

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA RESPOSTA IMUNE
HUMORAL ANTI-RÁBICA EM BOVINOS**

ELIANE KLIENCHEN DE MARIA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA RESPOSTA IMUNE
HUMORAL ANTI-RÁBICA EM BOVINOS**

ELIANE KLIENCHEN DE MARIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador: Prof.: Dr. Paulo Eduardo Pardo

636.085 27 De Maria, Eliane Klienchen
D278e Efeito da suplementação com Zinco na resposta imune
humoral anti-rábica em bovinos / Eliane Klienchen De Maria
Presidente Prudente, 2009.
27 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente
Prudente – SP, 2009.
Bibliografia.

1. Bovinos. 2. Zinco. 3. Raiva - Vacinação. 4.
Anticorpos anti-rábicos. I. Título.

ELIANE KLIENCHEN DE MARIA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL
ANTI-RÁBICA EM BOVINOS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 03 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo
Universidade do Oeste Paulista- Unoeste

Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho
Departamento de Clínica Médica de Ruminantes
Universidade Norte do Paraná - Unopar

Prof^a.Dr^a. Ana Julia Pereira Santinho Gomes
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste

*Dedico este trabalho aos meus pais, que
sempre me deram apoio e incentivo na
minha busca pelo saber.*

GRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Paulo Eduardo Pardo, um agradecimento especial, pela orientação para a realização deste trabalho, pelo apoio, confiança e pelos seus ensinamentos.

Aos amigos e familiares que compreenderam os momentos dedicados a este estudo e não em suas companhias.

Ao meu colega de mestrado Luis Souza Lima de Souza Reis, Médico Veterinário, um agradecimento especial pela amizade, apoio e confiança, sempre me auxiliando na realização deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, principalmente ao Prof. Dr. Izidoro Francisco Sarto, Prof. Dr. Sérgio do Nascimento Kronka, Prof. Dr. Vamilton Álvares Santarém, Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, Profa. Dra. Silvia Franco Andrade, Prof. Dra. Alessandra Melchert e a Profa. Dra. Ana Julia Pereira Santinho Gomes, que é do Curso de Farmácia, e ao Prof. Dr. Antonio Fluminense Junior que por meio de seus ensinamentos engrandeceram os meus conhecimentos científicos.

Ao laboratório de Raiva do Instituto Butantan, em especial, a Doutora Neuza Maria Frazatti Gallina e a Mestre Rosana de Lima Paoli pesquisadoras da Seção de Raiva do Instituto Butantan, São Paulo, pela amizade, incentivo e seus ensinamentos na determinação dos títulos de anticorpos anti-rábicos por meio da técnica de soroneutralização em células BHK21 clone 13.

À Professora Doutora Cecília Laposy Santarém, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista, pelas orientações para o transporte, centrifugação do sangue dos bovinos, obtenção e armazenamento do soro sanguíneo.

Ao Edson Neres da Rocha do Departamento de Audiovisual da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE pela montagem do datashow para as apresentações dos meus seminários, qualificação e defesa desta dissertação.

A Keid Ribeiro Kreüger, Anderson Martins Peres e a Joyce Galdino Gomes da secretaria de pós-graduação em Ciência Animal pelos seus atendimentos durante o curso.

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.
Deitar-me faz em pastos verdejantes; guia-me mansamente a águas tranqüilas.
Refrigera a minha alma; guia-me nas veredas da justiça por amor de seu nome.
Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque tu
estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.
Preparas uma mesa perante mim na presença de meus inimigos; unges com óleo a
minha cabeça, o meu cálice transborda.
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias de minha vida, e
habitarei na casa do senhor por longos dias.”

Salmo 23

“...Estudar sempre a renovação das idéias favorece a sábia renovação das células orgânicas...”

André Luiz (Chico Xavier)

RESUMO

Efeito da suplementação com zinco na resposta imune humoral anti-rábica em bovinos

O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação com zinco (Zn) por 60 dias na resposta humoral contra a raiva em bovinos. Quarenta e oito bezerros com aproximadamente 12 meses de idade foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (12 bezerros/grupo). Os grupos receberam suplementação diária com zinco 0,0 (G_c); 140(G₁₄₀); 294(G₂₉₄) e 420(G₄₂₀) mg/ animal. A concentração na forragem dos piquetes era deficiente (5,63 mg/kg de matéria seca). A suplementação com zinco não influenciou os títulos de anticorpos anti-rábicos em nenhum dos tratamentos (G_c, G₁₄₀, G₂₉₄, e G₄₂₀) e também no número de animais que apresentaram títulos de anticorpos anti-rábicos protetores ($\geq 0,5$ UI/mL). Conclui-se que a suplementação com zinco nas concentrações estudadas não apresentaram diferenças significativas nos títulos de anticorpos anti-rábicos dos animais e na porcentagem deles com títulos de anticorpos protetores para a raiva, durante o período estudado.

Palavras-chave: Bovinos. Raiva. Anticorpos anti-rábicos. Zinco.

ABSTRACT

Effect of zinc supplementation on humoral immune response to the rabies virus in bovines

This study evaluated the zinc (Zn) supplementation during 60 days on the humoral response against rabies in cattle. Forty eight calves aged about 12 months were randomly divided into 4 groups (12 calves / group). The groups received daily zinc supplementation at 0.0 (G_c); 140(G₁₄₀); 294(G₂₉₄) or 420(G₄₂₀) mg/ animal. The forage the paddocks were Zn deficient (5.63 mg Zn/Kg/ dry matter). The titers of rabies antibodies were not affected by Zn supplementation in none of the treatments (G_c, G₁₄₀, G₂₉₄ and G₄₂₀) and proportion of animals with protective titers of rabies antibodies (≥ 0.5 UI/mL). In conclusion, Zn supplementation at the studied concentrations did not affect the titers of rabies antibodies and proportion of cattle with protective titers of rabies antibodies.

Key-words: Cattle. Rabies. Antibodies. Zinc.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1 Raiva	11
1.2 Zinco	13
2 OBJETIVO	16
REFERÊNCIAS	17
ARTIGO CIENTÍFICO	23

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A raiva, causada por um vírus da família Rhabdoviridae e do gênero *Lyssavirus*, é uma enfermidade infecciosa que acomete o sistema nervoso central dos mamíferos (ALBAS et al., 2005). Esta doença é considerada uma das mais importantes zoonoses por ser uma encefalite fatal, acometer todos os mamíferos, apresentar distribuição mundial, e por não ter tratamento (DAHER et al., 2005). A raiva em herbívoros é responsável por enormes prejuízos econômicos, acarretando uma perda anual de 50 milhões de dólares em todo mundo (QUEIROZ DA SILVA et al., 2003).

A região de Presidente Prudente possui o maior rebanho bovino do Estado de São Paulo, com mais de 2.500.000 cabeças e injeta aproximadamente 400 milhões de reais na economia por ano. Tem ocorrido aumento de casos de raiva relacionado a morcegos hematófagos diagnosticados em Presidente Prudente e um aumento significativo da raiva em bovinos nas regiões vizinhas como Dracena e Araçatuba.

A vacinação periódica e contínua dos animais tem sido uma estratégia de controle da raiva mais efetiva e de menor custo (ALBAS et al., 2005). Infelizmente, vários trabalhos publicados no Brasil mostram que a primovacinação não confere imunidade a todos os animais, embora essas vacinas tenham sido liberadas, comercializadas e com seus valores antigênicos dentro dos parâmetros de normalidade segundo seus fabricantes.

O zinco é um elemento mineral essencial para os animais, pois faz parte da composição de várias metalo-enzimas, sendo vital para sua sobrevivência. Também, é essencial para a integridade do sistema imunológico, tornando os animais mais resistentes às doenças infecciosas (CARVALHO; BARBOSA; McDOWELL, 2003).

A suplementação com zinco e selênio promoveu melhor resposta humoral após vacinação contra vírus *influenza* e menor incidência de infecção do trato respiratório em humanos idosos (NOVAES et al., 2005).

1.1 Raiva

A raiva é transmitida pela saliva de um mamífero raivoso (HENDEKLI, 2005), sendo uma enfermidade viral que afeta o sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos e é considerada uma das mais importantes zoonoses por ser fatal. A raiva é causada por um vírus neurotrópico (LANGONI et al., 2007), que possui RNA de fita simples negativa (ALVES et al., 2003), pertence a família Rhabdoviridae, gênero Lyssavirus e apresenta sete genótipos (RUPPRECHT et al., 2001; INSTITUTO PASTEUR, 2002; UMEHARA et al., 2002; McGETTIGAN et al., 2003; NEL, 2003; PÁEZ et al., 2003; LIMA et al., 2005; SCHEFFER et al., 2007).

Apresenta 7 sorotipos : o “clássico”, com distribuição mundial; *Lagos bat*, *Mokola e Duvenhage*, encontrado na África; o *European bat lyssavirus 1 e 2*, encontrado na Europa e o *Australian bat*, encontrado na Austrália (ALBAS et al., 2005; CONSALES; BOLZAN, 2007; MOREIRA, 2007). Além destes, outros quatro novos foram propostos recentemente, representados pelos vírus Aravan (AV), Khujand, Irkut (KV), Irkut vírus (IV) e West Caucasiam (WCBV) (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

A partícula completa do vírus rábico tem a forma de uma bala de revólver (fuzil), mede 75 nm de diâmetro e 100 a 300 nm de comprimento (ALBAS et al., 2005; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007). Apresenta-se como um denso cilindro formado pelo genoma disposto em formato de mola e envolto em uma proteína denominada nucleoproteína (N); este conjunto forma um nucleocapsídeo helicoidal com o RNA e a proteína N fortemente unidos. O nucleocapsídeo é circundado por um envelope, o qual é derivado das membranas celulares. Neste envelope estão inseridas moléculas de uma glicoproteína trimérica, denominada “G” (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007), que é a principal responsável pela indução de anticorpos neutralizantes (ALMEIDA et al., 1997; PIZA et al., 2002; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007; MOREIRA, 2007).

A principal via de transmissão do vírus da raiva ocorre por via percutânea, através da mordedura por um animal infectado (ALBAS et al., 2005; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007). A morte é conseqüente ao comprometimento de centros nervosos vitais (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007). Willoughby et al. (2005) relataram

o primeiro caso conhecido de sobrevivência à raiva sem ser vacinada, uma adolescente americana de 15 anos.

A raiva bovina tem sido a maior preocupação nos países da América latina, especialmente nas regiões onde os morcegos hematófagos estão envolvidos, acarretando prejuízos econômicos devido à raiva (ALBAS et al., 1998; ALBAS et al., 2006), da ordem de 30 milhões de dólares por ano, provocando a morte de 100 mil cabeças, e estima-se que entre 30.000 a 40.000 bovinos são perdidos anualmente no Brasil, acometidos de raiva e com prejuízos diretos de 15 milhões de dólares e os indiretos, em 22,5 milhões de dólares (OLIVEIRA et al., 2000; INSTITUTO PASTEUR, 2002).

No Brasil, além dos problemas causados à saúde pública, a raiva traz sérios prejuízos econômicos à pecuária nacional (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007). O controle só é possível com a redução sistemática da população de morcegos, vacinação maciça dos animais (QUEIROZ DA SILVA et al., 2003; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007), atendimento ao foco e educação sanitária (OLIVEIRA et al., 2000; INSTITUTO PASTEUR, 2002; PIZA et al., 2002; NOGUEIRA, 2003).

Falhas na vacinação de raiva têm sido descritas anteriormente no Brasil (ALBAS et al., 1998; LIMA et al., 2005). Em alguns casos a falha ocorre somente em animais jovens, com menor número de vacinações e em outras, em animais recentemente vacinados que, provavelmente, estavam incubando a doença (LIMA et al., 2005).

Nos resultados apresentados por Almeida et al. (1997); Oliveira et al., (2000) e Albas et al., (2005), não houve resposta imune adequada após a primovacinação em alguns animais, com algumas vacinas usadas comercialmente.

Albas et al. (1998); Oliveira et al. (2000); Albas et al. (2004), recomendam uma dose de reforço da vacina anti-rábica para assegurar uma adequada proteção vacinal.

A resposta de anticorpos é sempre melhor em animais bem nutridos, independentemente da vacina utilizada (ALMEIDA et al., 1997).

1.2 Zinco

O zinco é indispensável para a integridade do sistema imune (McDOWELL, 1992; SHANKAR; PRASAD, 1998; RINK; KIRCHNER, 2000; CARVALHO; BARBOSA; McDOWELL, 2003; MAFRA; COZZOLINO, 2004; FABER et al., 2004; SENA; PEDROSA, 2005; MOCCHEGIANI et al., 2007; ANDRADE; PARDO; REIS, 2008), para resposta imune mediada por células, funciona como agente antioxidante e antiinflamatório (PRASAD, 2007) e possui um papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos (MACHADO et al., 2004).

Este mineral participa de muitas funções biológicas como a síntese de proteínas, crescimento e imunidade (ZEBA et al., 2008), secreção de hormônios, na proteção de membranas, efeito antioxidante, metabolismo de prostaglandinas e metabolismo de lipídeos (GOMES et al., 2008).

Fatores que dificultam a absorção do zinco pelos ruminantes: presença de fitatos (PRASAD, 2003; ANDRADE; PARDO; REIS, 2008; RUBIO et al., 2007), fitatos e cálcio (Ca) (LOBO; TRAMONTE, 2004; HAUSCHILD et al., 2008), cálcio (Ca) (SINGH, 2004; RUBIO et al., 2007), ferro (Fe) (LOBO; TRAMONTE, 2004), cádmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), argila, fibras (RUBIO et al., 2007).

A principal via de excreção do zinco é pelas fezes, com pequenas quantidades eliminadas pela urina (ANDRADE; PARDO; REIS, 2008).

Durante a reação imunológica, a concentração do zinco no sangue decresce drasticamente, provocando aumento na exigência deste mineral (RIBEIRO et al., 2008).

O zinco é um agente efetivo na diminuição da morbidez de doenças infecciosas em geral (AYDEMIR; BLANCHARD; COUSINS, 2006).

Para Moraes et al. (2002), o primeiro ano de vida do animal é a fase de alta multiplicação celular. Nessa fase, há uma maior necessidade de Zn para a manutenção do sistema imunológico do que na vida adulta. Na situação de desmama precoce, as reservas de zinco dos bezerras são praticamente inexistentes e dependem da ração e volumoso para atender às suas altas exigências.

A deficiência do zinco em humanos e animais superiores compromete a resposta mediada por células e anticorpos (FRAKER et al., 2000) que resulta num aumento de incidência de infecções (PRASAD, 2008; RINK; GABRIEL, 2000), susceptibilidade a infecções (YANAGISAWA, 2008), leva também a atrofia tímica (GOOD; LORENZ, 1992; LUNA; VILLANUEVA, 2001; SENA; PEDROSA, 2005; BRUNETTO et al., 2007), redução da produção de hormônios tímicos (timopoetina e timulina), e induz vários defeitos como redução de crescimento, paraqueratose (VORMANN; MICHALSKI, GÜNTHER, 1996), depressão da função imune e todos os tipos de células do sistema imune apresentam uma diminuição de suas funções (RUBIO et al., 2007; NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008).

Uma concentração baixa de zinco resulta em extensivo dano aos linfócitos T, alteração da síntese de linfócitos, resultando em marcada imunossupressão e implica também em alterações epidérmicas associadas à maior penetração de agentes infecciosos (BRUNETTO et al., 2007).

Strand et al. (2003) confirmaram que a depleção de zinco aumenta a severidade e fatalidade de infecções pneumocóccicas.

Na gestação, a deficiência de zinco pode ter efeitos prejudiciais permanentes na resposta imunológica. Observam-se danos no DNA que passam por duas gerações, não sendo possível revertê-los pela ingestão subsequente de concentração adequada de zinco (NICODEMO; SERENO; AMARAL, 2008).

Grande parte das áreas pastoris do mundo são deficientes em zinco, principalmente nas zonas tropicais e subtropicais com solos ácidos e lixiviados. A deficiência em bovinos criados a pasto é relativamente comum no Brasil, que possui, de forma geral, baixas concentrações de zinco nos solos, nas forragens e nos animais (CARVALHO; BARBOSA; McDOWELL, 2003).

O mais eficiente e econômico método de prevenção e tratamento da deficiência de zinco nos animais utilizados no Brasil e no mundo é a suplementação em cochos, com fornecimento da mistura mineral adicionada de zinco *ad libitum* (ANDRADE; PARDO; REIS, 2008).

Failla (2003) relatou que a suplementação com zinco pode aumentar a imunocompetência e diminuir a incidência e a severidade de algumas infecções em indivíduos com diagnóstico ou suspeita de deficiência de zinco.

2 OBJETIVO

O objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação com zinco na resposta imune humoral anti-rábica em bovinos após a primovacinação frente a quatro esquemas de adição de zinco no sal mineral para bovinos.

REFERÊNCIAS

- ALBAS, A. et al. Effect of booster-dose of rabies vaccine on the duration of virus neutralizing antibody titers in bovines. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 4, p. 367-371, 1998.
- ALBAS, A. et al. Resposta imune humoral em eqüinos e bovinos vacinados contra a raiva. In: 17ª Reunião Anual do Instituto Biológico - RAIB, 2004, São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico, v. 71. p. 506-508, 2004.
- ALBAS, A. et al. Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. **Arquivos 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 Diseases**. Botucatu, v. 12, n. 3, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S1678-9199200600000010>. Acesso em: 28 nov. 2007.
- ALMEIDA, M. F. et al. Resposta imune humoral de cães à vacina inativada de cérebro de camundongos lactentes utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 502-507, 1997.
- ALVES, L. M. et al. Pathogenesis of rabies vírus by ERA and PV strains administered orally in hamsters (*M. auratus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 79-84, 2003.
- ANDRADE, S. F.; PARDO, P. E.; REIS, L. S. L. S. **Nutriente e Nutracêuticos** In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 801-823.
- AYDEMIR, T. B.; BLANCHARD, R.; COUSINS, R. J. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 6, p. 1699-1704, 2006.
- BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae.**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.

BRUNETTO, M. A. et al. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 230-232, 2007.

CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; McDOWELL, L. R. **Nutrição de bovinos a pasto**. Belo Horizonte: Papel Form, 2003.

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.

DAHER, E. F. Renal involvement in human rabies: clinical manifestations and autopsy findings of nine cases from northeast of Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 47, n. 6, p. 315-320, 2005.

FABER, C. et al. Zinc in pharmacological doses suppresses allogenic reaction without affecting the antigenic response. **Bone Marrow Transplantation**, v. 33, n. 12, p. 1241-1246, 2004.

FAILLA, M. L. Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1443-1447, 2003.

FRAKER, P. J. et al. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 1399-1406, 2000.

GOMES, P. C. et al. Exigências nutricionais de zinco para frangos de corte machos e fêmeas na fase inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 1, p. 79-83, 2008.

GOOD, R. A.; LORENZ, E. Nutrition and immunity. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 361-366, 1992.

HAUSCHILD, L. et al. Relação do zinco e cobre plasmáticos com componentes nutricionais e desempenho de leitões: uma meta-análise. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 427-432, 2008.

HENDEKLI, C. M. Current therapies in rabies- brief review. **Archivos Virologia**, v. 150, p. 1047-1057, 2005.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. A raiva, 2002. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_05.htm>. Acesso em: 19 fev. 2008.

LANGONI, H. et al. Morcegos não-hematófagos na cadeia epidemiológica da raiva. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 43-46, 2007.

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 250-264, 2005.

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

LUNA, C.; VILLANUEVA, L. A. Significado fisiológico del zinco: uma aproximação perinatal. **Ginecologia y Obstetricia de México**, México, v. 69, n. 2, p. 77-81, Feb. 2001.

McDOWELL, L. R. Zinc. In: MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. 2. ed. Gainesville: Academic Press, 1992. p. 265-293.

MACHADO, P. R. L. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição Humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

McGETTIGAN, J. P. et al. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. **Journal of Virology**, v. 77, n. 1, p. 237-244, 2003.

MOCCHEGIANI, E. et al. Zinc-bound metallothioneins and immune plasticity in very old mice and humans. **Journal List – Immunity e Ageing**, v. 4, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=17903>>. Acesso em: 03 dez. 2007.

MORAES, S. S. et al. Dose única de zinco como fator moderador do estresse metabólico na desmama de bovinos de corte. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. (Comunicado Técnico, n. 71). Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/cot/COT71.html>>. Acesso em: 19 jul. 2008.

MOREIRA, W. C. **Avaliação da profilaxia contra o vírus da raiva pelas técnicas de contraimunoelctroforese e rápida inibição de focos fluorescentes.** 2007. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

NEL, L. H. *Lyssavirus* genotypes that occurred in África. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA. CENTENÁRIO DO INSTITUTO PASTEUR. 2003, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, 2003.

NICODEMO, M. L. F.; SERENO, J. R. B.; AMARAL, T. B. **Minerais na eficiência reprodutiva de bovinos.** São Carlos: EMBRAPA, 2008. (Documentos 80).

NOGUEIRA, V. Programa Estadual de controle da raiva dos herbívoros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA. CENTENÁRIO DO INSTITUTO PASTEUR. 2003, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, 2003.

NOVAES, M. R. C. G. et al. Suplementação de micronutrientes na senescência: implicação nos mecanismos imunológicos. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 367-376, 2005.

OLIVEIRA, A. N. et al. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 83-88, 2000.

PÁEZ, A. et al. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 795-802, 2003.

PIZA, A. T. et al. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein of the potency of rabies vaccination in cattle. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 265-268, 2002.

PRASAD, A. S. Zinc deficiency. **British Medical Journal**, v. 326, n. 7386, p. 409-410, 2003.

PRASAD, A. S. Zinc: mechanisms of host defense. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1345-1349, 2007.

PRASAD, A. S. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. **Molecular Medicine**, v. 14, p. 353-357, 2008.

QUEIROZ DA SILVA, L. H. et al. Pesquisa de anticorpos anti-rábicos em bovinos vacinados da região de Araçatuba, SP. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 407-413, 2003.

RIBEIRO, A. M. L. et al. 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, p. 636-644, 2008.

RINK, L.; GABRIEL, P. Zinc and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, p. 541-552, 2000.

RINK, L.; KIRCHNER, H. Zinc-altered Immune function and cytokine production. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 130, p. 1407s-1411s, 2000.

RUBIO, C. et al. Alimentos funcionales el zinc: oligoelemento esencial. **Nutrition Hospital**, v. 22, n. 1, p. 1001-1007, 2007.

RUPPRECHT, C. E. et al. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 8, p. 582-586, 2001.

SCHEFFER K. C. et al. Rabies virus in naturally infected bats in the state of São Paulo, southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 389-395, 2007.

SENA, K. C.; PEDROSA, L. F. C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 251-259, 2005.

SHANKAR, H. P.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection 1-3. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 447-473, 1998.

SINGH, M. Role of micronutrients for physical growth and mental development. **Journal Pediatric**, v. 71, p. 59-62, 2004.

STRAND, T. A. et al. Effects of zinc deficiency and pneumococcal surface protein A immunization on zinc status and the risk of severe infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2009-2013, 2003.

UMEHARA, O. et al. Rabies virus neutralizing antibody profile in cattle vaccinated with inactivated vaccine adjuvanted with either aluminum hydroxide alone or combined with avridine. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 69, n. 1, p. 23-28, 2002.

VORMANN, J.; MICHALSKI, L.; GÜNTHER, T. Cellular and humoral immunity in rats after gestational zinc or magnesium deficiency. **Journal of Nutrition Biochemical**, v. 7, p. 327-332, 1996.

WILLOUGHBY, R. E. et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 2508-2514, 2005.

YANAGISAWA, H. Zinc deficiency and clinical practice – validity of zinc preparations. **Yakugaku Zasshi**, v. 128, n. 3, p. 333-339, 2008. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/128/3/333/_pdf>. Acesso em: 19 jul. 2008.

ZEBA, A. N. et al. Major reduction of malaria morbidity with combined vitamin A --and zinc supplementation in young children in BurkinaFaso: a randomized double blind trial. **Nutrition Journal**, v. 7, p. 7. 2008. Disponível em: <<http://www.nutritionj.com/content/7/1/7>>. Acesso em: 19 jul. 2008.

ARTIGO CIENTÍFICO ***SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NÃO INFLUENCIA A RESPOSTA IMUNE HUMORAL ANTI-RÁBICA EM BOVINOS****ZINC SUPPLEMENTATION DOES NOT AFFECT HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO THE RABIES VIRUS IN BOVINES**

Maria, E.K.^{1*}, P.E. Pardo¹, N.M. Frazatti-Gallina², R.L. Paoli², R.M. Mourão-Fuches² and L.S.L.S. Reis³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

² Laboratório de Raiva, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade do Estado de São Paulo FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

* Autor correspondente: Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente, SP, Brasil, CEP 19067-175. E-mail: centraldepesquisaepublicacoes@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAL

Bovino, raiva, anticorpos anti-rábico, zinco

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito da suplementação com zinco (Zn) adicionado à mistura mineral em concentrações diferentes na resposta humoral anti-rábica em bovinos. 48 bezerros com aproximadamente 12 meses de idade foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (12 bezerros/grupo): sem zinco (Gc) e suplementados com 140(G₁₄₀), 294(G₂₉₄) e 420(G₄₂₀) mg de Zn/animal/dia. As suplementações com zinco (G₁₄₀, G₂₉₄ e G₄₂₀) não influenciaram os títulos de anticorpos anti-rábicos e os animais apresentaram título de anticorpos anti-rábicos considerados protetores ($\geq 0,5$ UI/ml) semelhantes. Conclui-se que a suplementação com zinco nas concentrações estudadas não alteraram os títulos de anticorpos anti-rábicos.

ADDITIONAL KEY WORDS

Cattle, rabies, rabies antibodies, zinc

SUMMARY

This study evaluated the effect of zinc (Zn) supplement added at different concentrations to mineral mixture on cattle humoral immune response after rabies vaccination. 48 calves of about 1

year old were randomly assigned to one of 4 groups (12 calves/group): without zinc supplement (Gc) and with zinc supplement at 140 (G₁₄₀), 294 (G₂₉₄) and 420 (G₄₂₀) mg Zn/animal. None of the concentrations of Zn supplement (G₁₄₀, G₂₉₄ and G₄₂₀) affected rabies antibody titers, and the animals reached similar protective rabies antibody titers (≥ 0.5 UI/ml). In conclusion, zinc supplement at the studied concentrations affects neither rabies antibody titers.

INTRODUÇÃO

A raiva, causada por um vírus da família Rhabdoviridae e do gênero *Lyssavirus*, é uma enfermidade infecciosa que acomete o sistema nervoso central dos mamíferos (Albas *et al.*, 2005). Esta doença é considerada uma das mais importantes zoonoses por ser uma encefalite fatal, acometer todos os mamíferos, apresentar distribuição mundial, e não ter tratamento (Daher *et al.*, 2005). A vacinação periódica e contínua dos animais tem sido a estratégia de controle da raiva mais efetiva e de menor custo (Albas *et al.*, 2005).

O zinco é um elemento mineral essencial para os animais, pois faz parte da composição de várias metalo-enzimas, sendo vital para a sobrevivência dos animais. Ainda, é essencial para a integridade do sistema imunológico, tornando os animais mais resistentes às doenças infecciosas (Carvalho *et al.*, 2003).

Dada a importância do zinco na alimentação dos bovinos, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com diferentes concentrações de zinco adicionado à mistura mineral na resposta imune humoral anti-rábica de bovinos primovacinados.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante os meses de fevereiro a junho no município de Presidente Prudente, SP, Brasil.

Foram utilizados 48 machos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com aproximadamente 12 meses de idade, alimentados com *Brachiaria brizantha* em sistema de pastejo rotacionado. As suplementações minerais foram administradas de forma *ad libitum* e o consumo médio durante o período de adaptação foi 70 g de mistura mineral/animal/dia. Estes bovinos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (12 animais/grupo): o grupo controle (Gc) recebeu mistura mineral sem zinco e os outros grupos denominados G₁₄₀, G₂₉₄ e G₄₂₀ receberam mistura mineral contendo 2.000, 4.200 e 6.000 mg de Zn/kg de suplemento (consumo de zinco diário de 140, 294 e 420 mg de mistura mineral, respectivamente) durante o período de observação experimental, que foi de 60 dias. A mistura mineral utilizada foi a Matsuda Fós[®]15S*.

Todos os bovinos receberam uma dose de 2 mL de uma vacina anti-rábica comercial aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) composta por suspensão de vírus rábico, cepa Pasteur Vírus (PV), replicado em células BHK, inativado pelo BEI e adsorvido pelo hidróxido de alumínio.

Os quatro piquetes utilizados pelos bovinos foram semelhantes na topografia, composição botânica e sem fertilização, sendo formados por *Brachiaria brizantha*. No dia zero colheram-se amostras das forrageiras dos pastos para posterior determinação da concentração de zinco nas

forrageiras. A concentração de zinco das forragens dos piquetes foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite.

Colheram-se as amostras de sangue dos bovinos nos dias zero, 30 e 60. Os 10 ml de sangue de cada animal foram colhidos por meio da punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. Então se obteve as amostras de soro que foram armazenadas em freezer a -20°C , para posterior determinação do título de anticorpos neutralizantes anti-rábicos.

Os títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos foram determinados por meio da técnica de soroneutralização em células BHK₂₁, teste esse, baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test - RFFIT (Smith *et al.* 1996) e no Fluorescent Inhibition Microtest - FIMT (Zalan *et al.* 1979) no laboratório da Seção de raiva do Instituto Butantan de São Paulo.

Para comparação dos tratamentos, foi usada a análise de variância não paramétrica de Friedman (χ^2_r) e aplicou-se o *pos hoc* (Nemenyi test) a fim de saber se alguma das suplementações com zinco provocou diferenças nos títulos de anticorpos anti-rábicos. Para as comparações da frequência de animais imunizados entre os tratamentos e dentro de cada tratamento aplicou-se o teste de Goodman. Em todas as análises considerou-se a probabilidade de erro $\alpha=0,05$ (Zar, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rotação de piquetes a cada 30 dias garantiu que os animais fossem submetidos às mesmas condições de pastejo durante o experimento, o que foi confirmado pelas análises bromatológicas das forrageiras, onde as forragens apresentaram (5,63 mg de Zn/kg de matéria seca) demonstrando a deficiência de zinco. Segundo o National Research Council (NRC,1996), a concentração de zinco que atende às necessidades nutricionais de bovinos de corte é de 30 mg de Zn/kg/MS.

Além disso, os soros de todos os animais utilizados no experimento, colhidos no dia zero, não apresentaram títulos de anticorpos anti-rábicos, indicando que estes animais não haviam tido contato com o vírus rábico anteriormente. Assim, as variações encontradas nas concentrações de anticorpos anti-rábicos nos soros desses animais durante o experimento, foram induzidas exclusivamente pela vacinação e pelas diferentes suplementações de zinco.

Foi observado que no dia 30 o título de anticorpos anti-rábicos dos bovinos do grupo G₁₄₀ foi 175,38% maior que o do grupo G_c. Também no dia 60 os grupos que os animais foram tratados com 140, 294 e 420 mg de zinco/animal/dia, os títulos de anticorpos foram respectivamente 250%, 215,8% e 184,2%, grupos G₁₄₀, G₂₉₄ e G₄₂₀, maiores que o grupo G_c. Mesmo assim não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos títulos de anticorpos entre os grupos experimentais (**Figura 1**).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que: as suplementações com zinco testadas não interferiram significativamente nos títulos de anticorpos anti-rábicos em bovinos.

Estes resultados corroboram com o experimento de Spears (2000), que também observou que a suplementação com zinco, não alterou a produção de anticorpos contra a Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR).

AGRADECIMENTOS

*A Matsuda Sementes e Nutrição Animal, Álvares Machado, SP, Brasil, pelo apoio e patrocínio desta pesquisa.

BIBLIOGRAFIA

- Albas A., P.E. Pardo, H. Bremer Neto, N.M.F. Gallina, R.M. Mourao Fuches e A. Sartori. 2005. Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. *Arq. Inst. Biol.*, 72(2): 153-159.
- Carvalho F.A.N., F.A. Barbosa and L.R. Mcdowell. 2003. Minerais, In: Carvalho F.A.N., Barbosa, F.A. & Mcdowell, L.R. (ed). *Nutrição de Bovinos a Pasto*. pp:157-368. PapelForm, Belo Horizonte.
- Daher, E.F., G.B. Silva Júnior, M.T. Ferreira, F.A.Z. Barros, T.M. Gurgel, R.M.S.V. Patrocínio. 2005. Renal involvement in human rabies: clinical manifestations and autopsy findings of nine cases from northeast of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, (47): 315-320.
- Giometti J., S.B. Chiacchio, A. Albas, P.E. Pardo, H. Bremer-Neto, A.I. Giometti and L.S.L.S. Reis. 2006. Influência da suplementação com crômio na resposta imune humoral anti-rábica em Bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, 73(4): 421-427.
- National Research Council. 1996. Minerals. In: National Research Council (ed.). *Nutrient requirements of beef cattle*. 7.ed. pp:54-74. National Academy Press, Washington.
- Smith J.S., Yager P.A. & Baer G.M. 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determing rabies virus-neutralizing antibody. In: Mestin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (ed.) *Laboratory techniques in rabies*. pp: 181-192. World Health Organization, Geneva.
- Spears, J.W. 2000. Micronutrients and immune function in cattle. *Proc. Nutr. Soc.*, 59: 587-594.
- Zalan E., C. Wilson and D.A. Pukitis. 1979. Microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.*, 7: 213-220.
- Zar J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall.

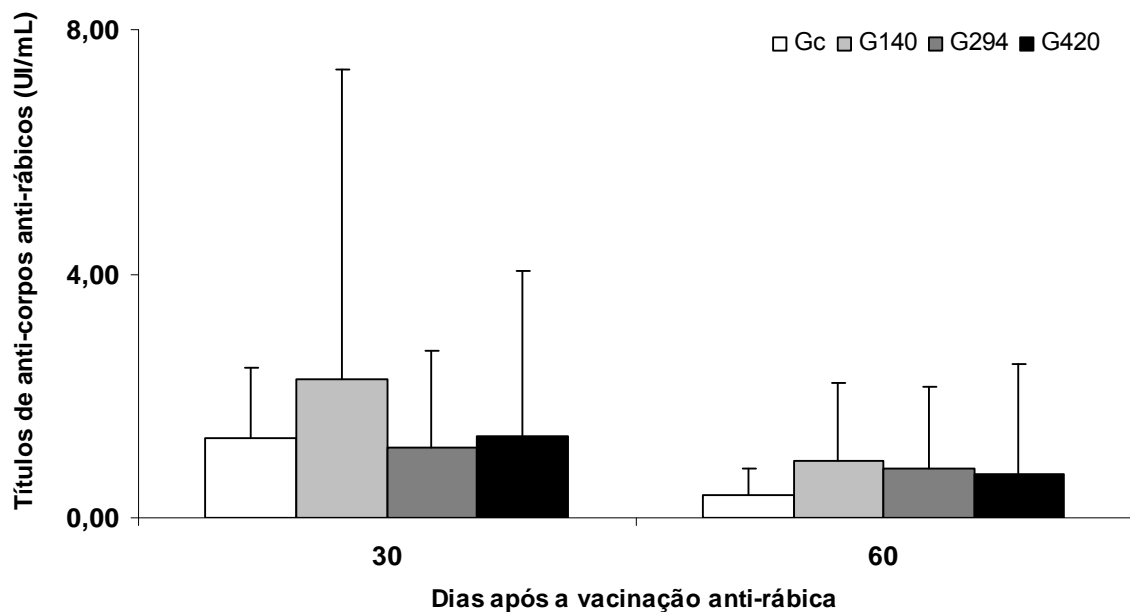


Figura 1- Média (+ dp) dos títulos de anticorpos anti-rábicos de bovinos Nelore primovacinados e sob suplementação alimentar de 0 (Gc), 140 (G₁₄₀), 294 (G₂₉₄) ou 420 (G₄₂₀) mg de Zn/animal/dia. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ou entre os dias num mesmo tratamento (teste de Friedman, $p > 0.05$). (Mean (+ sd) of titers of antirabies immunization in Nelore cattle vaccinated for the first time and fed supplemented food of 0 (Gc), 140 (G₁₄₀), 294 (G₂₉₄) and 420 (G₄₂₀) mg of Zn/animal/day. No significant difference was found both among treatments and over days in each treatment (Friedman's test, $p > 0.05$)).