (DOSTA et al., 2009; NG et al., 2009).

Dentre os efeitos benéficos dos probióticos, estão sua utilização como promotores de crescimento aumentando o ganho de peso em bovinos, a redução do pH intraluminal do tubo digestivo, minimizando o estresse, impedindo a colonização da mucosa intestinal por bactérias patogênicas e aumentando a resposta imune humoral. Observou-se também um aumento significativo nos títulos de anticorpos antirrábicos em bovinos primovacinados contra a raiva, além disso, também elevou para 100% a frequência de animais que apresentaram títulos de anticorpos protetores contra o vírus rábico (RASTEIRO et al., 2007; ARENAS et al., 2007; FERREIRA et al., 2009).

Os probióticos também atuam estimulando o sistema imunológico (ESPARZA; FRAGOSO, 2010; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011), porém esta ação ainda não está totalmente esclarecida (SILVA et al., 2006; PARDO; REIS, 2008). Essa ação imunoestimulante é atribuída às bactérias ácido lácticas (CROSS, 2002), entre elas:

Lactobacillus acidophilus, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* (KOENEN et al., 2004).

Quando uma substância estranha entra em contato com o organismo, é fagocitada e processada pelas células apresentadoras de antígeno. Estas células expõem este antígeno em sua membrana, a partir do complexo de histocompatibilidade (HLA) - classe II, que ao interagir com receptor na membrana do linfócito T CD4+ promove a proliferação de um clone específico de células T helper tipo 1 ou tipo 2, que de acordo com as citocinas secretadas (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011) (IFN-gama), interleucinas (IL-10) e o fator de necrose tumoral-alfa (ESPARZA; FRAGOSO, 2010), irão propiciar uma reação imunológica, reduzindo processos inflamatórios locais e estimulando a tolerância do organismo aos antígenos comuns (ESPARZA; FRAGOSO, 2010; SOUZA et al., 2010; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

Várias pesquisas têm demonstrado que os probióticos estimulam a atividade fagocítica dos leucócitos (OYETAYO; OYETAYO, 2005), aumentam a proliferação de linfócitos T, a atividade dos macrófagos e elevam a atividade das células *Natural Killer* (NK); ativam as células T Helper CD4+ subpopulação Th1 (OUWEHAND et al., 1999). Ainda modulam as bactérias da microflora intestinal, atuando no balanço Th1/Th2, promovendo o controle de processos infecciosos e imunológicos (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011). Aumentam também a produção de anticorpos e a secreção de mediadores químicos que estimulam o sistema imune (CROSS, 2002). Entre elas estão a produção de citocinas, interferon gama (IFN- γ), TNF, interleucina (IL) 1, IL-2, IL-10 e a IL-12 (OUWEHAND et al., 1999).

Argumenta-se que a utilização de probióticos possa contribuir na promoção do crescimento animal, melhora na conversão alimentar, maior absorção de nutrientes pelo controle da diferenciação e proliferação das células epiteliais, neutralização de fatores antinutricionais, melhora no metabolismo de carboidratos, cálcio e síntese de vitaminas, produção de enzimas microbianas para compensar atividades deficientes de enzimas do hospedeiro, eliminação ou controle de microrganismos patogênicos causadores de doenças subclínicas ou clínicas e estímulo da imunidade específica ou não específica no intestino, porém ainda são escassos e inconsistentes os estudos sobre a ação de microrganismos probióticos sobre os parâmetros ruminais e desempenho produtivo de ruminantes (MATOS, 2008).

2.3 Ovinos e Probióticos

O setor de produção de carne contribui expressivamente na economia brasileira tendo em vista que o produto brasileiro tem grande aceitabilidade no exterior. No que se refere à carne de ruminantes, embora a carne bovina tenha maior participação no Produto Interno Bruto que a ovina e caprina, em 2005 a criação de ovinos e caprinos teve um crescimento de 6,5%. Isso demonstra a tendência de crescimento do consumo no mercado interno (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2010).

Sendo animais de fácil adaptação em vários sistemas de produção, a criação de ovinos é encontrada em várias regiões do país. Possuem algumas características que tornam vantajosa a sua criação: produção de lã, carne e leite, além da facilidade de manejo e adaptação, quando comparado como, por exemplo, a bovinocultura. Devido a seu porte pequeno e facilidade de manejo, os ovinos são também utilizados como modelo experimental para posterior transposição de resultados a outras espécies (ROOS, 2006).

O Estado de São Paulo, entre 1995 e 2006, observou um crescimento do rebanho da ordem de 75,04%, que foi resultado dos investimentos na produção nos últimos anos. Ações da Associação Paulista de Criadores de Ovinos (ASPACO) em regiões do estado têm sido favoráveis a essa evolução com a adesão da associação ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Santa Inês para melhor desempenho dos rebanhos ovinos. O aumento da produção de carne de ovinos no Estado de São Paulo proporciona um crescimento da participação socioeconômica deste setor. A facilidade de sua criação e o aumento do mercado têm sido uns dos aspectos positivos para a ampliação da produção (STAUDT; PITHAN e SILVA, 2008).

Além das técnicas de melhoramento genético, controle sanitário e programas nutricionais têm sido utilizados para tornar a produção ovina mais rentável e competitiva. Para que isso seja possível, é necessário fornecer alimentação adequada a cada categoria animal, assim atendendo suas demandas com alimentação de qualidade (ROOS, 2006).

Nos últimos anos, as indústrias de alimentos que antes suplementavam as rações animais com antibióticos para promover o crescimento e controlar doenças,

estão aumentando a procura por uma alternativa, já que o uso prolongado desses produtos pode induzir ao aumento de populações bacterianas resistentes, causando risco significativo à saúde animal e humana, uma vez que para combater essas bactérias teriam que se usar antibióticos mais potentes. Sendo assim, os probióticos tornaram-se a opção mais plausível, pois são utilizados na prevenção e no tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, no controle de distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores, na inibição da carcinogênese, e como promotores de crescimento (ROOS, 2006).

Pesquisas recentes para avaliar a resposta imune de animais alimentados com dietas suplementadas com probióticos, revelaram, em sua grande maioria, os efeitos benéficos destes microorganismos ao estimularem de alguma maneira a resposta imune do hospedeiro, seja a resposta inata, a celular ou a humoral (ERICKSON; HUBBARD, 2000).

2.4 Zinco

O zinco, juntamente com o cobre, são os dois micronutrientes mais envolvidos em funções no organismo animal. É um componente essencial de mais de 200 sistemas enzimáticos no organismo de um animal superior (HADDAD; ALVES, 2006), sendo um elemento mineral essencial para os animais, pois faz parte da composição de várias metalo enzimas, vital para sua sobrevivência (PERES; KOURY, 2006; MARIA et al., 2009). É essencial na transformação de retinol em vitamina A e na mobilização desta no fígado. De modo geral, a ação da vitamina A é dependente de níveis adequados de zinco na dieta, o que nem sempre acontece em condições tropicais (HADDAD; ALVES, 2006). Também é indispensável para a integridade do sistema imunológico (HADDAD; ALVES, 2006; PERES; KOURY, 2006; MARIA et al., 2009), tornando os animais mais resistentes às doenças infecciosas (PERES; KOURY, 2006; MARIA et al., 2009). Atua nos processos de replicação dos linfócitos, na produção de anticorpos, na ativação dos linfócitos e monócitos e na atividade das células NK (PARDO; REIS, 2008).

Há evidências de que a suplementação com zinco reduz o impacto de muitas doenças, pois promove melhora do sistema imune (MAFRA; COZZOLINO, 2004). Participa na divisão celular, expressão genética, processos fisiológicos como crescimento e desenvolvimento, na transcrição genética (MAFRA; COZZOLINO, 2004; HADDAD; ALVES, 2006; EMBRAPA GADO DE CORTE, 2010). Na morte

celular, age como estabilizador de estruturas de membranas e componentes celulares (KOURY; DONANGELO, 2003; MAFRA; COZZOLINO, 2004), estabilizador da função imune e desenvolvimento cognitivo (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2010). O zinco também está presente no metabolismo de ácidos graxos, integridade das membranas das hemácias, metabolismo da proteína, regulação do apetite, integridade do epitélio e ossos, reprodução e crescimento, além de estar envolvido no crescimento fetal e manutenção da gravidez em condições normais (HADDAD; ALVES, 2006). Deste modo, todos os sistemas do organismo são afetados pela deficiência do mineral, particularmente quando as células estão em acelerado processo de divisão, crescimento ou síntese (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2010).

A deficiência de zinco ocorre quando os animais não ingerem quantidade suficiente desse mineral. Em ruminantes, dietas deficientes causam, em 24 a 36h, declínio imediato desse elemento no plasma, provocando a deficiência do mineral (PARDO; REIS, 2008). Essa deficiência é difícil de ser diagnosticado com base em determinações do elemento nos tecidos animal, pois não existem tecidos em que o mineral é estocado em quantidades apreciáveis (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2010).

O melhor método para prevenção e tratamento da deficiência de zinco nos animais é a suplementação mineral em cochos, com fornecimento da mistura mineral adicionada de zinco *ad libitum* (PARDO; REIS, 2008).

Estudos demonstraram que o consumo excessivo de suplementação de zinco em rações animais, em longo prazo, resultou em baixas concentrações séricas de HDL-colesterol, erosão gástrica e função imune deprimida (PERES; KOURY, 2006). Em bovinos, houve absorção de cobre; redução no ganho de peso, na ingestão de alimentos e na produção de leite; inibição de macrófagos, diminuição da fagocitose, prejuízo nos processos de cicatrização, constipação crônica, sonolência e paresia. Além de causar deficiência de cobre e ferro em razão do antagonismo com esses minerais (PARDO; REIS, 2008).

A absorção intestinal de zinco pode ser reduzida pelo excesso de cálcio na alimentação (TODO et al., 2010). Esse prejuízo na absorção do zinco parece estar relacionado a uma interação negativa entre cálcio e zinco mais pronunciada na presença de fitato (LOBO; TRAMONTE, 2004, PARDO; REIS, 2008).

O cálcio, em concentrações elevadas não produz toxicidade, pois é precipitado; porém interfere no metabolismo e absorção de outros minerais, podendo levar à

deficiência. Dentre esses minerais, se destacam o fósforo, zinco, manganês, magnésio, iodo, ferro (MINERALS, 1985).

3 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito da suplementação do probiótico com ou sem zinco (Zn), adicionado à mistura mineral, na produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados com uma única dose de vacina antirrábica.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, S. M. et al. Immunopathology of rabies infection in mice selected for high or low acute inflammatory reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 39-55, 2007.
- ALBAS, A. et al. Vacinação antirrábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 153-159, 2005.
- ALBAS, A. et al. 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, 2006.
- ARENAS, S. E. et al. Efeito do probiótico proenzime[®] no ganho de peso em bovinos. **Arch. Zootec.**, v.56, n. 213, p. 75-78, 2007.
- ARENAS, S. E. et al. . Probiotic increase the antirabies humoral immune response in bovine. **Arch. Zootec.**, v. 58, n. 224, p. 733-736, 2009.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Controle da Raiva dos herbívoros**. Brasília, 2005a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**, 6. ed. Brasília, 816 p., 2005b.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros. Raiva em herbívoros por espécie animal, 1987/2008**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 17 out. 2009.
- CHABEL, J. C. et al. Efeito de um complexo homeopático “*Homeobase Convert H[®]*” em ovinos sob condições de restrição alimentar. **J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 46, n. 5, p. 412-423, 2009.
- CONSALES, C. A.; BOLZAN, V. L. Rabies review: Immunopathology, clinical aspects and treatment. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 5-38, 2007.
- CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.
- DOSTA, M. C. M. et al. Revisión bibliográfica: bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. **Contactos**, 73, p. 63–72. 2009.
- EMBRAPA GADO DE CORTE. **Deficiências minerais e desempenho reprodutivo de ruminantes**. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/ct/ct23/04deficienciasmicroelementos.html>> Acesso em 02 jan. 2010

ERICKSON, L. K.; HUBBARD, E.N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 403-109, 2000.

ESPARZA, J. A.; FRAGOSO, R. L. S. ¿Qué sabe Ud. acerca de... los probióticos?. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, 41, p. 60-63, 2010.

FERREIRA, L. A. et al. Avaliação da vacinação anti-rábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 655-660, jul./set., 2009.

GIOMETTI, J. et al. . Influência da suplementação com cromo na resposta imune humoral antirrábica em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 421-427, 2006.

GUIAS práticas: probióticos e prebióticos [S.l.]: Organização Mundial de Gastroenterologia, 2008. 22 p.

HADDAD, C. M.; ALVES, F. V. Novos conceitos e tecnologias na suplementação mineral de bovinos. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 2006. p.1-9.

HANKINS, D. G., ROSEKRANS, J. A. Overview, prevention and treatment of rabies. **Mayo Clinic Proceedings**, v.79, n. 5, p. 671-676, 2004.

HOLANDA, L. B. et al. O conhecimento sobre probióticos entre estudantes de uma instituição de ensino superior. **Intellectus**, v. 4, n. 5, p. 225-239, 2008.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Ovinos e caprinos avançam em São Paulo**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=4136>>. Acesso em: 01 jan., 2010.

INSTITUTO PASTEUR. **Raiva dos herbívoros**. Disponível em:<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_03.htm>, acesso em 01 de abril de 2012.

KARKOW, F. J. A.; FAINTUCH, J.; KARKOW, A. G. M. Probióticos: perspectivas médicas. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 51, n. 1, p. 38-48, jan.-mar. 2007.

KOENEN, M. E. et al. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer-and-meat-type chickens. **Br. Poult. Sci.**, v. 45, p. 355-366, 2004.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, v.16, n. 4, p.433-441, 2003.

LOBO, A.; TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n.1, p. 107-113, jan./mar., 2004.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do Zinco na nutrição humana. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.17, n.1, p. 79-87, jan./mar., 2004.

MARIA, E. K. et al. Efeito com a suplementação com zinco na resposta immune humoral anti-rábica em bovinos. **Arch. Zootec.**, v. 58, Supl. 1, p. 605-608, 2009.

MARTINS, F. S. et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 5, n. 2, 2005. Disponível em: <http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/potencialprobiotico.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2010.

MATOS, B. C. Uso de aditivos na pecuária leiteira: revisão. **PUBVET**, v. 2, n. 9, 2008. Disponível em: http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=320. Acesso em 03 jan. 2010.

METCHNIKOFF, E. **Prolongation of life, Putnam and Sons**. New York, NY: [s.n.], 1907.

MILES, L. Are probiotics beneficial for health?. **Nutrition Bulletin**, v. 32, n. 5, p. 2-5, 2007.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

NG, S. C. et al. . Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 15, n. 2, p. 300-310, feb. 2009.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probiotics in allergic rhinitis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 1, p. 129-134, 2011.

MINERALS. In: NUTRIENT REQUIREMENTS OF SHEEP. 6.ed. Washington: National Academy Press, 1985. p. 11-22,

OMS. **Rabies**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>>. Acesso em: 30 dez. 2009.

OUWEHAND, A.C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

OYETAYO, V. O.; OYETAYO, F. L. Potencial of probiotics as biotherapeutic agents targenting the innate system. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 123-127, 2005.

PARDO, P. E; REIS, L. S. L. S. Nutrientes e nutracêuticos em grandes animais. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Rocha, 2008. Cap.9, p.808-814.

PERES, P. M.; KOURY, J. C. Zinco, Imunidade, nutrição e exercício. **Ceres: Nutrição e Saúde**; v. 1, n. 1, p. 9-18, 2006.

QUEIROZ, L. H. et al. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 9-14, jan-fev, 2009.

RASTEIRO V.S. et al. Adição de probiótico na mistura mineral eleva o ganho de peso de bovinos no período da seca. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v. 15, n. 3, p. 83-87, 2007.

REID, G. et al. Probiotics for clinical practice. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 4, p. 658-669, 2003.

REIS, L. S. L. S. et al. Efeito da suplementação com cobre na resposta imune humoral em ovinos. **Arch. Zootec.**, v. 56, n. 216, p. 947-950, 2007.

REIS, L. S. L. S. et al. Efficiency of *Matricaria chamomilla* CH12 and number of doses of rabies vaccine on the humoral immune response in cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 4, p. 433-435, 2008.

RIBAS, M. A. et al. Detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo con el empleo de la técnica de neutralización por reducción del número de placas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, n. 2, p. 91-95, 2003.

RODRIGUES, O. G. et al. Avaliação da influência de levamisole sobre padrões de proteínas e leucograma em caprinos (*Capra hircus*) nativos da região semi-árida nordestina. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.1, p. 50-58, 2005.

ROOS, T. B. Efeito de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* na resposta imune humoral de cordeiros vacinados contra *Escherichia coli* e Herpes Vírus Bovino-5. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RUBÍ, J. E. W. et al. Determinación de la extinción antigénica de la vacuna v-319 Acatlán vírus vivo atenuado en ovinos. **Téc. Pecu Méx**; v. 41, n. 2, p. 193-196, 2003.

SCHEFFER, K. C. et al. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n.3, p. 389-395, 2007.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 361S-364S, 2001.

SILVA, C. A. et al. Avaliação de probióticos (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho dos leitões. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 133-140, 2006.

SOUZA, F. S. et al. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Rev Paul Pediatr.**, v. 28, n. 1, p. 86-97, 2010.

STAUDT, N. P; PITHAN e SILVA, R. O. Perspectiva da Produção de Ovinos no Estado de São Paulo. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v.3, n.5, p. 1-4, 2008.

TODO, R. Z. et al. Efeito do probiótico com ou sem zinco e cálcio na concentração sérica de zinco em ovinos. **Colloquium Agrariae**, v. 6, n. 2, p. 57-61, 2010.

WRIGHT, A. et al. Molecular characterization of rabies virus isolates from Trinidad. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 95-102, 2002.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Suplementação nutricional na produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados contra raiva

Nutritional supplementation on production of sericos antibodies against the virus rabico in ovine vaccinated against rabies

Sandra Cristina Genaro*

Mestre em Ciência Animal pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Professora do curso de graduação em Nutrição da UNOESTE. E-mail: sandragenaro@gmail.com

Neusa Maria Frazatti-Gallina

Doutora em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (USP)
Chefe da Secção de Raiva do Instituto Butantan, São Paulo-SP.

Paulo Eduardo Pardo

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Professor do curso de graduação em Medicina Veterinária e mestrado em Ciência Animal, responsável pela Clínica Médica Veterinária da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Rogério Giuffrida

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Professor da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Endereço para correspondência:

Sandra Cristina Genaro

Rodovia Raposo Tavares, km 572. Bairro Limoeiro. CEP 19067-175. Presidente Prudente-SP.
Brasil. [Telefone: \(18\) 9601-0705](tel:(18)9601-0705)
[Email: sandragenaro@gmail.com](mailto:sandragenaro@gmail.com)

Suplementação nutricional na produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados contra raiva

Nutritional supplementation on production of sericos antibodies against the virus rábico in ovine vaccinated against rabies

RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito da suplementação do probiótico com ou sem zinco (Zn), adicionado à mistura mineral, na produção de anticorpos séricos contra o vírus rábico em ovinos vacinados com uma única dose de vacina. Quarenta e cinco ovinos machos, mestiços Santa Inês, com idade de 6 meses foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (15 ovinos/grupo): Grupo controle (GC) recebeu 10 gramas de suplemento mineral/animal/dia, grupo probiótico (GP) recebeu 10 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico/animal/dia e grupo Probiótico e Zinco (GPZn) recebeu 10 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico e 14,4 mg de sulfato de zinco/animal/dia adicionado ao probiótico. Os títulos individuais de anticorpos foram determinados por meio da técnica de soroneutralização baseado no *RapidFluorescent Focus Inhibition Test* (RFFIT) e no *FluorescentInhibitionMicrotest* (FIMT). Não houve diferenças estatísticas significativas entre as médias de concentrações séricas entre os grupos. Conclui-se que a administração de probióticos com ou sem zinco não melhora a resposta imune humoral antirrábica.

Palavras Chave: Anticorpos, raiva, ovinos.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of probiotics supplementation with or without Zinc (Zn), added to the mineral mixture, in humoral immune response in sheep vaccinated with a single dose of rabies vaccines. Forty-five malecrossbred rams Santa Inês, aged 6 months were randomly divided into 3 groups (15 animals / group): Control group (CG) received 10 grams of mineral / animal / day, the probiotics group (GP) received 10 grams of mineral added 4 grams of probiotics / animal / day and Probiotics and Zinc group (GPZn) received 10 grams of mineral added 4 grams of probiotics and 14.4 mg of zinc sulfate per animal per day added to the probiotics. The individual titles of neutralizing antibodies were determined using the technique of neutralization-based Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) and Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT). There were no statistically significant differences

between the mean serum concentrations between groups. It was concluded that the probiotics administration with or without zinc did not improve the immune humoral response of antibody rabies.

Key words: Antibody, rabies, sheep.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral aguda do sistema nervoso central dos mamíferos, onde no Brasil, o principal agente transmissor do vírus rábico para animais de fazenda, é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Scheffer *et al.*, 2007). Na América Latina, esta enfermidade vem causando um prejuízo da ordem de 30 milhões de dólares/ano e no Brasil, os prejuízos indiretos estão calculados em 22,5 milhões de dólares/ano (Instituto Pasteur, 2012b).

A vacinação é o melhor método de controle da raiva por ser efetiva e de baixo custo (Albas *et al.*, 2006) e para que haja um estado imunitário suficiente para proteger indivíduos expostos ao risco de infecção, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a avaliação da imunidade antirrábica pela titulação de anticorpos e considera um título igual ou maior que 0,5 UI/mL (WHO, 1992).

No Brasil, é comum 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 (Maria *et al.*, 2009). Sendo assim, é necessário buscar alternativas para aumentar a eficácia da vacinação contra o vírus da raiva (Ferreira *et al.*, 2009).

Na Europa, América do Norte e Ásia, antibióticos e quimioterápicos usados como promotores de crescimento deixaram de ser utilizados na produção de bovinos de corte e leite, em virtude da possibilidade de acúmulo de resíduos nos produtos de origem animal (carne, leite e derivados), bem como no meio ambiente (Graminha, 2007). Com as restrições impostas pela União Européia, os produtores europeus atualmente recorrem a um número limitado de promotores de crescimento e no Brasil, os produtos que foram utilizados no passado encontram-se atualmente proibidos como aditivos de rações (Menten, 2001).

Uma das estratégias para aumentar a resposta imunológica dos animais à imunidade induzida ou às infecções provocadas por vírus ou bactérias é o uso de adjuvantes, que tem revelado melhora na restauração da resposta imunitária e na potencialização de vacinas em relação a diversos agentes patógenos (Rodrigues *et al.*, 2005) como probióticos (Arenas *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2009) e/ou zinco (Maria *et al.*, 2009) ao suplemento mineral utilizado.

Probióticos são suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos, que se administrados em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (animais e seres humanos)(Holanda *et al.*, 2008). A eficácia de utilização dos probióticos depende da quantidade e características das cepas de microrganismos utilizados na elaboração do produto a ser utilizado como aditivo alimentar (Holanda *et al.*, 2008). A vantagem da utilização de probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes (Martins *et al.*, 2005). Para os animais de produção, os probióticos não causam efeitos tóxicos e não permanecem como resíduo nos subprodutos destinados ao consumo humano, em quantidades significativas (Pardo e Reis, 2008). Dentre os efeitos benéficos dos probióticos, estão sua utilização como promotores de crescimento aumentando o ganho de peso, a redução do pH intraluminal do tubo digestivo, minimizando o estresse, impedindo a colonização da mucosa intestinal por bactérias patogênicas e aumentando a resposta imune humoral. Observou-se também um aumento significativo nos títulos de anticorpos antirrábico em bovinos primovacinaados contra a raiva, (Arenas *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2009).

O zinco está envolvido em várias funções no organismo animal (Haddad e Alves, 2006), sendo vital para sua sobrevivência (Peres e Koury, 2006; Maria *et al.*, 2009). É indispensável para a integridade do sistema imunológico (Haddad e Alves, 2006; Peres e Koury, 2006; Maria *et al.*, 2009), tornando os animais mais resistentes às doenças infecciosas (Peres e Koury, 2006; Maria *et al.*, 2009). A deficiência de zinco ocorre quando os animais não ingerem quantidade suficiente desse mineral. Em ruminantes, dietas deficientes causam, em 24 a 36h, declínio imediato desse elemento no plasma, provocando a deficiência do mineral (Pardo e Reis, 2008). A absorção intestinal de zinco pode ser reduzida pelo excesso de cálcio na alimentação (Todo, *et al.*, 2010). Esse prejuízo na absorção do zinco parece estar relacionado a uma interação negativa entre cálcio e zinco mais pronunciada na presença de fitato (Lobo e Tramonte, 2004, Pardo e Reis, 2008).

Dada a importância do probiótico e do zinco na alimentação dos animais, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação do probiótico, com ou sem zinco, sobre a resposta imune humoral em ovinos vacinados com uma única dose de vacina antirrábica.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa, sob protocolo 282/10, pela Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP e foi desenvolvido nos meses de

janeiro a fevereiro de 2009, com o período experimental de 60 dias, no município de Taciba, extremo oeste do estado de São Paulo, Brasil.

Foi analisada a concentração de anticorpos neutralizantes antirrâbicos em 45 ovinos, machos mestiços Santa Inês, com idade de aproximadamente 6 meses e divididos aleatoriamente em 3 grupos (15 ovinos por grupo), os quais foram previamente identificados e vermifugados no dia zero do experimento após exame parasitológico de fezes (Gordon e Whitlock, 1939). De acordo com avaliação veterinária, os animais apresentavam-se saudáveis e sem deficiência de zinco. Também no dia zero colheram-se amostras das forrageiras dos pastos para avaliar a concentração de zinco no solo, nas pastagens e na água, onde a concentração de zinco das forragens dos piquetes foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite. Ainda no dia zero, o soro dos animais foi analisado para verificar se haviam tido contato com o vírus rábico selvagem e vacinal. Utilizou-se a vacina antirrábica (Vencofarma, Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda, Londrina, PR, Brasil) contendo vírus rábico fixo inativado, absorvido pelo gel de hidróxido de alumínio, produzido em cultivo celular. A aplicação foi feita em todos os ovinos numa dose de 2 mL de vacina por via subcutânea.

As amostras de sangue dos ovinos foram colhidas nos dias 0, 30 e 60. Para isso, os ovinos foram levados no período da manhã para o curral, contidos em tronco de contenção tipo brete e 10 mL de sangue de cada animal foi colhido por meio de punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante. Os tubos foram transportados em caixa térmica com gelo para o Hospital Veterinário e após 2 horas centrifugados a 2500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. As amostras de soro retiradas com pipeta automática foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL e armazenadas por congelamento em freezer a -20°C para determinação do título de anticorpos neutralizantes antirrâbicos.

Os títulos individuais de anticorpos neutralizantes foram determinados no Laboratório de Raiva do Instituto Butantan por meio da técnica de soroneutralização em células BHK21 clone 13. Esse teste, baseado no *RapidFluorescent Focus Inhibition Test – RFFIT* (Teste de Inibição de Foco Fluorescente Rápido) (Smith *et al.*, 1998) e no *FluorescentInhibitionMicrotest – FIMT* (Zalanet *et al.* 1979).

Nos primeiros 30 dias, os animais foram mantidos para adaptação à pastagem, ao qual foram alimentados com capim Aruana em sistema de pastejo extensivo. Os piquetes utilizados pelos grupos de animais eram semelhantes na topografia e composição botânica, onde os animais foram colocados em sistema de rodízio e mantidos sem situação de estresse. Todos os piquetes possuíam pasto abundante e sombra. Foram feitos ajustes e

estabelecimento do consumo de probiótico adicionado ao sal mineral. A quantidade desse produto adicionado ao sal mineral foi calculada de maneira que cada animal ingerisse cerca de 4 g por dia, segundo Arenas *et al.* (2009).

O primeiro grupo, controle (GC) consumiu em média 10 gramas de suplemento mineral/animal/dia. O segundo grupo (GP), consumiu em média 10 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico/animal/dia e o terceiro grupo consumiu em média 10 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico, e 14,4 mg de sulfato de zinco/animal/dia adicionado ao probiótico (GPZn).

A determinação do consumo do probiótico/animal feita no primeiro mês do experimento foi da seguinte maneira: o sal mineral suplementado com o probiótico foi pesado e colocado no cocho e após 24 horas, retirado e pesado novamente. A diferença entre a primeira pesagem e a segunda, dividida pelo número de animais que utilizaram o cocho foi considerada como consumo médio de sal/ovinos durante 24 horas.

O probiótico comercial utilizado (Biologic Plus[®], probiótico, Mart-Mix Produtos Veterinários, Martinópolis, SP, Brasil) foi devidamente registrado e aprovado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA), composto por 2.220.000.000 UFC/kg de *Lactobacillus*, 2.220.000.000 UFC/kg de *BacillusEstreptococcusfaecium*, 2.220.000.000 UFC/kg de *Bifidobacteriumthermophilum*, 35.000 g de cálcio, 25.000 g de enxofre, 20.000 mg de cobalto, 10.000 mg de iodo e 930.000 g de veículo.

O suplemento mineral utilizado (Fort Sal[®] da linha ovinos, produzido por Fort Sal Nutrição Animal, Santo Anastácio, SP, Brasil), contendo para cada Kg de mistura: 140 g de cálcio, 65 g de fósforo, 12 g de enxofre, 100 g de sódio, 11 g de magnésio, 1.100 mg de manganês, 2000 mg de ferro, 135 mg de cobalto, 195 mg de iodo, 30 mg de selênio, 20 mg de níquel e 6000 mg/g⁻¹ de zinco.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente empregou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados, pelo qual todas as variáveis analisadas foram consideradas como não paramétricas ($p < 0,05$). A seguir, os títulos sorológicos observados para os grupos ZnP, P e C, aos 30 e 60 dias pós-vacinação, foram transformados em escores-Z para determinar a existência de valores atípicos influentes (*outliers*). Foram classificados como *outliers*, as observações com valor de $Z > 2,5$ (Hair Junior, 2005). Para complementar a análise de observações influentes recorreu-se a avaliação gráfica da assimetria dos dados por meio da construção de gráficos do tipo *Box-*

plot. Em razão da existência de múltiplas observações influentes e da falta de normalidade dos dados, optou-se pelo uso de testes não paramétricos para comparações estatísticas. Os títulos sorológicos observadas para os três grupos aos 30 e aos 60 dias foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Dunn. Os títulos sorológicos dentro de cada grupo, aos 30 e 60 dias pós-vacinação foram comparados pelo teste de Wilcoxon para amostras relacionadas (Pagano e Gauvreau, 2004).

Para a partição do Qui-quadrado das tabelas de contingência 2x3 utilizou-se a fórmula proposta por Kimball (1954), que corresponde ao método de partição desenvolvido por Lancaster e Irwin (1949). Na partição do Qui-quadrado o nível de significância de 5% foi ajustado, devido às múltiplas comparações, sendo que para as tabelas 2x3 adotou-se o nível de 2,5% ($p < 0,025$).

Dentro de cada grupo, a proporção de animais imunizados contra raiva foi comparada pelo teste Q de Cochran. Todas as análises foram realizadas com auxílio do pacote computacional Bioestat v. 1.0 (Ayres *et al.* 2007) adotando-se como nível de significância o valor de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No dia zero, os soros dos animais não apresentaram anticorpos neutralizantes para a raiva, demonstrando que os ovinos não tiveram contato com o vírus rábico selvagem ou vacinal.

De acordo com a análise das concentrações de zinco feitas nas forrageiras dos pastos e na água, foram encontradas 14,3 mg/g⁻¹ de Zn e 5,43 mg/g⁻¹ de Zn, respectivamente.

A figura 1 compara os títulos soroneutralizantes pós vacinação, direcionados contra o vírus rábico vacinal cepa vírus Pasteur para os grupos de animais tratados com zinco e probiótico aos 30 dias (ZnP30) e aos 60 dias (ZnP60), tratados apenas com probiótico aos 30 dias (P30) e 60 dias (P60) e controles aos 30 dias (C30) e 60 dias (C60). As linhas no interior dos boxes denotam o segundo quartil (50% dos dados – mediana), as linhas superiores, o terceiro quartil (75% dos dados) e as inferiores o primeiro quartil (25% dos dados). As linhas aplicadas indicam os limites dos valores extremos e os pontos externos a elas indicam os *outliers*.

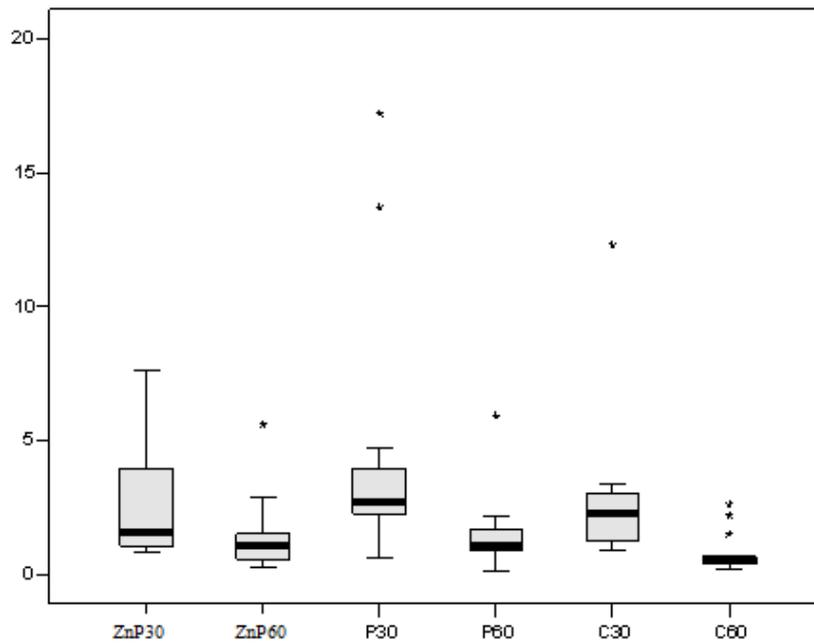


Fig. 1- Títulos soroneutralizantes (eixo y) pós vacinação contra o vírus rábico vacinal cepa vírus Pasteur para os grupos de animais (eixo x) tratados com zinco e probiótico aos 30 dias (ZnP30) e aos 60 dias (ZnP60), tratados apenas com probiótico aos 30 dias (P30) e 60 dias (P60) e controles aos 30 dias (C30) e 60 dias (C60).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais aos 30 dias e aos 60 dias pós vacinação antirrábica (tabela 1), porém os títulos soroneutralizantes mensurados aos 30 e 60 dias pós vacinação foram diferentes dentro do grupo Zinco + Probiótico ($p=0,0001$), grupo controle ($p<0,0001$) e grupo probiótico ($p=0,0001$). As proporções de animais considerados imunes aos 30 e 60 dias (títulos $\geq 0,5$ UI) não foram significativamente iguais dentro de cada grupo.

Tabela 1- Médias e desvios padrão dos títulos de anticorpos soroneutralizantes em UI/mL contra vírus rábico cepa vírus Pasteur mensurados aos 30 e 60 dias pós-vacinação, Presidente Prudente, 2010.

Grupo	30 dias*	60 dias**
Controle (GC)	3,363 \pm 3,336	0,770 \pm 0,733
Probiótico (GP)	4,313 \pm 4,689	1,460 \pm 1,353
Zinco + probiótico (GPZn)	2,607 \pm 2,011	1,363 \pm 1,368

*sem diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais ($p=0,3943$)

** sem diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais ($p=0,0555$)

Na primeira coluna (30 dias) observa-se que o GP apresenta concentração maior de títulos de anticorpos ($4,313 \pm 4,689$), seguido pelo GC ($3,363 \pm 3,336$) e GZnP ($2,607 \pm 2,011$), respectivamente. Essa elevação dos títulos de anticorpos pelo GP pode ser justificada pelo efeito do estímulo ao sistema imunológico (Esparzae Fragoso, 2010; Nogueirae Gonçalves, 2011), atribuídos às bactérias ácido lácticas (Cross, 2002; Pardoe Reis, 2008), presentes neste estudo (*Lactobacillus e Bifidobacterium*). As bactérias em questão potencializam as vacinas, com propriedades moduladoras da resposta imunológica, por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon (Ross, 2006).

O GZnP apresentou uma menor concentração de títulos de anticorpos comparados ao GP e GC. Este resultado pode indicar uma deficiência na biodisponibilidade do zinco, onde consumido juntamente com o cálcio, provoca deficiência de absorção desses minerais (NRS, 1985), concordando com estudos feitos por Maria et al (2009), que avaliaram o efeito da suplementação em diferentes concentrações de zinco adicionado à mistura mineral de bovinos e Todo *et al.* (2010) que estudaram o efeito do probiótico com ou sem zinco e cálcio na concentração sérica de zinco em ovinos, não observaram influência da resposta imune humoral antirrábica.

Observando a tabela 2, na segunda coluna (60 dias) o GP continuou apresentando maior concentração de títulos de anticorpos ($1,460 \text{Ab} \pm 1,353$) comparado aos demais grupos, porém o GZnP ($1,363 \text{Ab} \pm 1,368$) apresentou uma concentração maior de títulos de anticorpos comparado ao GC ($0,770 \text{Ab} \pm 0,733$), contrário à coluna anterior (30 dias), possivelmente por causa da perda da eficiência do GC que não possuía suplemento nutricional ligado ao estímulo do sistema imunológico. O GZnP teve uma menor redução ($1,244 \pm 0,643$) dos títulos de anticorpos comparados com GP ($2,853 \pm 3,336$) entre 30 e 60 dias demonstrando ser mais eficiente do que o GP.

Tabela 2- Diferença entre as médias e desvios padrão dos títulos de anticorpos soroneutralizantes em UI/mL contra vírus rábico cepa vírus Pasteur mensurados aos 30 e 60 dias pós-vacinação, Presidente Prudente, 2010.

Grupo	30 dias*	60 dias**	Diferença entre as médias
Controle (GC)	3,363 ± 3,336	0,770 ± 0,733	2,593 ± 2,603
Probiótico (GP)	4,313 ± 4,689	1,460 ± 1,353	2,853 ± 3,336
Zinco + probiótico (GPZn)	2,607 ± 2,011	1,363 ± 1,368	1,244 ± 0,643

*sem diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais ($p=0,3943$)

** sem diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais ($p=0,0555$)

Houve uma redução das médias (e desvios padrão) dos títulos de anticorpos soroneutralizantes contra o vírus rábico cepa vírus Pasteur, entre os dias 30 e os 60 dias, em todos os grupos estudados, porém, no grupo probiótico, esta redução foi mais acentuada ($2,853 \pm 3,336$) do que nos grupos controle ($2,593 \pm 2,603$) e Probiótico + Zinco ($1,244 \pm 0,643$). Este resultado pode ser explicado porque para este estudo ser realizado, foi utilizado como referência um trabalho feito por Arenas *et al.* (2009) que avaliou o efeito do probiótico Proenzime[®] em bovinos primovacinados. A diferença entre os animais de cada estudo (peso, tamanho, quantidade ingerida de matéria seca), além do tipo de probiótico do estudo de Arenas *et al.* (2009) ser diferente do atual estudo (ambos de composição distintas) podem ter influenciado no resultado.

Assim, como foi feito em bovinos, um estudo deveria ser feito com ovinos a fim de analisar e determinar a quantidade e o tipo de probióticos a ser utilizado para aumentar a resposta imune humoral nesses animais primovacinados.

Na tabela 3 observa-se uma redução nos títulos de anticorpos dos 30 dias aos 60 dias do experimento. Esses resultados não dispensam a necessidade da aplicação da dose de reforço em ovinos primovacinados, após 30 dias. Após esse período a vacinação deverá ser obrigatória a cada 6 meses, com vacina inativada, conforme preconizado pelo Programa de controle da Raiva em Herbívoros do Instituto Pasteur (Ferreira *et al.*, 2009; Instituto Pasteur, 2012a).

Tabela 3- Proporções de animais com títulos soroneutralizantes considerados protetores ($>0,5\text{UI/mL}$) mensurados aos 30 e 60 dias pós vacinação em três grupos submetidos a diferentes tratamentos, Presidente Prudente, 2010.

Grupos	30 dias		60 dias	
	$>0,5\text{UI/mL}$	$<0,5\text{UI/mL}$	$>0,5\text{UI/mL}$	$<0,5\text{UI/mL}$
Controle (GC)	15 (100%)	0 (0%)	8 (53,3%)	7 (46,7%)
Probiótico (GP)	15 (100%)	0 (0%)	13 (86,6%)	2 (13,4%)
Zinco + probiótico (GPZn)	15 (100%)	0 (0%)	13 (86,6%)	2 (13,4%)

Na primeira coluna (30 dias), os animais dos grupos em estudo obtiveram total proteção contra raiva (100%), com títulos soroneutralizantes $>0,5\text{UI/mL}$. Na coluna seguinte (60 dias), o GP e GPZn apresentaram valores iguais na redução de animais protegidos (13,4%), porém o GC reduziu em 46,7% na proteção de animais protegidos contra o vírus rábico, possivelmente porque o GC não possuía nenhum suplemento nutricional ligado ao estímulo do sistema imunológico. Não houve diferenças significativas na influência do uso do probiótico com ou sem zinco para o aumento na resposta imune humoral dos ovinos primovacinaados, como no trabalho de Ferreira *et al.* (2009) feito em bovinos; porém, notou-se uma eficiência na suplementação com esses suplementos nutricionais, já que no dia 60 do experimento observou-se somente 2 animais não protegidos contra o vírus rábico nos grupos Zinco + Probióticos e Probióticos, contra 7 animais não protegidos do grupo Controle.

CONCLUSÃO

Às condições em que o experimento foi desenvolvido e de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a vacina antirrábica utilizada foi eficiente em induzir a soroconversão e em manter os títulos de anticorpos antirrábicos em ovinos primovacinaados por até 30 dias após a vacinação e que as suplementações da mistura mineral com probiótico e probiótico + zinco não foram estatisticamente significantes capazes em melhorar a imunização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBAS, A.; FONTOLAN, O.L.; PARDO, P.E. et al. Interval between first dose and booster affected antibody production in cattle vaccinated against rabies. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis...*, v. 12, p. 476-86, 2006.

2. ARENAS, S.E.; REIS, L.S.L.S.; FRAZATTI-GALLINA, N.M. et al. Probiotic increase the antirabies humoral immune Response in bovine. *Arch. Zootec.*, v. 58, p. 733-6, 2009.
3. AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L. et al. *BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. OngMamiraua. Belém-PA, 2007.
4. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Controle da Raiva dos herbívoros. Raiva em herbívoros por espécie animal, 1987/2008*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 17 out. 2009.
5. CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 34, p. 245-53, 2002.
6. ESPARZA, J.A.; FRAGOSO, R.L.S. ¿Qué sabe Ud. acerca de los probióticos?. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, v. 41, p. 60-3, 2010.
7. FERREIRA, L.A.; PARDO, P.E.; FRAZATTI-GALLINA, N.M. et al. Avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos. *Semina Ciênc. Agrar.* v. 30, p. 655-60, 2009.
8. GRAMINHA, C.V., MARTINS, A.L.M., FAIA, C.A. et al. Viability of some additives used in confinement in Brazil. In: CONTAINMENT: TECHNICAL AND ECONOMIC MANAGEMENT, I, 2007, Jaboticabal. *Proceedings of event*. Jaboticabal: [1] 2007, p.103-132.
9. GORDON, H.M.; WHITLOCK, A.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. *Journal C. Scient. Indus. Res.*, v. 12, p. 50-2, 1939.
10. HADDAD, C.M.; ALVES, F.V. Novos conceitos e tecnologias na suplementação mineral de Bovinos. In: II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL. São Paulo. 2006.
11. HAIR JUNIOR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. et al. *Análise multivariada de dados*. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.
12. HOLANDA, L.B.; ANTUNES, A. E.; DEL SANTO, R. et al. Conhecimento sobre probióticos entre estudantes de uma instituição de ensino superior. *Rev. Acad. Dig. G. POLIS Edu.* v. 4, p. 225-39, 2008.
13. Instituto Pasteur. Ações em áreas epidêmicas. Imunização. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/manuais/manual_1/manual_14.htm>, acesso em 19 de fevereiro de 2012a.

14. Instituto Pasteur. Raiva dos Herbívoros. Disponível em:<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_03.htm>, acesso em 01 de abril de 2012b.
15. KIMBALL, A.W. Short-Cut Formulas for the Exact Partition of #2 in Contingency Tables. *Biometrics*. v. 10, p. 452-8, 1954.
16. LOBO, A.; TRAMONTE, V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. *Rev. Nutr., Campinas*, v. 17, p. 107-13, 2004..
17. MARIA, E. K.; PARDO, P. E.; FRAZATTI-GALLINA, N.M. et al. Efeito com a suplementação com zinco na resposta immune humoral antirrábica em bovinos. *Arch. Zootec.* v. 58, p. 605-8, 2009.
18. MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.R. et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. *Rev. Biol. Cienc. Terra*. v.5, 2005.
19. MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001.p.141-157.
20. NOGUEIRA, J.C.R.; GONÇALVES, M.C.R. Probiotics in allergic rhinitis. 2011. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, v. 77, p. 129-34, 2011.
21. PAGANO, M., GAUVREAU, K. *Princípios de bioestatística*. 2 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.
22. PARDO, P.E.; REIS, L.S.L.S. Nutrientes e nutracêuticos em grandes animais. In: ANDRADE, S.F. *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3. ed. Rocha, São Paulo. 2008.p.808-814.
23. PERES, P.M.; KOURY, J.C. Zinco, imunidade, Nutrição e Exercício. *Ceres*. v.1, p. 9-18, 2006.
24. RODRIGUES, O. G.; SOUSA, M. R. Q.; DUARTE, M. H. S. et al. Avaliação da influência de levamisole sobre padrões de proteínas e leucograma em caprinos (*Capra hircus*) nativos da região semi-árida nordestina. *Agropec. Cient. Sem-Árido*, v. 1, p. 50-8, 2005.
25. SCHEFFER, K.C.; CARRIERI, M.L.; ALBAS, A. et al. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saude Publica*. v. 41, p. 389-95, 2007.

26. SMITH, J.S.; YAGER, P.A.; BAER, G.M. *A rapid fluorescent focusinhibition test (RFFIT) for determining rabies virusneutralizing antibodies.* In: MESLIN F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWISKI, H. (Eds.). *Laboratorytechniques in rabies.* WHO: Geneva, 1998. p.181-192.
27. TODO, R.Z.; DONADELI, J.P.P.; SARAIVA, H.F.R.A.et al.Efeito do probiótico com ou sem zinco e cálcio na concentração sérica de zinco em ovinos.*Colloquium Agrariae.*,v.6 p. 57-61, 2010.
28. WHO. *Expert Committee on Rabies.*WHO:Technical Report Series 824. Geneva, 1992.
29. ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A microtest for the quantitative of rabies virus neutralizing antibodies.*J. Biol. Stand.* v.3, p.213-20,1979.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

- *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).
- *Figura.* Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

- Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.