

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**JULIANA MARIA DE ALMEIDA**

**AÇÃO DA VITAMINA E SOBRE O SISTEMA IMUNE DE AVES  
VACINADAS COM O VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA E  
SUA INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS**

**LAGES, SC  
2013**

**JULIANA MARIA DE ALMEIDA**

**AÇÃO DA VITAMINA E SOBRE O SISTEMA IMUNE DE AVES  
VACINADAS COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA E  
SUA INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. PhD Lenita Moura Stefani

Coorientador: Prof. Dr. Wagner Loyola

**LAGES, SC  
2013**

A447a Almeida, Juliana Maria de

Ação da vitamina e sobre o sistema imune de aves vacinadas com o vírus da bronquite infecciosa e sua influência nos parâmetros zootécnicos / Juliana Maria de Almeida. -2013.

72p. : il. ; 21 cm

Orientadora: Lenita Moura Stefani

Coorientador: Wagner Loyola

Bibliografia: p. 64-73

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

1.Imunidade. 2.Nutrição. 3.Vacina. 4.Citometria.  
5. Desempenho zootécnico.I. Almeida, Juliana Maria de. II. Stefani, Lenita Moura.III.Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.50896 - 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do  
CAV/ UDESC

**JULIANA MARIA DE ALMEIDA**

**AÇÃO DA VITAMINA E SOBRE O SISTEMA IMUNE DE AVES  
VACINADAS COM O VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA E  
SUA INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Banca Examinadora:**

Orientadora: \_\_\_\_\_  
Prof. PhD. Lenita Moura Stefani  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Coorientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wagner Loyola  
Pesquisador Embrapa- Suínos e Aves - CNPSA

Membro Externo: \_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Claudia Yurika Tamehiro  
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

**Lages, SC, 21 de junho de 2013.**

**Amor incondicional. À minha família, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado com a vida, e assim estar aqui hoje. Por estar ao meu lado sempre, me protegendo junto aos seus anjos e santos. Agradeço a Santa Catarina e Nossa Senhora das Graças que me guiou em cada obstáculo.

Aos meus Pais Luis Antônio e Ilda, aos meus irmãos Luis Rodrigo e Luis Murilo, à Ana Flávia e Felipe, e toda minha família que sempre me apoiaram, por ser minha inspiração, pelo amor e carinho, amo vocês.

À minha orientada Lenita, que mesmo sem me conhecer não hesitou em me receber. Obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho e pela amizade que nasceu nesta nossa caminhada.

Ao meu co-orientador e sempre professor Wagner, pela amizade que se firmou nestes dois anos. Pelo carinho e aprendizagem, muito obrigada.

À UENP por ter me dado toda oportunidade de uma boa formação profissional, serei eternamente grata. Agradeço também a professora Yuri, por sempre confiar em mim, pela amizade.

À UDESC, por ter me proporcionado a oportunidade de fazer um mestrado. Agradeço aqui também todos os professores desta instituição que contribuíram para minha formação.

À Embrapa - Suínos e Aves, por ter aberto as portas para mim e por financiar o projeto de mestrado. Agradeço também ao Wanderley da USP e Miriele da UEL que me ajudaram e permitiram a realização de uma parte do trabalho.

Aos meus queridos amigos, que tanto me ajudaram nesta caminhada. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida. Sempre me ajudando, nos momentos difíceis. Jamais me esquecerei de vocês.

Aos amigos de Lages: Luisa, Sheyla, Alais, Tiffany, Claudia, Patrícia, Rodrigo, Marcos, Camila, Fernanda, Ediane, Carina, Carla, Natália e Matheus.

Aos amigos da Embrapa – Gisele D., Gisele R., Franciele, Cíntia, Daiane, Thiago, Guilherme, Fabiane, Channaizsa, Tainá e Moniqueli. A toda equipe da Embrapa, à minha guardiã Tânia que tanto me ensinou e me aconselhou, aos técnicos e assistentes que contribuíram muito para que esse trabalho pudesse ser realizado, muito obrigada.

Aos pesquisadores desta unidade que me ajudaram sempre: Fátima, Iara, Paulo, Éverton, e todos outros que me acolheram.

Às amigas que fiz em Chapecó que me acolheram com amor em sua casa, muito obrigada Dete e Anaiara.

Agradeço também à nossa equipe de pesquisa, pelo companheirismo e amizade de vocês sempre.

Aos meus queridos amigos de sempre que me socorrem. Obrigada por fazerem parte desta jornada.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma nessa etapa da minha vida.

**“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha em conjunto é o começo de uma realidade”. Nada teria acontecido se eu não tivesse a presença de vocês ao meu lado sempre, muito obrigada de coração!**

## RESUMO

ALMEIDA, Juliana Maria de. **Ação da vitamina E sobre o sistema imune de aves vacinadas com o vírus da bronquite infecciosa e sua influência nos parâmetros zootécnicos.** 2013, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

Vitamina E é amplamente utilizada na avicultura por ter ações antioxidantes e imunomoduladoras. Entretanto, a dose ideal para ocorrer essa estimulação ainda é muito controversa. Foram conduzidos dois experimentos na Embrapa Suínos e Aves com a finalidade de avaliar diferentes doses de vitamina E e a sua influência na resposta imunológica inata e adquirida de aves vacinadas e desafiadas com Vírus da Bronquite Infecciosa das aves (VBI). No experimento I foram alojados em isoladores 50 pintinhos SPF com um dia de vida separadas em 10 grupos. Esses grupos receberam diferentes tratamentos com suplementação de vitamina E variando de 0 a 200 UI/Kg de ração. As aves foram vacinadas aos 14 dias de idade contra o VBI (cepa H120) e desafiadas com o VBI (cepa homóloga M41) 28 dias após a vacinação. Depois de cinco dias do desafio as aves foram sacrificadas e as amostras coletadas para diferentes testes: atividade microbicida de macrófagos abdominais, dosagem de óxido nítrico (NO), citometria de fluxo do pulmão, isolamento viral e histopatologia. Com estes testes pode-se observar uma maior atividade microbicida de aves dos grupos com maior suplementação de vitamina E (200 UI/Kg), quando comparado com os grupos que não receberam ou receberam quantidades menores (0, 15, 50 UI/Kg), indicando assim, uma melhora na resposta imune inata influenciada pela suplementação de vitamina E. Houve uma maior produção de NO em aves com maiores suplementação. E, através da citometria, observou-se que os macrófagos são as principais células recrutadas no tecido pulmonar no combate a Bronquite Infecciosa (BI) e esta ação foi potencializada pela adição da vitamina independente de dosagem. No experimento II foram utilizados 2400 pintinhos da linhagem Cobb alojados em aviários experimentais. As aves foram divididas em seis tratamentos (T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6) com 10 repetições por tratamento tendo diferentes níveis de suplementação de



vitamina E tratadas até 42 dias. Não houve diferença significativa nos parâmetros zootécnicos avaliados (peso corporal, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar) e no rendimento de carcaça inteira e em cortes, sugerindo que a suplementação da vitamina E não interfere no desempenho e no rendimento de carcaças de frangos de cortes e que, a quantidade de vitamina E presente nos alimentos basais da dieta seria o suficiente para suprir as necessidades fisiológicas das aves.

**Palavras-chave:** imunidade, nutrição, vacina, citometria, desempenho zootécnico.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Juliana Maria de. **Action of vitamin E on the immune system of birds vaccinated with infectious bronchitis virus and its influence on performance.** 2013, 73 pages. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

Vitamin E is widely used in poultry for having antioxidant and immunomodulatory actions. However, the optimal dose to occur this stimulation is controversial. Two experiments were carried out at Embrapa Suínos e Aves in order to evaluate different doses of vitamin E and its influence on innate and acquired immune response of birds vaccinated and challenged with Infectious Bronchitis Virus (VBI). In the first experiment, 50 SPF one-day-old chicks were housed in isolators in 10 separate groups. These groups received different treatments with vitamin E supplementation ranging from 0 to 200 IU/Kg of feed. The birds were vaccinated at 14 days of age against IBV (strain H120) and challenged with IBV (homologous strain M41) 28 days after vaccination. After five days of challenge, the birds were humanely euthanized and the samples collected for different tests: microbicidal activity of abdominal macrophages by measurement of nitric oxide (NO), flow cytometry of the lung, virus isolation, and histopathology. With these tests, it was observed a higher microbicidal activity on birds with higher levels of vitamin E (200 IU/Kg) when compared with the groups that did not receive or received less amounts (0, 15, 50 IU/Kg), thus indicating an improvement in the innate immune response influenced by supplementation of vitamin E. There was a higher NO production in birds with greater supplementation. And, by flow cytometry, it was observed that macrophages are the major inflammatory cell recruited in the lung tissue to fight VBI infection and this action was potentiated by the addition of vitamin E, independently of dosage. In the second experiment, 2400 Cobb chicks were housed in experimental poultry houses. The birds were divided into six treatments (T0, T1, T2, T3, T4, T5, and T6) with 10 replicates per treatment receiving different levels of vitamin E up to 42 days. There was no significant difference in the performance (body weight, weight gain,

feed intake and feed conversion) neither in the whole carcass and cuts, suggesting that supplementation of vitamin E does not affect the performance and yield of carcasses broiler and that the amount of vitamin E present in foods on basal diet could be enough to meet the physiological needs of the birds.

**Keywords:** immunity, nutrition, vaccine, cytometry, performance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> - Atividade microbicida dos macrófagos abdominais realizadas através do contato com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	39
<b>Quadro 2</b> - Dosagem NO em $\mu\text{M}$ de macrófagos abdominais provenientes da atividade microbicida.....	40
<b>Quadro 3</b> - Dosagem NO em $\mu\text{M}$ de macrófagos pulmonares.....	41
<b>Figura 1</b> – Histogramas da citometria de fluxo da população mononuclear (macrófagos e monócitos) do pulmão de aves do grupo controle negativo e grupos vacinados com diferentes dosagens de vitamina E.....	41
<b>Figura 2</b> – Histogramas da análise da citometria de fluxo da população mononuclear (macrófagos e monócitos) do pulmão de aves do grupo controle positivo e grupos com diferentes dosagens de vitamina E, vacinados e desafiados.....	39
<b>Figura 3</b> - Fotos de cortes histopatológicos de traquéias de aves dos grupos controles.....	41
<b>Figura 4</b> - Fotos de cortes histopatológicos de traquéias de aves dos grupossomente vacinados.....	46
<b>Figura 5</b> - Fotos de cortes histopatológicos de traquéias de aves dos grupos vacinados e desafiados.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Distribuição dos grupos por isoladores conforme os tratamentos.....	33
<b>Tabela 2</b> – Avaliação da eficiência vacinal em ovos embrionados .....	44
<b>Tabela 3</b> - Resumo dos níveis dietéticos de vitamina E (mg/Kg) de acordo com estágio de desenvolvimento das aves. ....	56
<b>Tabela 4</b> - Peso Corporal (PC), Consumo de Ração (CR), Ganho de Peso Corporal (GPC) e Conversão Alimentar (CA) (g) (Média ± Erro Padrão) de Frangos de Corte, Cobb, Machos do primeiro aos 21 e 42 dias de idade.....	58
<b>Tabela 5</b> - Rendimento de carcaça quente (RCQ), rendimento carcaça fria (RCF) e rendimento carcaça congelada (RCC) (%) (Média ± Erro Padrão) de frangos de corte aos 42 dias de idade.....	59
<b>Tabela 6</b> - Rendimento asas (RA), rendimento coxas (RC), rendimento sobrecoxas (RS), rendimento peito (RP), rendimento dorso (RD) e gordura abdominal (GA) (%) (Média ± Erro Padrão) de frangos de corte aos 42 dias de idade. ....	60

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

BI – Bronquite Infecciosa das Galinhas  
CAA - Células apresentadoras de antígenos  
CD4+ - Marcador de linfócito T CD4  
CD8+ - Marcador de linfócito T citotóxico CD8+  
CN – Controle negativo  
CP – Controle positivo  
CTL – Linfócito T citotóxico  
E – glicoproteína pequena de membrana  
ELISA – “Enzymed Linked Immunosorbent Assay”  
H120 – Holland 120  
HE – Hematoxilina-Eosina  
IFN $\gamma$  - Interferon gamma  
IL – Interleucina  
INF - Interferon  
IP – intraperitoneal  
KUL – marcador para células mononucleares utilizado na citometria de fluxo  
M – glicoproteína de membrana  
M41 – Massachusetts 41  
MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade  
N – proteína fosforilada de nucleocapsídeo  
NK – “Natural Killer”  
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal  
PBS – “Phosphate Buffered Saline”- Tampão fosfato-salino  
PCR – “Polimerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase  
rpm – rotação por minuto  
RPMI – meio de cultura celular composto por vários ingredientes  
S – “Spike” - Glicoproteína de Superfície  
SID – “Standard Industrial Dosage”- dose padrão da indústria  
SPF – “Specific Pathogen Free” – Livre de patógenos específicos  
Th – Linfócito T auxiliar “helper”  
TNF – Fator de Necrose Tumoral  
UBABEF - União Brasileira de Avicultura  
UFC – Unidade formadora de colônias  
UI – Unidade Internacional  
VBI – Vírus da Bronquite Infecciosa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1 BRONQUITE INFECCIOSA DAS AVES.....	19
2.1.1 Etiologia.....	19
2.1.2 Patogenia.....	20
2.1.3 Vacinação.....	21
2.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO DAS AVES.....	22
2.2.1 Introdução.....	22
2.2.2 Imunidade inata.....	22
2.2.3 Imunidade adquirida.....	24
2.3 VITAMINA E.....	26
2.3.1 Propriedades e interferência no desempenho zootécnico.....	26
2.3.2 Vitamina E e modulação do sistema imune.....	27
<b>3 ARTIGO I.....</b>	<b>29</b>
3.1 RESUMO.....	29
3.2 INTRODUÇÃO.....	31
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.3.1 Animais.....	32
3.3.2 Tratamentos.....	32
3.3.3 Vacinação.....	33
3.3.4 Desafio.....	33
3.3.5 ANÁLISES.....	34
3.3.5.1 Obtenção dos macrófagos abdominais.....	34
3.3.5.2 Avaliação da atividade microbicida dos macrófagos abdominais.....	34
3.3.5.3 Citometria de fluxo para análise dos macrófagos alveolares.....	35
3.3.5.4 Determinação do óxido nítrico (NO).....	36
3.3.5.5 Sinais clínicos e mortalidade.....	36
3.3.5.6 Isolamento viral.....	36
3.3.5.7 Exame histopatológico.....	36
3.3.5.8 Hematócrito.....	37

<b>3.3.5.9 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Nested-PCR para diagnóstico da anemia infecciosa das aves .....</b>	<b>37</b>
3.4 ESTATÍSTICA.....	38
3.5 RESULTADOS.....	38
<b>3.5.1 Avaliação da atividade microbicida dos macrófagos abdominais.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.2 Determinação óxido nítrico (NO).....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.3 Citometria de fluxo do pulmão.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.4 Sinais clínicos e mortalidade .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.5 Teste de isolamento viral em ovos embrionados.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.6 Exame histopatológico .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5.7 Hematócrito .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.8 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Nested PCR para diagnóstico de anemia infecciosa das aves.....</b>	<b>48</b>
3.6 DISCUSSÃO.....	48
3.7 CONCLUSÃO .....	51
<b>4 ARTIGO II .....</b>	<b>53</b>
4.1 RESUMO .....	53
4.2 INTRODUÇÃO .....	54
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
<b>4.3.1 Animais.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.2 Tratamentos.....</b>	<b>56</b>
<b>4.3.3 Vacina.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.4 ANÁLISES.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.4.1 Desempenho zootécnico .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.4.2 Rendimento de carcaças .....</b>	<b>57</b>
4.4 ESTATÍSTICA.....	57
4.5 RESULTADOS.....	58
<b>4.5.1 Desempenho zootécnico (peso corporal, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar).....</b>	<b>58</b>
<b>4.5.2 Rendimento de carcaças .....</b>	<b>59</b>
4.6 DISCUSSÃO.....	60
4.7 CONCLUSÃO .....	62



<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>63</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ARTIGOS.....	64
6.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira vem se destacando cada vez mais como importante atividade econômica. Atualmente, o país é o terceiro maior produtor e o maior exportador de carne de frango do mundo, comercializando este produto para mais de 150 países. Nesse mesmo setor, a produção de ovos também mostra seu avanço devido ao maior consumo do produto no mercado interno. Com isso, esta atividade é extremamente importante para a economia nacional, sendo necessário o conhecimento e o controle da ocorrência das diversas doenças que acometem as aves (MONTASSIER, 2008; UBABEF, 2011).

Esse crescimento da avicultura no Brasil se deve principalmente as melhorias na genética, no manejo sanitário e nutricional das aves. Para suprir a grande demanda do produto, esse setor adotou novas estratégias a fim de produzir frangos com alto potencial zootécnico em um menor tempo e isso acabou influenciando indiretamente na saúde animal. Desta forma, vários ingredientes vêm sendo empregados e estudados na alimentação das aves a fim de melhorar o sistema imunológico e desempenho animal (KIDD, 2004; KLASING, 1998). As vitaminas são micronutrientes necessários nos processos metabólicos e importantes no desenvolvimento das aves. A quantidade dessas vitaminas pode interferir no organismo das aves, sendo que a falta de alguma vitamina pode levar a distúrbios metabólicos afetando negativamente a produção, enquanto que o aumento de certas vitaminas pode melhorar significativamente a imunidade (FÉLIX; MAIORKA; SORBARA, 2009; KHAN et al., 2012).

A vitamina E é muito usada na alimentação por ser indicada como um potente antioxidante e modulador do sistema imune (MCDOWELL, 1989). Essa vitamina pode aumentar as linhas de defesas das aves contra diversos agentes invasores (CHEW, 1996). A par disso, estudos vêm sendo realizados com o propósito comum de avaliar o efeito imunomodulador e desempenho zootécnico de aves suplementadas com a vitamina E. Entretanto, ocorre alta divergência quanto às respostas analisadas visto que, diversos fatores podem interferir nos estudos com vitamina E como idade das aves, sexo, linhagens, características genéticas e critérios de mensuração. Esses fatores podem interferir no sistema imunológico alterando a resposta à infecção de determinada doença (KHAN et al., 2012).

Dentre os estudos, Konjufca et al. (2004) observaram maior atividade fagocitária dos macrófagos em frangos suplementados com

altas doses de vitamina E (110 a 220 mg/Kg). Outros trabalhos sugerem que o uso destas vitaminas junto a vacinas na forma de suplemento dietético ou juntamente à vacina, pode melhorar a resposta imunológica (FRANCHINI et al., 1991 e 1995).

Com o intuito de melhorar a resposta imunológica de doenças importantes na avicultura, Leshchinsky e Klasing (2001) encontraram que níveis moderados de vitamina E (25 UI/Kg) na dieta induziu melhor produção de anticorpos para bronquite infecciosa (BI) em aves vacinadas com vacina inativada, em comparação com os grupos que receberam níveis mais altos (100 a 200 UI/Kg). Esse mesmo estudo sugere que deve haver uma maior participação da resposta imune celular (não avaliada) atuando na resposta contra o vírus da bronquite infecciosa (VBI).

A BI é uma doença viral que acomete aves de ambos os sexos e das mais diferentes idades, tanto de postura como de produção de carne (DI FABIO; ROSSINI, 2000). Aves infectadas apresentam sinais respiratórios, renais, reprodutivos e entéricos afetando o seu desenvolvimento produtivo (CAVANAGH; NAQI, 1997). Segundo Montassier (2008) esta enfermidade destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, pois causa acentuada redução na capacidade produtiva das aves afetadas tendo como consequência perdas econômicas consideráveis para indústria avícola.

Estudos mostram que apesar da resposta imune humoral ter um papel importante contra a BI, outros fatores envolvidos na resposta imunológica das aves devem estar presentes, sugerindo, portanto, que a imunidade celular parece ser maior responsável pelo combate contra o VBI (COLISSON et al., 2000; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; MONTASSIER, 2010).

Contudo, o objetivo deste trabalho é analisar o efeito imunomodulador da vitamina E como também sua melhor dosagem em aves vacinadas e desafiadas com o VBI, analisando a resposta imune celular dessas aves. Tem como finalidade também, avaliar se há interferência no desempenho zootécnico, bem como no rendimento de carcaças e cortes de frangos de corte suplementados com diferentes níveis de vitamina E.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BRONQUITE INFECCIOSA DAS AVES

#### 2.1.1 Etiologia

Causada pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI), a BI acomete aves da espécie *Gallus gallus*. Foi também isolado em faisões, galinha d'angola e codornas (DI FÁBIO et al., 2000). A primeira descrição da doença foi em 1931, nos Estados Unidos. Atualmente a doença é endêmica praticamente em todos os países que criam aves. No Brasil, é considerada a principal doença respiratória avícola (ASSAYAG, 2009).

O VBI pertence ao gênero *Coronavírus*, família *Coronaviridae* e ordem *Nidovirales* (CAVANAGH; NAQI, 1997). O gênero é dividido em três grupos de acordo com suas características genéticas e antigênicas, sendo o VBI pertencente ao grupo três. (CAVANAGH et al., 1992; DI FÁBIO; ROSSINI, 2000). Trata-se de um vírus envelopado, RNA de fita única e pleomórfico, com diâmetro que varia entre 90 a 200 nm. O envelope possui externamente proteínas na forma de espículas que conferem ao vírus um aspecto de coroa, por isso o nome Coronavírus. Estruturalmente é constituído por três proteínas: nucleocapsídeo, glicoproteína de membrana e o peplômero (projeções superficiais) (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000). O VBI apresenta, ainda, quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como glicoproteína de espícula (S), glicoproteína integral da membrana (M), proteína pequena de membrana (E) e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 1981; SIDDEL et al., 1983; STERN; SEFTON, 1982). A glicoproteína S contém 1160 aminoácidos e é clivada em duas subunidades, S1 e S2, das quais a S2 é a mais conservada em sua sequência de aminoácidos. S1 é a principal proteína viral indutora de resposta imune mediada por anticorpos neutralizantes, tendo assim um importante papel na indução de proteção vacinal contra a doença. Porém, a S1 apresenta um alto grau de variabilidade que determina o sorotipo e qualquer diferença nessa composição ocasionará formação de novos sorotipos (CAVANAGH; NAQI, 1997).

A ocorrência de mutações nesse vírus se deve por vários fatores. Além de ser um vírus RNA e assim potente mutagênico, diferenças sutis na composição de nucleotídeos do gene correspondente à S1 podem dar origem a novos sorotipos. Somado à esse poder de mutação, há o uso de vacinas vivas o que pode contribuir para o

surgimento de novos sorotipos e subtipos do VBI variantes ou não da Massachusetts (CAVANAGH et al., 1992; DI FÁBIO; ROSSINI, 2000).

### **2.1.2 Patogenia**

O VBI é, provavelmente, o vírus que se dissemina mais rapidamente entre as aves, não necessitando de vetores para sua transmissão. A transmissão ocorre da ave afetada para ave susceptível por contato direto ou indireto (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000). Ocorre via aerossol através da inalação de partículas virais expelidas pelo trato respiratório de aves infectadas ou eliminadas pelas fezes (BACK, 2010; CAVANAGH; NAQI, 1997). É um vírus epiteliotrópico, afetando primariamente o trato respiratório das aves, sendo esse o principal sítio de replicação viral. Acomete os cílios e as células de secreção de muco, porém também causa lesões no trato reprodutivo, urinário e digestivo (CAVANAGH, 1997).

Segundo Di Fábio e Rossini (2000), a mortalidade dificilmente ocorre, e quando ocorre, deve-se à infecção nos primeiros dias de vida das aves em conjunto com infecção secundária ou, quando são acometidas por um vírus nefropatogênico. Em aves jovens os sinais são variáveis, tais como secreção na traquéia e brônquios, conjuntivite, coriza, tosse e estertores (ANDREATTI FILHO, 2006). Algumas amostras têm tropismo pelo tecido renal e intestinal podendo causar diarreia de moderada a severa, desidratação, urolitíase, nefrite e nefrose (CAVANAGH, 2007; DI FÁBIO; ROSSINI, 2000; VILLARREAL, 2007).

Nas aves de postura, os sinais respiratórios são discretos ou ausentes predominando alterações no sistema urinário e reprodutivo causando discreto aumento renal, urolitíase e até atrofia renal. Segundo Cavanagh; Naqi (1997) há uma queda de 10 a 50% na produção de ovos, além de alterações na qualidade da casca do ovo (fina, rugosa e porosa) ou no formato, bem como na qualidade da albumina. Alterações no sistema digestório são encontradas quando a infecção ocorre com estirpes enterotrópicas causando intensa diarreia, além do quadro respiratório (CAVANAGH; NAQI, 1997; DI FÁBIO; ROSSINI, 2000).

### 2.1.3 Vacinação

O controle da BI se faz principalmente através da vacinação, a qual deve ser associada à biosseguridade com propósito de prevenir a ocorrência das perdas. São utilizadas para esse manejo sanitário vacinas vivas atenuadas e vacinas inativadas (BERNARDINO, 2004). O esquema vacinal deve ser determinado com base na situação epidemiológica do plantel e de acordo com cada região. Estão disponíveis no Brasil, vacinas vivas liofilizadas do sorotipo Massachusetts (Mass) amostra H120. Estas são estirpes originadas na Holanda por isso o H na denominação, e os números representam a quantidade de passagens no sistema indicado de propagação (BERNARDINO, 2004; MONTASSIER, 2008). Além destas, estão disponíveis também vacinas inativadas (oleosas). As vacinas podem ser administradas via água, spray, óculo-nasal e intramuscular, sendo a spray e intramuscular, vias de eleição para vacinas vivas e inativadas, respectivamente (BACK, 2010).

A vacinação em frangos de corte é realizada, geralmente, com uma única vacina no incubatório no primeiro dia de vida do pintinho ou ainda um reforço no campo com duas semanas de idade, utilizando vacina atenuada viva via spray. Já poedeiras comerciais e reprodutoras recebem a vacina viva durante toda a fase de recria e depois vacina inativada (oleosa) para estimular a produção de anticorpos (BACK, 2010; BERNARDINO, 2004). Porém, mesmo com diferentes estratégias de vacinação, o VBI continua causando significativas perdas econômicas na produção avícola de corte e postura no Brasil e no mundo. Tais aparentes falhas de vacinação sugerem que os desafios de campo por diferentes sorotipos não estão sendo efetivamente controlados pelas vacinas com cepa Massachusetts, o único sorotipo vacinal disponível no Brasil, sendo que o real motivo causador das falhas vacinais ainda não está completamente esclarecido (CAVANAGH, 2007; TREVISOL; JAENISCH, 2010; VILLARREAL, 2007).

Devido aos surtos que vem ocorrendo em todo plantel avícola brasileiro, vários estudos estão sendo realizados com a vacina de BI disponível no mercado, com o propósito de pesquisar a capacidade protetora da vacina e os fatores que podem influenciá-la tanto negativamente como positivamente, ajudando a se obter uma melhor resposta protetora frente ao VBI.

## 2.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO DAS AVES

### 2.2.1 Introdução

O sistema imune das aves é caracterizado por uma grande diversidade na sua composição e funcionamento tendo como base a precocidade na formação e maturação dos órgãos linfóides envolvidos (CARON, 2008; MORGULIS, 2002). Contudo, esse sistema de proteção está dividido, assim como nos mamíferos, em imunidade inata e adaptativa que vão atuar dependendo da intensidade da agressão. A imunidade inata age imediatamente contra a invasão, de maneira inespecífica impedindo a entrada de organismos invasores e sua replicação. Entretanto, esse mecanismo primário de defesa pode não ser eficiente relevando-se, neste caso, a importância da imunidade adaptativa, que aumenta a intensidade dos mecanismos microbicidas desenvolvidos pelas células da resposta imune inata. A imunidade adaptativa atua de maneira mais lenta e possui mecanismos de defesa específicos tanto humorais como celulares responsáveis pelo combate do organismo invasor através da ação dos linfócitos e preparando o hospedeiro para um futuro contato com o mesmo agente (EFR, 2004; TIZARD, 1998). A resposta imune adaptativa pode ser dividida ainda em humoral e celular. A resposta imune celular ocorre principalmente pela ação dos linfócitos T envolvendo mecanismos tanto da imunidade inata como da adaptativa. Já a resposta imune humoral ocorre através da ação das imunoglobulinas produzidas por linfócitos B dependendo, basicamente, da imunidade adaptativa (POWEL, 1987).

Diversos órgãos fazem parte do sistema imunológico das aves. São chamados de órgãos linfóides primários: medula óssea, Bursa de Fabrícus, e timo. Já baço, placa de Peyer e glândula Harderiana são classificados como órgãos secundários, assim como os tecidos linfóides distribuídos pelo organismo, tais como o CALT (associado à conjuntiva), o BALT (associado aos brônquios) e o GALT (associado ao intestino). As células brancas (heterófilos, macrófagos, monócitos, linfócito T e linfócitos B) são produzidas na medula óssea e destinadas ao local de atuação (RITCHIE, 1995; SCOTT, 2004; SHARMA, 1998).

### 2.2.2 Imunidade inata

A imunidade inata é responsável pela primeira defesa do organismo contra um invasor. É constituída de barreiras físicas e

químicas (mucosas, cílios, secreções, enzimas, etc) e de componentes celulares (KREUTZ, 2007).

As principais células envolvidas na resposta inata das aves são os heterófilos e os macrófagos. Os heterófilos estão presentes na inflamação e na resposta imunológica e no processo de fagocitose, considerada a primeira linha de defesa celular, combatendo, principalmente, bactérias e fungos tendo menor função no caso de infecções virais (MORGULIS, 2002; RITCHIE, 1995) Os monócitos e os macrófagos também participam da primeira linha de defesa e possuem um papel extremamente importante tanto na resposta inata como adaptativa. São produzidos na medula óssea e vão para a corrente sanguínea. Assim que os monócitos caem na circulação, começa o processo de maturação e migração para os tecidos sendo chamados então de macrófagos. Essas células participam do processo de identificação e apresentação de antígenos e podem também destruir esses microrganismos invasores através da produção de citocinas imunoregulatórias ou metabólitos que servem como sinais de estímulo para o sistema imunológico agir contra o organismo invasor (ERF, 2004; QURESHI, 2003; RITCHIE, 1995). Os macrófagos fazem parte de um grupo chamado de células apresentadoras de antígenos (CAA). Este grupo tem como função identificar e apresentar os corpos estranhos às células T, que por sua vez potencializam a ação das células efetoras (macrófagos e heterófilos). Quando estimuladas por patógenos, as CAA produzem várias citocinas, tais como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) que vão estimular e regular a ação do próprio macrófago, além de estimular mais células para participar do combate (MORGULIS, 2002; SHARMA, 1998).

Outro importante mecanismo de defesa da imunidade inata é a ação dos interferons do tipo I (IFN) que é produzido pelas células do organismo para defendê-lo de agentes externos como vírus, bactérias e células de tumores. Os interferons atuam tanto na resposta inata como adquirida exercendo papéis importantes. Essas células são responsáveis por ativar outras células que participam da resposta imunológica como, as células NK (Natural Killer) e linfócitos T, além de estimular a atividade fagocítica dos macrófagos. Contudo, a ação dos interferons juntamente com as células NK tem a função de inibir a replicação viral e destruir as células infectadas, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN, 2005; KREUTZ, 2007)

Na BI das aves foi observado por Pei et al. (2001), que o interferon tipo I (IFN-I) reduziu a replicação do VBI em cultura de



células renais e traqueais de pintos, e a aplicação de IFN-I via oral ou intravenosa retarda o aparecimento da doença e também reduz sua severidade.

Entretanto, a eficiência da resposta inata pode não ser suficiente na defesa contra alguns organismos invasores que conseguem passar pelas primeiras barreiras. Nesse caso, torna-se importante a ação da resposta imune adaptativa que se direciona especificamente contra o invasor (ERF, 2004).

### **2.2.3 Imunidade adquirida**

A imunidade adquirida é uma resposta específica capaz de atuar contra grandes variedades de agentes agressores e reproduzir memória imunológica para um contato secundário com o mesmo agente (KREUTZ, 2007). As respostas imunológicas são mediadas por fatores denominados imunidade humoral e celular (ou imunidade mediada por células) os quais sofrem ação dos linfócitos B e T, respectivamente. Nas aves os linfócitos são produzidos na medula óssea e carreados para o timo ou para a Bursa de Fabrício onde sofrem maturação e se tornam funcionais. Os linfócitos que sofrem maturação na Bursa de Fabrício são chamados de linfócitos B e são responsáveis pela produção de anticorpos. Já os linfócitos que são maturados no timo são chamados de linfócitos T os quais ativam células para destruição de antígenos e controlam a resposta imunológica (RITCHIE, 1995; TIZARD, 1998).

Na imunidade humoral, os anticorpos produzidos previamente pelos linfócitos B, também chamados de imunoglobulinas, possuem uma ação específica contra o antígeno que o originou. As imunoglobulinas presentes nas aves são: IgM, IgY e IgA. A IgM é o primeiro anticorpo a aparecer após uma infecção, assim como a IgA, sendo que este último se encontra presente nas secreções e mucosas. A classe IgY é classificada nas aves como sendo IgG dos mamíferos e como tal, aparecem posteriormente e são mais específicas para reconhecimento pelo linfócito B e produção de anticorpos (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000; MONTASSIER, 2008; MORGULIS, 2002).

Além da estimulação da produção destes anticorpos outros mecanismos são desencadeados a fim de combater a invasão viral, como a ativação das células T que são importantes para estimular e modular a resposta imune celular. A ação dos linfócitos T, entretanto, é um pouco mais complexa e necessita de células especializadas que apresentem os antígenos. Estão envolvidos nesse processo de reconhecimento: as

células apresentadoras de antígenos, os receptores dos linfócitos e as moléculas do Complexo de Histocompatibilidade (MHC) e estes serão ativados dependendo do agente e do receptor dos linfócitos. As células T envolvidas são as células T citotóxicas (TCD8+) e as T auxiliares (TCD4+), ambas necessitam de uma apresentação por células especializadas de antígenos invasores (CAA), a partir daí, os linfócitos TCD8 + se unem ao MHC classe I e os TCD4+ ao MHC classe II, modulando a resposta imune celular. A união do linfócito TCD4+ e o MHC II ocorrem no caso de patógenos extracelulares como bactérias, enquanto que o linfócito TCD8 + MHC I em organismos intracelulares sendo mais importantes para os vírus, como o VBI (COLISSON et al., 2000; KREUTZ, 2007; TIZARD, 1998). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> desempenham um importante papel na regulação da resposta imune adaptativa contra infecções, por meio da produção de citocinas que ativam e desativam as células efectoras (macrófagos) e linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Os linfócitos T auxiliares podem ser divididos em subgrupos dependendo do tipo de citocina produzida. Os linfócitos com o fenótipo 1 (Th1) produzem as citocinas que estimulam a resposta celular, tais como Interleucina 2 (IL-2) e Interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Os linfócitos com o fenótipo 2 (Th2) produzem interleucinas 4, 5, 10 importantes na resposta humoral (ERF, 2004). O predomínio de células Th1 pode levar a produção de citocinas que ativam a atividade citotóxica de macrófagos, por meio da síntese de uma enzima chamada NO-sintase, e com conseqüente síntese de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), o que acarreta um aumento na resistência à infecção viral. Por outro lado, o predomínio do fenótipo Th2 leva a produção de citocinas que desativam tais atividades dos macrófagos, aumentando a suscetibilidade à BI.

O mecanismo de proteção da resposta imune induzido pela infecção ou vacinação com VBI é muito complexo e pouco esclarecido. A infecção ou vacinação com VBI induz, na maioria das vezes, a produção de anticorpos da classe IgM, IgY, e IgA, tanto na circulação sanguínea como nas mucosas do trato respiratório e urogenital (CARON, 2008, MONTASSIER, 2010). No entanto, níveis altos de IgA tem sido detectados nas secreções lacrimais e salivares de aves infectadas (CAVANAGH, 2007).

A imunidade humoral na infecção ou vacinação contra VBI tem sido estudada, entretanto, a imunidade celular envolve mecanismos tanto da imunidade inata como adaptativa e é tão ou mais importante que a resposta humoral na proteção contra o VBI. A infecção viral é capaz de induzir uma diversidade de mecanismos efetores responsáveis

pela rápida eliminação do vírus nos tecidos infectados. A resposta dos linfócitos T citotóxicos exerce um papel importante na eliminação do VBI (COLISSON et al., 2000; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; MONTASSIER, 2010). Estudo feito por Collisson (2000) mostrou que a resposta das células T citotóxicas frente ao VBI está relacionada com o início de diminuição dos sinais clínicos.

No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer o esquema de resposta imune exercido pelo hospedeiro frente ao VBI, analisando e comparando a resposta imune inata e adquirida e quais mecanismos estão envolvidos.

## 2.3 VITAMINA E

### 2.3.1 Propriedades e interferência no desempenho zootécnico

A vitamina E foi descoberta por um físico americano em 1922. Desde então, informações sobre seus componentes químicos e funções vem sendo relatada e nos últimos anos, com os novos métodos de análises, foi possível conhecer todo papel exercido por essa importante vitamina no organismo (SURAI, 2002).

A vitamina E compreende dois compostos: os tocoferóis e os tocotrienóis, dentre eles surgem uma variedade (alfa, beta, gama e delta) sendo que a forma alfa possui maior atividade biológica por apresentar melhor absorção, assim esta é a mais utilizada. Essa vitamina é encontrada na forma natural em óleos vegetais, ovos, fígado, legumes e plantas verdes e na forma sintética como acetato de D- $\alpha$ -tocoferol (MCDOWELL, 1989; RUTZ; LIMA, 1994).

A sua concentração pode variar nos ingredientes dependendo de vários fatores que vão desde a maneira como esse alimento foi plantado e adubado, das condições ambientais até da maneira como foi colhido. Por ser lipossolúvel, a absorção de vitamina E segue os mesmos princípios dos lipídios. Pode ser apresentar como alcoóis livres ou ésteres, sendo absorvida como álcool. A vitamina é absorvida pelo epitélio intestinal não tendo muita interferência no processo metabólico. O processo de absorção, portanto, está relacionado com a digestão de lipídeos tendo assim a ação da bile e da lipase pancreática no intestino (MCDOWELL, 1989; SURAI, 2002).

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel necessária para a ótima integridade e função do sistema reprodutivo, muscular, circulatório e imunológico (KLASING, 1998). É muito usada na alimentação por ser um potente antioxidante e modulador do sistema imune principalmente em dosagens maiores que a estipulada pela NRC (National Research Council, 1994). A vitamina E atua diretamente sobre as células ou de maneira indireta através de mecanismos metabólicos e endócrinos influenciando o sistema imune (KHAN et al., 2012).

Alguns trabalhos mostram o efeito desta vitamina nos índices zootécnicos das aves e na qualidade da carne, pois se tem observado que a vitamina E mostra-se efetiva na redução da oxidação lipídica na carne e seus produtos (JENSEN, LAURIDSEN; BERTELSEN, 1998). Um experimento feito por Frigg (1990), mostrou que aves recebendo suplementação de 200 mg/Kg de vitamina E na dieta obtiveram um aumento no ganho de peso bem como melhor conversão alimentar, em comparação com aves que receberam menores quantidade desta vitamina (25 mg/Kg).

Resultados divergentes foram encontrados por Toledo et al. (2006), que suplementando as aves com várias dosagens de vitamina E (10, 20 e 30 mg/Kg) não foi possível constatar diferença no desempenho dos frangos. Niu et al. (2009) não observaram diferença significativa de peso e consumo de ração em aves suplementadas com 0, 100 e 200 mg/Kg. Entretanto as aves apresentaram uma melhor conversão alimentar quando suplementadas com 100 mg/Kg de vitamina E.

### **2.3.2 Vitamina E e modulação do sistema imune**

A vitamina E é caracterizada como um dos principais agentes nutricionais imunostimulantes por ter a capacidade de aumentar as linhas de defesas das aves contra diversos agentes resultando na resistência as infecções por bactérias e vírus (CHEW, 1996). Entretanto para ocorrer essa estimulação do sistema imunológico são utilizadas doses maiores de suplementação. Assim diversos estudos vêm comprovando o efeito imunomodulador da vitamina E, porém há ainda certa divergência sobre a quantidade adequada de suplementação.

Segundo ERF et al. (1998), a suplementação de vitamina E em frangos de corte não alterou os linfócitos B e macrófagos mas resultou em um aumento na produção de células T quando comparada ao grupo controle. Resultados diferentes tiveram Gore e Qureshi (1997) quando inocularam vitamina E no ovo, pois observaram um aumento de

anticorpos e macrófagos que melhorou a qualidade de pintos e perus pós-eclosão. Konjufca et al. (2004) também relataram resultados semelhantes, estes observaram uma melhora na atividade fagocitária de macrófagos em aves jovens com altas doses de suplementação de vitamina E (110 a 220 mg/Kg). Estudo feito por Boa-Amponsem et al. (2000) comprovaram também essa melhora da capacidade fagocitária, utilizando dosagens de até 300 mg/Kg de vitamina E na dieta de frangos onde foi observado um aumento significativo na relação heterófilo/linfócito.

Outros trabalhos sugerem que o uso destas vitaminas junto às vacinas, quer seja na forma de suplemento dietético, quer seja junto à vacina por si só melhoram a resposta imunológica (FRANCHINI et al., 1991 e 1995). Outro estudo feito por Friedman; Bartov e Sklan (1998) apontaram que a resposta humoral é diretamente afetada pela suplementação de vitamina E, porém a ingestão excessiva desta vitamina provoca um efeito prejudicial na produção de anticorpos em frangos. Corroborando com esse resultado, utilizando dosagens de até 200 UI de vitamina E, Leshchinsky e Klasing (2001) observaram que níveis moderados de vitamina E na dieta (25 a 50 UI/Kg) foram melhores para produção de anticorpos em comparação com os grupos que receberam níveis mais altos. Nesse mesmo experimento de Leshchinsky e Klasing (2001), foram utilizadas vacinas vivas e inativadas do VBI aonde somente o grupo vacinado com vacinas inativadas teve um aumento de anticorpos quando suplementado com 25 UI/Kg de vitamina E na ração, os autores acreditam que pode ser devido a um aumento da resposta imune celular nos grupos suplementados já que se sabe que a imunidade mediada por células e imunidade local desempenha um papel importante na resposta vacinal contra a BI.

Com isso releva-se a importância da ação da vitamina E no sistema imunológico das aves e também a necessidade de mais estudos sobre a dosagem ideal de suplementação e se essa suplementação é capaz de melhorar a resposta inata e adquirida de aves vacinadas e desafiadas com o VBI, corroborando ou não com os experimentos já realizados.

### 3 ARTIGO I

#### **AÇÃO DA VITAMINA E SOBRE O SISTEMA IMUNE DE AVES VACINADAS COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA**

#### **VITAMIN E EFFECT ON THE IMMUNE SYSTEM OF SPF BIRDS VACCINATED WITH INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS.**

##### 3.1 RESUMO

A fim de analisar a influência da vitamina E sobre a resposta imunológica de aves vacinadas e desafiadas com o Vírus da Bronquite Infecciosa das aves (VBI), e qual dose da vitamina E é melhor para essa resposta, foi realizado um experimento utilizando 50 aves SPF alojadas com um dia de vida em isoladores na Embrapa - Suínos e Aves. As aves foram divididas em 10 grupos de cinco aves cada, incluindo grupo controle positivo e negativo. Receberam diferentes quantidades de suplementação de vitamina E (15, 50 e 200 UI/Kg) na ração, sendo dois grupos para cada tratamento. No décimo quarto dia de vida as aves foram vacinadas via óculo-nasal com a vacina comercial para Bronquite Infecciosa (H-120) e após 28 dias um grupo por tratamento foi desafiado com VBI cepa clássica (M-41). Cinco dias após o desafio as aves foram necropsiadas e os macrófagos abdominais foram coletados para análise da atividade microbicida e dosagem de óxido nítrico (NO). Um pulmão de cada ave foi coletado para contagem de células através de citometria de fluxo e também dosagem de NO. Órgãos de eleição também foram coletados para análise histológica e realização do isolamento viral para analisar a eficiência vacinal. Os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA e Student t- test. Com estes resultados, pode-se observar uma maior atividade microbicida dos macrófagos abdominais de aves dos grupos com maior suplementação de vitamina E (200 UI/Kg) quando comparado com os grupos que não receberam ou receberam quantidades menores (0, 15, 50 UI/Kg), indicando uma melhora na resposta imune

inata influenciada pela suplementação de vitamina E na dieta. A suplementação desta vitamina em altas dosagens também aumenta a capacidade dos macrófagos em produzir NO. E, através da citometria, sugere-se que os macrófagos são as principais células recrutadas no tecido pulmonar no combate a BI e esta ação foi potencializada pela adição da vitamina independente de dosagem.

**Palavras-chave:** imunidade, nutrição, vacina, desempenho, vitamina E.

### ABSTRACT

In order to analyze the influence of vitamin E on the immune response of birds vaccinated and challenged with Infectious Bronchitis Virus in poultry (VBI), and which dose of vitamin E is the best to answer this, an experiment was conducted using 50 SPF birds housed with one day of age at Embrapa - Suínos e Aves. All birds were divided into 10 groups of five birds each, including positive and negative control groups. Different amounts of vitamin E supplementation (15, 50, and 200 IU/Kg) was added into the feed. On the 14th day of life the birds were vaccinated through oculo-nasal via, with the commercial vaccine for infectious bronchitis (H-120) and after 28 days, one group for each treatment was challenged with IBV classical strain (M-41). Five days after challenge birds were necropsied and the abdominal macrophages were collected for microbicidal activity and measurement of nitric oxide (NO). Lungs from each bird were collected for cell count by flow cytometry and also for NO dosage. Organs of predilection were also collected for histological analysis and virus isolation to analyze the efficiency of the vaccine. The results were evaluated by ANOVA and Student t-test. An increase on microbicidal activity of abdominal macrophages was observed in the groups of birds with higher levels of vitamin E (200 IU/Kg) supplementation when compared with groups that did not receive or received minor amounts (0, 15, 50 IU/Kg), indicating an improvement in the innate immune response influenced by vitamin E supplementation in the diet. The supplementation of this vitamin in high doses also increases the ability of macrophages to produce NO. And, by flow cytometry, it appears that macrophages are the primary cells recruited in the lungs to fight BI and this action was potentiated by the addition of vitamin E, independent of the dosage.

**Keywords:** immunity, nutrition, vaccine, performance, vitamin E.

### 3.2 INTRODUÇÃO

Sabendo da importância da nutrição para o desenvolvimento físico e fisiológico da ave, vários ingredientes vêm sendo empregados e estudados na alimentação animal a fim de melhorar o sistema imunológico e desempenho animal (KLASING, 1998; KIDD, 2004). Um desses ingredientes é a vitamina E que é conhecida por ser um potente antioxidante com função moduladora do sistema imune. Porém, há ainda certa disparidade sobre a quantidade adequada a ser utilizada. Trabalho realizado por Leshchinsky e Klasing (2001), encontrou que níveis moderados de vitamina E (25 e 50 UI/Kg) na dieta induziu melhor produção de anticorpos em comparação com os grupos que receberam níveis mais altos (100 a 200 UI/Kg). Já Konjufca et al. (2004) observaram maior atividade fagocitária dos macrófagos em frangos suplementados com doses altas de vitamina E (110 a 220 mg/Kg). Sabendo da possível influência da vitamina E, um estudo sobre esse micronutriente se faz importante para avicultura uma vez que pode auxiliar no combate a várias doenças como a Bronquite Infecciosa das aves (BI). A BI está amplamente distribuída nos plantéis avícolas e é responsável por causar inúmeros prejuízos financeiros para essa atividade. Embora a vacinação contra essa doença ocorra esquematicamente em todos os lotes, a incidência ainda é alta quer seja por novas variantes do vírus, por erros na prática de vacinação, ou até mesmo por interferência nutricional.

Contudo, os objetivos deste trabalho foram analisar em que nível a vitamina E influenciaria a resposta imunológica inata e adaptativa através da avaliação das células que participam destas respostas como os macrófagos, linfócitos e demais mononucleares, por testes de cultivo celular e citometria de fluxo, e se essa suplementação poderia potencializar a vacinação contra o VBI avaliado através dos sinais clínicos, isolamento viral e exame histopatológico.



### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Animais

Foram utilizados para esse experimento, 50 pintinhos da linhagem de postura SPF com um dia de vida distribuídos aleatoriamente em dez grupos de cinco animais, tratados com a dieta formulada acrescida de diferentes níveis de vitamina E. Os animais foram alojados em ambiente restrito em cabines isoladores com filtro de ar de segurança tipo “High Efficiency Particulate Air” (HEPA). As aves receberam diferentes níveis de suplementação de vitamina E acrescidos dieta a base de milho e farelo de soja conforme proposto por Rostagno et al. (2011), e suplementadas com calcário e DICAL-fosfato a fim de alcançar desejados níveis de cálcio e fósforo. Óleo de soja, aminoácidos sintéticos, premix mineral, sal e cloreto de colina também serão utilizados a ração. A vitamina E foi adicionada nas dietas antes do procedimento de mistura. Alfa-tocoferol foi a fonte de vitamina E, este micronutriente foi previamente pré-misturada com farinha de milho para assegurar uma melhor homogeneidade. Dados de composição de matéria-prima foi extraído a partir das tabelas brasileiras para Aves e Suínos, Rostagno et al. (2011) e comparados com os resultados obtidos das análises laboratoriais. A ração foi produzida sob a forma de pellets. Alimento e água fornecidos *ad libitum*.

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais CEUA/CNPSA conforme protocolo de aprovação número 013/2012 aprovado em 23/08/2012

#### 3.3.2 Tratamentos

Foram distribuídos três tratamentos de diferentes níveis de suplementação de vitamina E (15, 50 e 200 UI/Kg) na ração. Os grupos utilizados estão na Tabela 1, sendo: Grupo 1 - controle positivo somente desafiado; Grupo 2 - controle negativo sem vacina e sem desafio; Grupo 3 - aves vacinadas e sem suplementação de vitamina E; Grupo 4 - aves sem suplementação de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 5 - aves vacinadas e com 15 UI/Kg de vitamina E; Grupo 6 - aves com 15 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 7 - aves vacinadas e com 50 UI/Kg de vitamina E; Grupo 8 - aves com 50 UI/Kg de

vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 9 - Aves vacinadas e com 200 UI/Kg de vitamina E; e Grupo 10 - aves com 200 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas.

### 3.3.3 Vacinação

Para a vacinação das aves nesse experimento foi utilizada vacina comercial (estirpe H120 – Holland 120) viva atenuada. A vacina foi titulada e administrada na dose  $10^{3,5}$ DIE<sub>50</sub>, via óculo-nasal, no décimo quarto dia de vida conforme recomendado pela OIE (2008).

**Tabela 1-** Distribuição dos grupos por isoladores conforme os tratamentos.

Grupo	Número de Animais	Vit.E (UI/Kg)	Vacina BI(H120)	Desafiadas (M41)
1	5	0	NÃO	SIM
2	5	0	NÃO	NÃO
3	5	0	SIM	NÃO
4	5	0	SIM	SIM
5	5	15	SIM	NÃO
6	5	15	SIM	SIM
7	5	50	SIM	NÃO
8	5	50	SIM	SIM
9	5	200	SIM	NÃO
10	5	200	SIM	SIM

Legenda: UI (unidades internacionais equivale a mg), H120 (Holland 120), estirpe viral presente na vacina e M41 (Massachusetts 41) estirpe viral homóloga à da vacina. Fonte: Próprio autor.

### 3.3.4 Desafio

O desafio foi realizado com cepa viral clássica do VBI (M41-Massachusetts 41- estirpe viral homóloga à vacina), proveniente da Embrapa - Suínos e Aves, já testada quanto a sua infectividade viral. O desafio foi administrado via óculo-nasal na dose  $10^{3,5}$ DIE<sub>50</sub>, com três semanas após a vacinação conforme as normas estabelecidas pela OIE

(2008). Após o desafio, os sinais clínicos característicos de doença respiratória (prostração, descarga nasal e ocular, rouquidão, espirro, conjuntivite, inapetência e penas arrepiadas) foram observados por cinco dias para verificar proteção vacinal. O índice de mortalidade e os sinais clínicos foram observados como parâmetro para eficiência vacinal. Com três semanas após a vacinação as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical.

### **3.3.5 ANÁLISES**

Para avaliar a imunidade celular das aves foram analisados os macrófagos alveolares e abdominais, óxido nítrico bem como linfócitos T (CD4 e CD8) e demais células mononucleares.

#### **3.3.5.1 Obtenção dos macrófagos abdominais**

Para tal procedimento foi utilizado o método de Sabet et al. (1977) modificado por Trembicki et al. (1984). Quarenta e oito horas antes de sacrificar, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (IP) de Sephadex G-40 (Sigma suspensão 3%) a fim de promover a ativação abdominal dos macrófagos. Cada animal recebeu o volume de 1 mL para cada 100 g de peso. Os animais foram sacrificados 48 h pós-inoculação e a cavidade abdominal foram lavadas com 20 mL de RPMI 1640 com 5% de albumina bovina. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para  $2 \times 10^6$  por 0,2 mL de RPMI.

#### **3.3.5.2 Avaliação da atividade microbicida dos macrófagos abdominais**

Para avaliar a atividade microbicida dessas células seguiu-se o ensaio descrito previamente por Desiderio e Campbell (1983). Utilizou-se *Salmonella* Enteritidis retiradas na fase log de crescimento de forma asséptica e lavadas três vezes em PBS e sua concentração foi ajustada em  $2.0 \times 10^7$  UFC/0,8 mL de RPMI com 5% de soro fetal bovino. Após este procedimento foi adicionado 0,2 mL de RPMI 1640 contendo  $2.0 \times 10^6$  de macrófagos em placas de 24 poços e incubado por 30 minutos a

37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram plaqueadas em placas de Petri contendo ágar Verde Brilhante e quantificadas. Após a quantificação o total de bactérias presentes nas placas controles foi de 1.25 x 10<sup>6</sup> UFC. Sendo este o parâmetro de comparação para contagem do teste.

### 3.3.5.3 Citometria de fluxo para análise dos macrófagos alveolares

Os pulmões foram retirados e cortados em pequenos pedaços. O tecido foi tratado com colagenase 2 mg/mL de RPMI 1640 por 40 minutos em um agitador. Macerou-se a mistura com cadinho e pistilo, e passou em um filtro para tubo tipo Falcon. O conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. Foi coletado 1 mL do sobrenadante para dosagem de óxido nítrico e o pellet resuspenso em 2 mL de PBS. Foi realizada uma nova centrifugação por mais 10 minutos a 1200 rpm e resuspendeu-se o pellet em um meio de cultura contendo soro fetal bovino e RPMI na concentração de 1:10, respectivamente. Após esse procedimento as amostras foram congeladas primeiramente a -20°C e depois de 24 horas armazenadas no freezer -70°C até o momento da leitura na Universidade do Estado de São Paulo (USP). Essas amostras foram acondicionadas de forma adequada e transportadas até a USP, no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia.

Nesse laboratório foi realizado a fenotipagem desses macrófagos, utilizando o marcador KUL 01 (ABcam, Cambridge, MA, USA) específico para macrófagos de *Gallus gallus domesticus*, conforme descrito por Mast et al. (1998). Para esse procedimento foi utilizado uma seqüência de tubos, sendo um para cada amostra coletada. Foi adicionado 1 µL de KUL 01 em cada amostra e foi incubado por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1932 g. Em seguida, procedeu-se a leitura das amostras no citômetro de fluxo (Facsantorbd<sup>®</sup>). A fluorescência analisada nos permitiu analisar a quantidade de células marcadas com KUL 01. Dessa forma foi mensurada a quantidade de macrófagos/monócitos no tecido analisado. Analisou-se a intensidade de fluorescência (média) e a porcentagem de células marcadas (%).

### **3.3.5.4 Determinação do óxido nítrico (NO)**

Esta etapa foi realizada na Universidade Estadual de Londrina. A concentração de NO nos sobrenadantes oriundos da centrifugação dos itens 3.3.5.2 e 3.3.5.3 (macrófagos abdominais e macrófagos alveolares) foi medida com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diidrocloreto de naftiletilenodiamina, 2,5%  $H_3PO_4$ ) (GREEN et al., 1981). Após processamento dos macrófagos um volume de 100  $\mu$ L exsudato abdominal e da amostra alveolar foram colocados em placas de vinil por uma hora a 37°C, e então, adicionou-se o volume igual do reagente de Griess. Depois de incubar em temperatura ambiente por 10 minutos foi determinada a absorbância em leitor de ELISA com 540 nm de comprimento de onda. A concentração de nitrito foi determinada usando curva padrão.

### **3.3.5.5 Sinais clínicos e mortalidade**

Após o desafio das aves foi observado se houve presença de sinais clínicos característicos de doença respiratória (prostração, descarga nasal e ocular, rouquidão, espirro, conjuntivite, inapetência e penas arrepiadas) e também de mortalidade das aves durante cinco dias para verificação de proteção vacinal.

### **3.3.5.6 Isolamento viral**

Esta etapa foi realizada através da inoculação de 0,2 mL de suspensão de traquéia macerada das aves experimentais em ovos SPF embrionados com nove dias de incubação via cavidade alantóide. Para isso foram inoculados cinco ovos por amostra, e incubados por sete dias a 37°C. A ovoscopia foi realizada diariamente no mesmo horário a fim de verificar a mortalidade. Após sete dias foram analisados as alterações nos embriões como nanismo e enrolamento (OIE, 2008).

### **3.3.5.7 Exame histopatológico**

Foram coletados amostras de traquéia, pulmão, rim, baço e timo e acondicionados em recipientes contendo formol 10%. Esses

fragmentos foram processados através da técnica histológica padrão, utilizada no Laboratório de Patologia Animal da Embrapa - Suínos e Aves. Esse protocolo consiste basicamente em fixação dos tecidos em formalina 10%, recorte e introdução das amostras fixadas no aparelho de histotécnico que faz o processo de desidratação e clarificação do material utilizando várias concentrações de álcool e xilol. Após esse processo o material foi fixado em parafina líquida utilizando o aparelho Histocenter. Os cortes histológicos foram realizados, utilizando-se um micrótomo e por fim a coloração com hematoxilina-eosina (HE). A leitura foi realizada em microscópico óptico e as imagens foram registradas utilizando uma câmera acoplada no microscópio e um programa computacional (Motic Images Plus®).

Foram atribuídos cinco graus de zero a quatro, variando de acordo com a gravidade das lesões encontradas. Grau zero representado ausência de achados histopatológicos, e para processos discretos, leves, moderados e graves foram direcionados como grau um, dois, três e quatro, respectivamente. As lesões observadas foram basicamente hiperplasia, edema e congestão do epitélio, presença de infiltrado e perda ciliar.

### **3.3.5.8 Hematócrito**

Para analisar se as aves tinham doença clínica através da anemia foi realizada a técnica de hematócrito para analisar a porcentagem de glóbulos vermelhos no volume sanguíneo total. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo anticoagulante (heparina). No laboratório o sangue foi distribuído em microtubos capilares e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. A leitura foi feita utilizando um cartão de leitura (FANEM Ltda.) em escalas padronizadas.

### **3.3.5.9 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Nested-PCR para diagnóstico da anemia infecciosa das aves**

O fígado foi coletado das aves com o intuito de descartar a possibilidade de infecção por outro agente viral com ação imunossupressora, como o vírus da Anemia Infecciosa das galinhas. Para digestão do tecido foi utilizado tampão de lise e proteinase K e a extração do DNA foi realizada através da técnica com fenol-clorofórmio utilizando o Kit da Invitrogen®. Foi realizado a reação para o PCR e

depois feito o Nested-PCR utilizando primers específicos da porção VP3 e VP1. E então, feita a leitura por eletroforese em gel de agarose.

### 3.4 ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e t Student com significância de  $p < 0,05$ .

### 3.5 RESULTADOS

#### **3.5.1 Avaliação da atividade microbicida dos macrófagos abdominais**

A análise da atividade microbicida dos macrófagos obtido através do lavado abdominal, em contato com uma cultura de *Salmonella* Enteritidis permitiu identificar uma significativa redução ( $P < 0,05$ ) de inóculo nos grupos tratados com maior suplementação de vitamina E (200 UI/Kg), quando comparado com os grupos que receberam quantidades menores (15 e 50 UI/Kg) representado pelo Quadro 1. Não houve diferença significativa entre si dos grupos vacinados e vacinados/desafiados. Indicando assim, uma melhora na resposta imune inata influenciada pela suplementação de vitamina E.

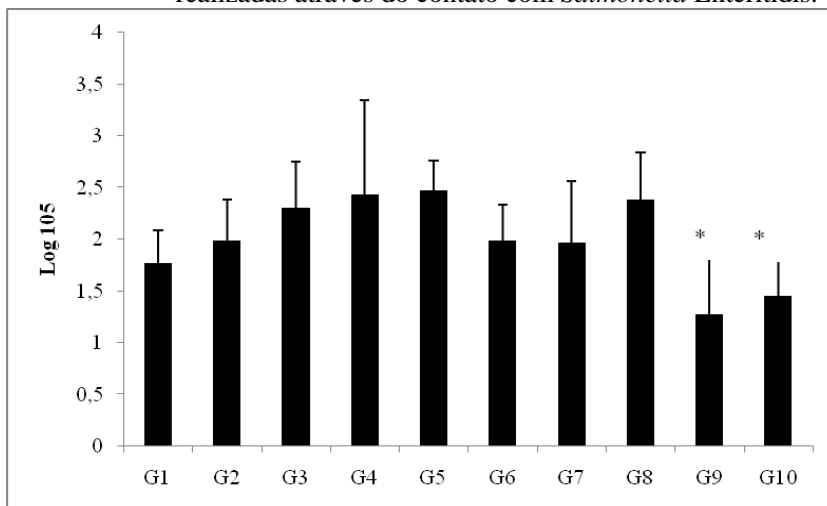
#### **3.5.2 Determinação óxido nítrico (NO)**

O grupo de aves vacinadas (Grupo 9) como as vacinadas e desafiadas (Grupo 8 e 10), quando suplementados com altas dosagens (50 e 200 UI/Kg) de vitamina E se comportaram de maneira semelhante ao grupo controle negativo (Quadro 2), sugerindo que quando a ave é vacinada ou desafiada, há um comprometimento do sistema imunológico, o que levaria a uma redução da atividade imunológica, fazendo com que a produção de óxido nítrico (NO) fique prejudicada. Quando a ave é suplementada com altos níveis de vitamina E, mesmo sendo vacinada ou desafiada, esse comprometimento não ocorre, tendo a produção de NO igual a de uma ave em condições de homeostase. Este resultado sugere que a suplementação com altas doses de vitamina aumenta a capacidade dos macrófagos em produzir reagentes nitrogenados.

Foi observada a produção de NO nos pulmões de aves vacinadas e vacinadas/desafiadas com o VBI e suplementadas com

níveis variáveis de vitamina E, porém sem diferença estatisticamente comprovada, indicando, que os macrófagos presentes neste órgão utilizaram outro mecanismo de combate viral (Quadro 3).

Quadro 1 - Atividade microbicida dos macrófagos abdominais realizadas através do contato com *Salmonella* Enteritidis.



Legenda: Grupo 1 - controle positivo somente desafiado; Grupo 2 - controle negativo sem vacina e sem desafio; Grupo 3 - aves vacinadas e sem suplementação de vitamina E; Grupo 4 - aves sem suplementação de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 5 - aves vacinadas e com 15 UI/Kg de vitamina E; Grupo 6 - aves com 15 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 7 - aves vacinadas e com 50 UI/Kg de vitamina E; Grupo 8 - aves com 50 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 9 - Aves vacinadas e com 200 UI/Kg de vitamina E; e Grupo 10 - aves com 200 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas. Fonte: Próprio autor.

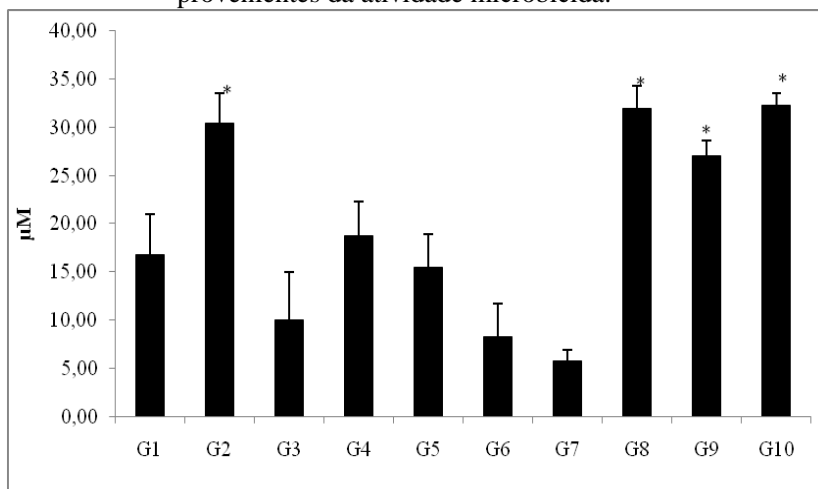
### 3.5.3 Citometria de fluxo do pulmão

Através da técnica de citometria de fluxo foi analisada a população celular do pulmão. Para isso, foram utilizados marcadores para linfócitos T CD4+ e CD8+ e para células mononucleares. Não foi constatada população significativa de linfócitos T CD4+ e CD8+ para esse experimento, somente população de células mononucleares



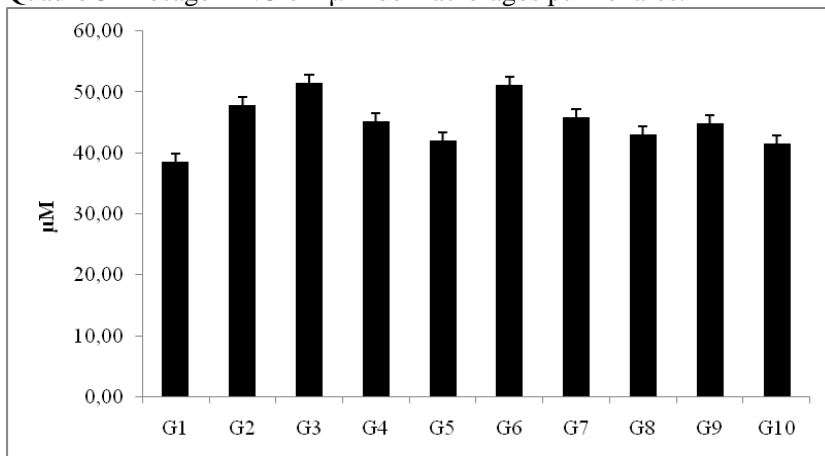
(macrófagos e monócitos). Este resultado sugere que a principal população de leucócitos recrutados ao tecido pulmonar no combate a BI é a dos macrófagos (população representada nos histogramas). Embora não tenha encontrado diferença significativa ( $P < 0.05$ ), os histogramas ilustram uma tendência maior na população de macrófagos em aves suplementadas. As figuras mostram menor quantidade de macrófagos de aves controles (Figura 1 A), comparada aos de aves vacinadas, tratadas com doses crescentes de vitamina E (Figura 1 B, C, D e E). Essa diferença também pode ser observada nos grupos desafiados, grupo controle (Figura 2 A) e os grupos vacinados e desafiados com diferentes níveis de suplementação (Figura 2 B, C, D, e E).

Quadro 2 - Dosagem NO em  $\mu\text{M}$  de macrófagos abdominais provenientes da atividade microbicida.



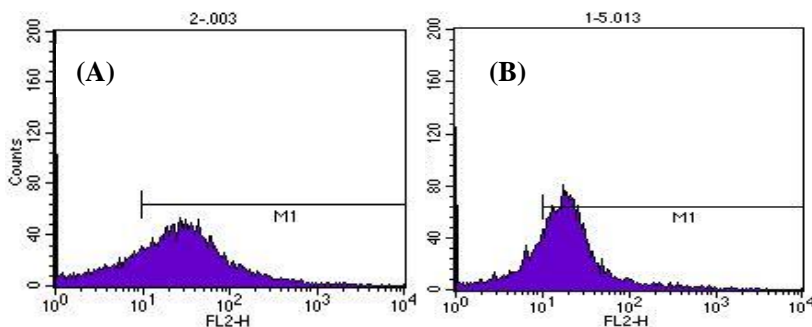
Legenda: Grupo 1 - controle positivo somente desafiado; Grupo 2 - controle negativo sem vacina e sem desafio; Grupo 3 - aves vacinadas e sem suplementação de vitamina E; Grupo 4 - aves sem suplementação de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 5 - aves vacinadas e com 15 UI/Kg de vitamina E; Grupo 6 - aves com 15 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 7 - aves vacinadas e com 50 UI/Kg de vitamina E; Grupo 8 - aves com 50 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 9 - Aves vacinadas e com 200 UI/Kg de vitamina E; e Grupo 10 - aves com 200 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas. Fonte: Próprio autor.

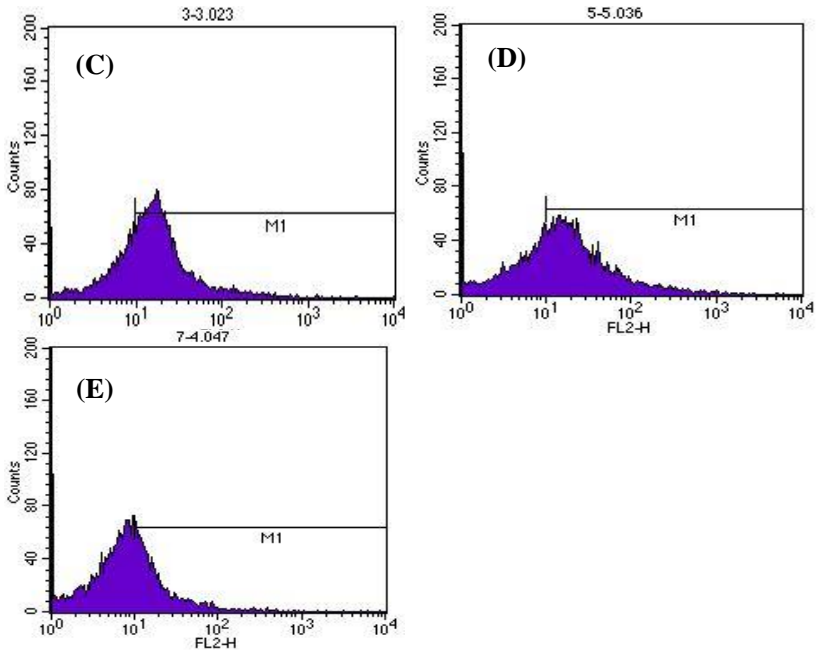
Quadro 3 - Dosagem NO em  $\mu\text{M}$  de macrófagos pulmonares.



Legenda: Grupo 1 - controle positivo somente desafiado; Grupo 2 - controle negativo sem vacina e sem desafio; Grupo 3 - aves vacinadas e sem suplementação de vitamina E; Grupo 4 - aves sem suplementação de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 5 - aves vacinadas e com 15 UI/Kg de vitamina E; Grupo 6 - aves com 15 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 7 - aves vacinadas e com 50 UI/Kg de vitamina E; Grupo 8 - aves com 50 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 9 - Aves vacinadas e com 200 UI/Kg de vitamina E; e Grupo 10 - aves com 200 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas. Fonte: Próprio autor.

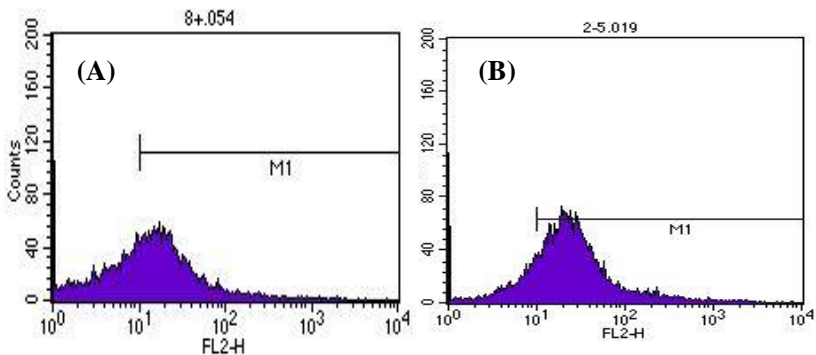
Figura 1 – Histogramas da citometria de fluxo da população mononuclear (macrófagos e monócitos) do pulmão de aves do grupo controle negativo e grupos vacinados com diferentes dosagens de vitamina E.

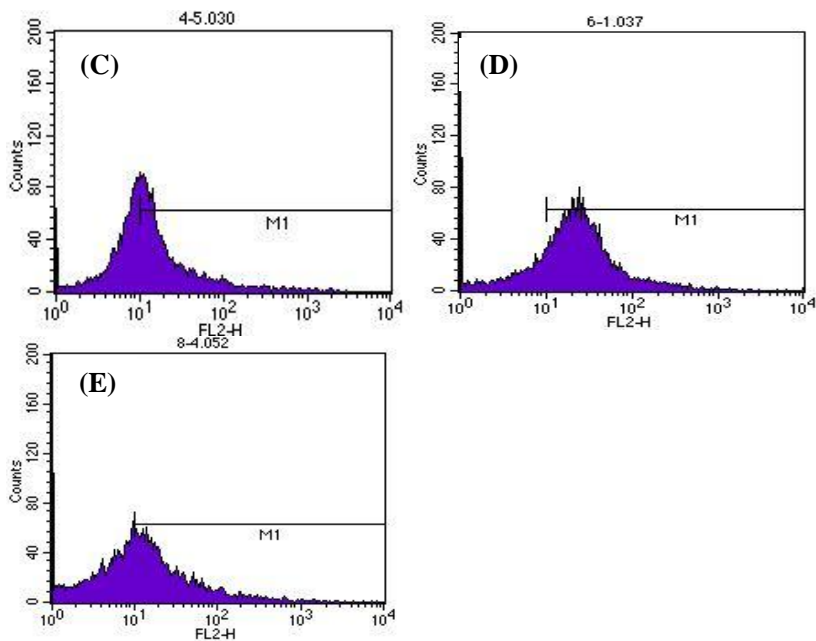




Legenda: (A) Ave do grupo 2 - controle negativo sem vacina e sem desafio. (B) Ave do grupo 3 - aves vacinadas e sem suplementação de vitamina E. (C) Ave do grupo 5 - aves vacinadas e com 15 UI/Kg de vitamina E. (D) Ave do grupo 7 - aves vacinadas e com 50 UI/Kg de vitamina E. (E) Ave do grupo Grupo 9 - Aves vacinadas e com 200 UI/Kg de vitamina E. Fonte: Próprio autor.

Figura 2 – Histogramas da análise da citometria de fluxo da população mononuclear (macrófagos e monócitos) do pulmão de aves do grupo controle positivo e grupos com diferentes dosagens de vitamina E, vacinados e desafiados.





Legenda: (A) Ave do grupo 1 - controle positivo somente desafiado. (B) Ave do grupo 4 - aves sem suplementação de vitamina E, vacinadas e desafiadas. (C) Ave do grupo 6 - aves com 15 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas. (D) Ave do grupo 8 - aves com 50 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas. (E) Ave do grupo 10 - aves com 200 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas. com 200UI de VE, vacinada e desafiada. Fonte: Próprio autor.

### 3.5.4 Sinais clínicos e mortalidade

Durante o período experimental não foi observados presença de sinais clínicos e/ou mortalidade das aves. No quinto dia após o desafio, dia do abate, somente as aves do grupo controle positivo apresentavam uma leve ronquidão.

### 3.5.5 Teste de isolamento viral em ovos embrionados

Para avaliar a eficiência vacinal foi realizada a técnica de isolamento viral em ovos embrionados (Tabela 2). Analisando as

alterações dos embriões pode-se concluir que todos os grupos vacinados e desafiados (4, 6, 8 e 10), exceto o grupo seis, obtiveram uma boa proteção vacinal (entre 80 e 100%). O grupo seis, que é um grupo vacinado/ desafiado suplementado com 15 UI/Kg de vitamina E, não teve uma resposta satisfatória (40% de proteção), este resultado pode ser por algum fator (vacina ou desafio) que não foi influenciada pela dose de suplementação e tão pouco pela resposta imunológica das aves (comprovada por outros testes). Os grupos somente vacinados (3, 5, 7, e 9) não apresentaram alteração em embrião como esperado. E, comprovando o teste, os grupos controles (1 e 2), apresentaram resultados satisfatórios. Podemos concluir, portanto, que no geral analisando a isolamento viral, a vacinação foi eficiente.

Tabela 2 – Avaliação da eficiência vacinal em ovos embrionados

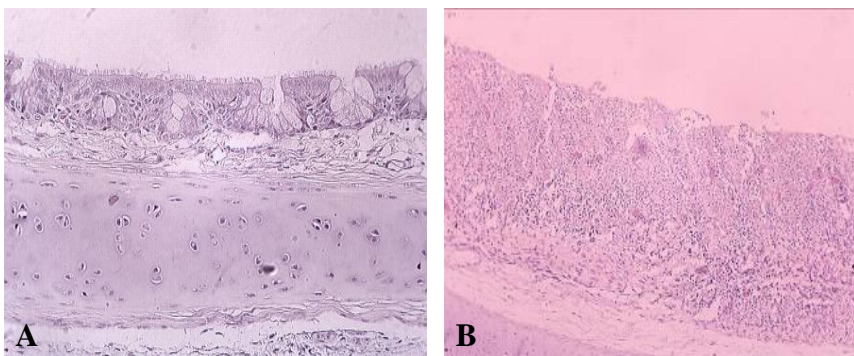
<b>Grupo</b>	<b>Leitura</b>	<b>% Proteção</b>
<b>1</b>	4/4 nanismo e enrolamento, 1/5 mortalidade	-
<b>2</b>	5/5 SA	-
<b>3</b>	5/5 SA	-
<b>4</b>	4/5SA;1/5 nanismo e enrolamento	80%
<b>5</b>	5/5 SA	-
<b>6</b>	2/5 SA 3/5 nanismo e enrolamento	40%
<b>7</b>	5/5 SA	-
<b>8</b>	5/5 SA	100%
<b>9</b>	5/5 SA	-
<b>10</b>	4/5 SA; 1/5 nanismo e enrolamento	80%

Legenda: Leitura dos ovos embrionados. Grupo 1 - somente desafiado; Grupo 2 - sem vacina e sem desafio; Grupo 3 - aves vacinadas e sem suplementação de vitamina E; Grupo 4 - aves sem suplementação de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 5 - aves vacinadas e com 15 UI/Kg de vitamina E; Grupo 6 - aves com 15 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 7 - aves vacinadas e com 50 UI/Kg de vitamina E; Grupo 8 - aves com 50 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas; Grupo 9 - Aves vacinadas e com 200 UI/Kg de vitamina E; e Grupo 10 - aves com 200 UI/Kg de vitamina E, vacinadas e desafiadas. SA- sem alterações embrionárias. Fonte: Próprio autor.

### 3.5.6 Exame histopatológico

No exame histopatológico foram analisados pulmão, traquéia, rim, baço e timo. Porém, foram encontradas lesões característica do VBI somente na traquéia. Portanto foi analisado somente esse órgão quanto às alterações histopatológicas. As traquéias do grupo controle negativo não apresentaram lesões, tendo seu epitélio ciliar preservado (Figura 3 A). No grupo 1 (aves que receberam somente desafio) foram achadas todas as alterações descritas como positivas: perda ciliar, hiperplasia e edema na lâmina própria junto com infiltrado inflamatório mononuclear e congestão (Figura 3 B).

Figura 3 - Fotos de cortes histopatológicos de traquéias de aves dos grupos controles.



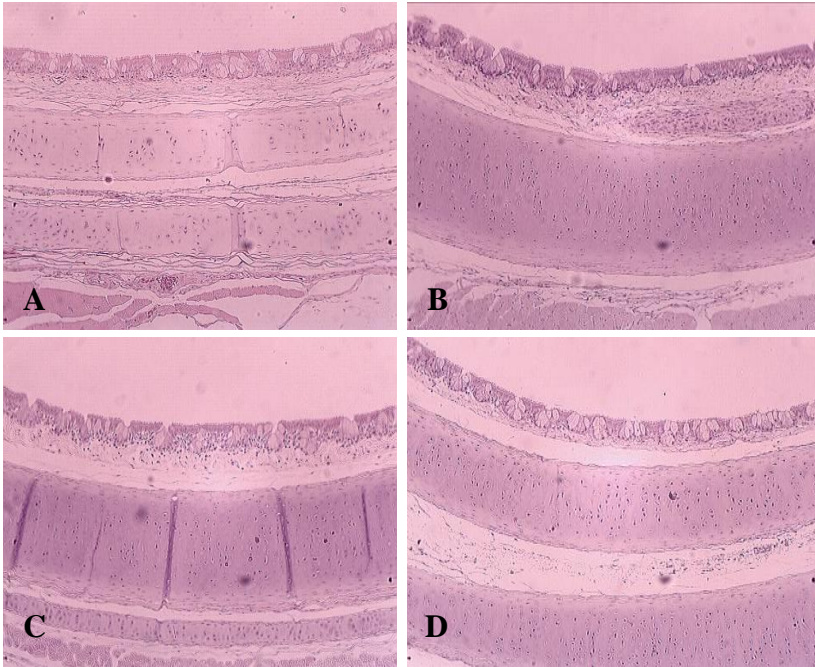
Legenda: A) traquéia de ave do grupo 2 (sem vacina e sem desafio): ausência de lesões, evidenciando o epitélio ciliado preservado com células caliciformes, HE 40x. B) traquéia de ave do grupo 1 (somente desafiado): notar hiperplasia e edema de epitélio de grau 5, infiltrado inflamatório intenso e ausência de cílios, HE 40x. Fonte: Próprio autor.

Os cortes histológicos das outras aves estavam normais. As traquéias das aves dos grupos somente vacinados sem suplementação e suplementados com 15, 50 e 200 UI/Kg de vitamina E estão representados pela Figura 4 (A, B, C e D, respectivamente).

As traquéias das aves dos grupos vacinados e desafiados com diferentes níveis de suplementação de vitamina E também estavam normais não apresentando alterações histopatológicas. Os grupos vacinados e desafiados sem suplementação e suplementados com 15, 50

e 200 UI de vitamina/Kg estão representados pela Figura 5 (A, B, C e D, respectivamente). Somente as traquéias das aves do grupo 4 (40% de proteção pela isolamento viral) foram positivas para as lesões, sendo 3 das 5 aves com lesões de BI variando de grau 1 ao 4.

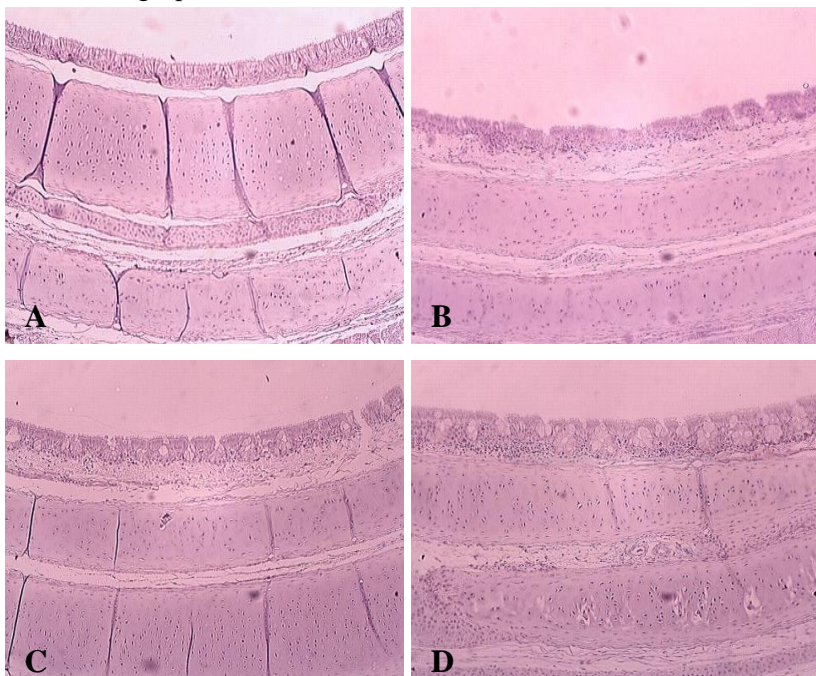
Figura 4 - Fotos de cortes histopatológicos de traquéias de aves dos grupos somente vacinados.



Legenda: A) traquéia de ave do grupo 3 (vacinado e sem suplementação de VE): ausência de lesões, HE 10x. B) traquéia de ave do grupo 5 (vacinado com 15 UI/Kg de VE): ausência de lesões, HE 10x. C) traquéia de ave do grupo 7 (vacinado com 50 UI/Kg de VE): ausência de lesões, HE 10x . D) traquéia de ave do grupo 9 (vacinado com 200 UI/Kg de VE), ausência de lesões, HE 10x.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Fotos de cortes histopatológicos de traquéias de aves dos grupos vacinados e desafiados.



Legenda: A) traquéia de ave do grupo 4 (sem suplementação VE, vacinadas e desafiadas): ausência de lesões, HE 10x. B) traquéia de ave do grupo 6 (aves com 15 UI/Kg de VE, vacinadas e desafiadas): ausência de lesões, HE 10x. C) traquéia de ave do grupo 8 (aves com 50 UI/Kg de VE, vacinadas e desafiadas): ausência de lesões, HE 10x. D) traquéia de ave do grupo 10 (aves com 200 UI/Kg de VE, vacinadas e desafiadas): ausência de lesões, HE 10x. Fonte: Próprio autor.

### 3.5.7 Hematócrito

Com a análise sanguínea foi observado que todos os resultados de hematócrito foram negativos, ou seja, superior a 25%, indicando assim, que as aves não apresentavam quadro de anemia clínica naquele momento.



### 3.5.8 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Nested PCR para diagnóstico de anemia infecciosa das aves

Os resultados foram todos negativos para CAV, sugerindo, portanto, ausência de replicação viral nos tecidos.

## 3.6 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesse presente experimento comprovam um efeito positivo na capacidade microbicida dos macrófagos abdominais e produção de NO de aves suplementadas com altas concentrações de vitaminas (200 UI/Kg), comparado com as demais aves que não receberam ou receberam uma concentração menor do suplemento (15 e 50 UI/Kg) quando em contato com uma cultura de *Salmonella* Enteritidis. Os macrófagos têm um papel importante na resposta imune inata e adaptativa, participam do sistema fagocítico e microbicida através da produção de citocinas e óxido nítrico, sendo uma potente arma de combate contra agentes infecciosos (HE, GENOVESE; KOGUT, 2011; QURESHI, 2003). Sabe-se também que os macrófagos de aves são capazes de produzir NO sob vários estímulos imunológicos e que sua função é essencial para o sistema imunológico (HUSSAIN; QURESHI, 1997).

Corroborando com os achados deste estudo, Niu et al. (2009) constataram que tanto a porcentagem de macrófagos do exsudato abdominal bem como a sua capacidade fagocítica, se mostraram aumentados em aves submetidas à estresse térmico e suplementadas com dosagens maiores de vitamina E (100 e 200 mg/Kg). Konjufca et al. (2004) também observaram uma melhora na atividade fagocitária de macrófagos em aves jovens com altas doses de suplementação de vitamina E (110 a 220 mg/Kg). Entretanto, o estudo feito por Gore e Qureshi (1997) constatou uma melhor resposta fagocítica de macrófagos e um aumento de NO, na dosagem de 10 UI/Kg via ovo, melhorando a qualidade de pintos e perus pós-eclosão. Esses mesmos autores sugerem que o aumento de NO em aves suplementadas com vitamina E não está totalmente esclarecido. Os dados supõem que haja um aumento da afinidade dos receptores de membrana dos macrófagos para sua ativação, o que pode gerar também um aumento da atividade de iNOS.

Os estudos relacionados à vitamina E com fagocitose, em sua maioria, não utilizaram *Salmonella* Enteritidis para os testes com macrófagos. Embora seja conhecida a capacidade de sobrevivência da

*Salmonella* em macrófagos, essas células também possuem mecanismos capazes de matar esta bactéria. Estudo feito por Tengerdý e Brown (1977), reporta um aumento no sistema fagocítico mononuclear observado em aves suplementadas com 300 mg/Kg de vitamina E em relação ao grupo basal, mostrando um aumento na proteção contra patógenos microbianos como *Escherichia coli*. Entretanto, é de fundamental importância salientar neste contexto o estudo feito por He, Genovese; Kogut, (2011) onde se avaliou culturas de macrófagos frente a estímulos de citocinas e, essas células quando colocadas em contato com cultura de *Salmonella* Enteritidis, não apresentaram diferença na capacidade fagocítica e microbicida. Do mesmo modo, a produção de óxido nítrico não foi afetada. Dados similares foram encontrados por Higgins et al. (2007), os quais, avaliando a capacidade fagocítica de macrófagos e *Salmonella* Enteritidis em conjunto com probióticos não tiveram uma resposta satisfatória, dados que enfatizam a influência da suplementação de vitamina E nos macrófagos observado nesse estudo.

Esse trabalho também objetivou avaliar se a suplementação de vitamina E potencializa a vacinação contra a bronquite infecciosa. A BI é uma doença extremamente importante para avicultura brasileira. Embora seja feito o seu controle através da vacinação esquemática de lotes a sua disseminação está longe de acabar. Diversos são os estudos sobre esta enfermidade, principalmente sobre o real papel da resposta imune induzida por essa doença ou por sua vacinação que ainda não está totalmente esclarecido.

Dentro deste cenário, sabe-se que o VBI ou a vacinação estimula tanto a resposta imune humoral como celular. Leshchinsky e Klasing (2001) analisaram a resposta imune humoral utilizando vacinas atenuadas e inativadas de VBI e suplementação com várias dosagens de vitamina E (10, 17.5, 25, 37.5, 50, 100, e 200 UI). Eles encontraram que níveis moderados desta vitamina (25 UI/Kg) tiveram maior efeito imunomodulador quando comparado com níveis mais altos. Outros estudos também confirmam uma potencialização da vacinação com suplementação de vitamina E (FRANCHINI et al., 1991 e 1995).

Entretanto alguns estudos vêm relatando uma divergência quanto às respostas de anticorpos relacionados a essa enfermidade. Cook (1991) relatou que embora os anticorpos desempenhem papel importante na BI, outros fatores imunológicos devem estar envolvidos, com a resposta celular.

Estudo feito por Collisson et al. (2000) observaram um aumento da resposta imune celular mediada por células T (CTL) em aves com BI

associado ao desaparecimento dos sinais clínicos e do próprio vírus. Esse estudo promoveu a transferência de TCD8 de aves infectadas com IBV à aves, fazendo assim uma transferência adaptativa de proteção as aves contra o VBI. Essas CLT são descritas como um tipo de Interferon Gamma, que nada mais são do que citocinas associadas ao desenvolvimento da imunidade mediada por células (CMI). Esse mecanismo se faz principalmente, através da ativação de macrófagos que são responsáveis pelo fornecimento de proteção contra agentes intracelular (CHAMIZIO et al., 2001).

Avaliando a resposta imune celular de aves SPF e galos infectados com VBI, Beirão (2011) encontrou uma diminuição da população de linfócitos CD4 e CD8 na fase inicial da doença (entre 5 e 10 dias) através da citometria de fluxo, sugerindo um recrutamento dessas células para órgãos linfóides para sofrer ativação ou para o sítio de replicação. Esta hipótese também foi testada por Raj e Jones (1996), que usando uma variante do VBI, mostraram um aumento na quantidade de células CD4, CD8 e IgM no pulmão e na traquéia com pico máximo aos 7 dias PI através de imunohistoquímica e rins infectados entre os dias 1 e 5 PI. Neste presente estudo foi avaliada a ação destas células, tanto CLT como macrófagos, no combate ao VBI através da dosagem de NO, que seria então, a principal arma de combate contra esse vírus com um adicional, suplementação de vitamina E, o qual é descrito auxiliar na resposta imunológica contra diversos agentes infecciosos. Os resultados encontrados no isolamento viral juntamente com os sinais clínicos e achados histopatológicos, foram satisfatórios mostrando em sua maioria, eficácia na proteção e ausência e presença de vírus nos grupos controle negativo e positivo, respectivamente.

O isolamento viral foi positivo para um grupo de aves vacinadas, desafiadas e suplementadas com vitamina E (grupo 6) já que alterações nos embriões foram observadas, obtendo uma taxa de proteção muito baixa para este grupo. No entanto, essas aves não manifestaram sinais clínicos da doença, assim, colaborando com outros autores (NASCIMENTO; COMERLATOL; SPILKIL, 2013; TORO, 2010), esses resultados indicam que a vacina utilizada para o VBI pode ocasionar alterações nos embriões, ocorrendo a recuperação viral no teste de isolamento.

Avaliando a citometria, não foi constatada população significativa de linfócitos T CD4 e CD8 no pulmão para esse experimento. Este resultado sugere que a principal população de leucócitos recrutados ao tecido pulmonar no combate a BI é a dos

macrófagos. Uma vez que este tipo de fagócito compõe as células efectoras na resposta imune ao vírus, podemos concluir que a migração seja uma resposta normal à doença, porém esta ação foi potencializada pela adição da vitamina independente de dosagem.

Na literatura existem relatos de que a imunidade celular seja o principal recurso do sistema imune das aves para combater o IBV, indicando desta maneira, que a ação do NO estaria diretamente envolvida na resposta contra esse vírus (COLISSON et al., 2000; PEI, BRILES, COLISSON, 2003; PEI et al., 2001). Contudo, a quantidade de NO produzido pelos macrófagos, dentro dos vários tratamentos realizados com VBI, demonstra que não há uma diferença na capacidade de produção de reagentes nitrogenados, mesmo com a suplementação de vitamina E. Esse fato pode ser explicado devido alguma variabilidade, pois a expressão da iNOS pode ser detectada em vários tipos celulares, e a sua expressão pode ser afetada por alguns fatores como: hipertensão pulmonar, hipóxia e estímulos inflamatórios e, também pode variar dependendo da linhagem utilizada (BOWEN et al., 2006; CHAPAM; WIDEMAN, 2006).

Esses achados de literatura enfatizam a importância da suplementação de vitamina E, comprovando a sua ação estimulante no sistema imune das aves. E, somado aos resultados encontrados nesse experimento, pode-se sugerir que a suplementação de vitamina E potencializa a ação microbicida de macrófagos e a produção de NO frente à *Salmonella*, tendo assim um papel importante na resposta imune inata de aves. Pode-se concluir ainda, que os macrófagos são as células mais recrutadas para o pulmão na infecção contra o VBI e que essa população pode ser aumentada com suplementação de vitamina E independentemente da dosagem utilizada mostrando assim, ação na resposta imune celular.

### 3.7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a suplementação de vitamina E é importante na avicultura, pois estimula a resposta imunológica das aves.

A vitamina E, quando em altas dosagens (200 UI/Kg) é capaz de potencializar a ação microbicida de macrófagos abdominais frente à cultura de *Salmonella* Enteritidis, auxiliando a resposta imune inata das aves.

A vitamina E, também influencia no número de macrófagos no pulmão de aves vacinadas ou desafiadas com o VBI. Entretanto, não houve interferência desta suplementação na dosagem de NO. Sugere-se, portanto, que os macrófagos são importantes para resposta contra o VBI, porém, deve utilizar outras vias de ação para combater a doença além da produção de óxido nítrico.

## 4 ARTIGO II

### **AÇÃO DA VITAMINA E SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E RENDIMENTO DE CARÇAÇA DE FRANGOS DE CORTE**

#### **VITAMIN E EFFECT ON THE PERFORMANCE AND CARCASS YIELD OF BROILERS**

##### **4.1 RESUMO**

Pintinhos machos da linhagem Cobb (2400) com um dia de vida foram alojados em aviários experimentais na Embrapa - Suínos e Aves. As aves foram divididas em 6 tratamento (T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6) com 10 repetições por tratamento (60 boxes) e 40 aves cada, com densidade animal de 16 aves/m<sup>2</sup>, recebendo diferentes níveis de suplementação de vitamina E até os 42 dias. Os tratamentos foram: T0 – dieta sem suplementação de vitamina E; T1 – baixo nível de vitamina E (50% da dose padrão da indústria – SID ou 17,5 mg/Kg); T2 – dosagem padrão da indústria (dosagem média de vitamina E = 100% ou 35 mg/Kg); T3 – alto nível de vitamina E (200% do SID ou 70 mg/Kg); T4 – nível extra de Vitamina E (400% do SID ou 140 mg/Kg) e T5 – nível de vitamina E para imunomodulação (800% do SID ou 280 mg/Kg). As aves foram avaliadas com 7, 21, 35 e 42 dias de idade quanto ao desempenho zootécnico (peso corporal, ganho de peso, consumo de ração, e conversão alimentar) e rendimento de carcaça quente, fria e congelada, inteira e em cortes (asas, coxas, sobrecoxas, peito, dorso, e gordura abdominal). Com esses testes observou-se que não houve diferença significativa nesses parâmetros avaliados sugerindo que, a suplementação de vitamina E não interfere no desempenho e no rendimento de carcaças de frangos de cortes e que, a quantidade de vitamina E presente nos alimentos basais da dieta seria suficiente para suprir as necessidades fisiológicas das aves.

**Palavras-chave:** nutrição, vitamina E, conversão alimentar, rendimento de carcaça.

## ABSTRACT

One-day-old, male chicks, Cobb (2400) were housed in experimental poultry houses at Embrapa – Suínos e Aves. The birds were divided into 6 treatments (T0, T1, T2, T3, T4, T5, and T6) with 10 replicates per treatment (60 boxes) and 40 birds each, with animal density of 16 birds/m<sup>2</sup> receiving different levels of supplementation of vitamin E up to 42 days of life. The treatments were: T0 - diet without vitamin E supplementation; T1 - low vitamin E (50% standard of industry dosage - SID or 17.5 mg/Kg), T2 - standard of industry dosage (average dose of vitamin E = 100%, or 35 mg/Kg), T3 - high level of vitamin E (SID 200% or 70 mg/Kg), T4 - extra level of vitamin E (SID 400% or 140 mg/Kg), and T5 - the level of vitamin E for immunomodulation (800% SID or 280 mg/Kg). The birds were evaluated at 7, 21, 35 and 42 days of age for the following traits: (body weight, weight gain, feed intake and feed conversion) and hot carcass yield, cold and frozen, whole and cut (wings, thighs, drumsticks, breast, back yield and abdominal fat). With these tests it was observed that there was no significant difference in these parameters evaluated suggesting that supplementation of vitamin E does not affect the performance and yield of broiler carcasses and that, the amount of vitamin E in foods basal diet would sufficient to meet the physiological needs of the birds.

**Keywords:** nutrition, vitamin E, feed conversion, carcass yield

## 4.2 INTRODUÇÃO

A produção avícola brasileira assume papel importante na economia do país. A produção em alta escala é resultado de um aumento de mercado interno e externo. Tentando cumprir essas exigências de produção e qualidade houve uma mudança nas práticas de manejo, nutrição e sanidade a fim de suprir essas necessidades com objetivo central de produzir mais em um menor período de tempo. Muitos são os avanços nesse setor, tendo como resultado atualmente um produto de excelente qualidade, baixo custo em um rápido período de tempo (MAPA, 2013).

Com essa pressão de produção, qualquer interferência interna ou externa no bom desempenho dos lotes poderá prejudicar toda a produção. Pensando que a nutrição está diretamente envolvida com o

desenvolvimento fisiológico das aves, diversos estudos são realizados nesta área com a finalidade de maximizar a produção e alcançar melhores índices zootécnicos. As vitaminas, por exemplo, são essências para um bom desenvolvimento do animal. A vitamina E pode interferir nos índices zootécnicos das aves e na qualidade da carne. Essa vitamina, por apresentar propriedades antioxidantes, pode ser efetiva na redução da oxidação lipídica na carne e seus produtos mantendo as características da carne de frango durante seu congelamento (JENSEN; LAURIDSEN; BERTELSEN, 1998). Os animais não sintetizam essa vitamina, sendo necessária a sua suplementação. As exigências vitamínicas conforme a National Research Council (NRC) de 1994 de 10 mg de vitamina E/Kg de ração estão desatualizadas. Atualmente as indústrias avícolas utilizam dosagens bem maiores do que a preconizada (FÉLIX; MAIORKA; SORBARA, 2009).

Com isso, este trabalho tem como objetivo avaliar se a suplementação de vitamina E, em níveis preconizados e níveis maiores, podem interferir nos parâmetros zootécnicos e também no rendimento de carcaça de frango de corte de 42 dias de idade.

## 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.3.1 Animais

Foram utilizados 2400 pintinhos de um dia, machos, da linhagem Cobb alojados em aviários experimentais da Embrapa em Concórdia/SC em condições similares as de campo, com temperatura ambiente controlada.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais CEUA/CNPSA conforme protocolo de aprovação número 013/2012 aprovado em 23/08/2012.

Esse experimento foi realizado e financiado pela Embrapa-Suínos e Aves em Concórdia – SC. As aves receberam diferentes níveis de suplementação de vitamina E acrescidos na ração a base de milho e farelo de soja conforme proposto por Rostagno et al. (2011), e suplementadas com calcário e DICAL-fosfato a fim de alcançar os níveis desejados de cálcio e fósforo. Óleo de soja, aminoácidos sintéticos, premix mineral, sal e cloreto de colina também foram adicionados a ração. A vitamina E foi adicionada nas dietas antes do procedimento de mistura. Alfa-tocoferol foi a fonte de vitamina E e previamente pré-misturada com farinha de milho para assegurar uma



melhor homogeneidade. Dados de composição de matéria-prima foi extraído a partir das tabelas brasileiras para Aves e Suínos, Rostagno et al. (2011) e comparados com os resultados obtidos das análises laboratoriais. A ração foi produzida sob a forma de pellets. Alimento e água fornecidos *ad libitum*.

### 4.3.2 Tratamentos

Este experimento foi composto de blocos ao acaso com 6 tratamentos (T0, T1, T2, T3, T4 e T5), com 10 repetições por tratamento (60 boxes) e 40 aves cada, correspondentes a uma unidade experimental, com densidade animal de 16 aves/m<sup>2</sup>, sendo o T0 – dieta sem suplementação de vitamina E; T1 – baixo nível de vitamina E (50% da dose padrão da indústria – SID ou 17,5 mg/Kg); T2 – dosagem padrão da indústria (dosagem média de vitamina E = 100% ou 35 mg/Kg); T3 – alto nível de vitamina E (200% do SID ou 70 mg/Kg); T4 – nível extra de Vitamina E (400% do SID ou 140 mg/Kg) e T5 – nível de vitamina E para imunomodulação (800% do SID ou 280 mg/Kg). Dados representados na Tabela 3, utilizando a dosagem padrão utilizada na indústria (SID), que é medida em mg/Kg que é a mesma coisa que UI/Kg.

Tabela 3 - Resumo dos níveis dietéticos de vitamina E (mg/Kg) de acordo com estágio de desenvolvimento das aves.

Tratamento	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Terminação	SID*
<b>T0</b>	0	0	0	0	0
<b>T1</b>	17,5	5	12,5	9	0
<b>T2</b>	35	0	25	18	00
<b>T3</b>	70	0	50	36	00
<b>T4</b>	140	0	100	72	00
<b>T5</b>	280	0	200	144	00
		40			00

Legenda: SID (Standard Industrial Dosage). Fonte: Próprio autor.

### **4.3.3 Vacina**

Para a vacinação foi utilizada vacina comercial (estirpe H120) viva atenuada. A vacina foi titulada e administrada na dose  $10^{3,5}$  DIE<sub>50</sub>, via óculo-nasal, no décimo quarto dia de vida.

### **4.3.4 ANÁLISES**

#### **4.3.4.1 Desempenho zootécnico**

Durante todo o experimento as aves e a ração consumida foram pesadas por amostragem (10%) para avaliar a média de peso corporal, consumo de ração, ganho de peso e a conversão alimentar.

Esses parâmetros foram avaliados pesando as aves individualmente aos 21 e 42 dias, sendo esta última data o final do experimento.

#### **4.3.4.2 Rendimento de carcaças**

No 42º dia, três ou cinco animais por repetição serão sacrificados (10% do grupo de animais), com base no peso corporal médio, para avaliação do rendimento de carcaça. Após o abate aos 42 dias as carcaças foram avaliadas de acordo com o rendimento de carcaça quente (30-35°C), fria (4-7°C) e congelada (0-3°C), feito através da pesagem das mesmas e o valor expresso em porcentagem. E, também, avaliadas quanto ao rendimento dos cortes específicos em frangos de corte como: rendimento de asas, coxas, sobrecoxas, peito, dorso e gordura abdominal.

### **4.4 ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados usando o procedimento GLM SAS (2008), para a análise de variância e as médias foram submetidas à análise de regressão e / ou teste t.

## 4.5 RESULTADOS

**4.5.1 Desempenho zootécnico (peso corporal, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar)**

Avaliando os índices de desempenho zootécnico, pode-se observar uma ótima conversão alimentar das aves independentes dos tratamentos envolvidos, evidenciando a qualidade do experimento. Entretanto, não foi possível observar, nessas condições experimentais, diferença significativa para os parâmetros peso corporal, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, avaliados nos períodos de 21 e 42 dias de vida, mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Peso Corporal (PC), Consumo de Ração (CR), Ganho de Peso Corporal (GPC) e Conversão Alimentar (CA) (g) (Média ± Erro Padrão) de Frangos de Corte, Cobb, Machos do primeiro aos 21 e 42 dias de idade.

<b>1</b>	<b>PC</b>	<b>PC</b>	<b>CR 1</b>	<b>CR 1</b>	<b>GPC</b>	<b>GPC</b>	<b>CA 1</b>	<b>CA 1</b>
	<b>21d</b>	<b>42d</b>	<b>a 21d</b>	<b>a 42d</b>	<b>1 a</b>	<b>1 a</b>	<b>a 21d</b>	<b>a 42d</b>
					<b>21d</b>	<b>42d</b>		
<b>0</b>	1055 ±6.4	2989 ±11.5	1348 ±8.3	4774 ±17.4	1008 ±6.3	2943 ±11.7	1.344± 0.004	1.627± 0.003
<b>50</b>	1060 ±6.6	2990 ±11.8	1330 ±11	4742 ±15.9	1014 ±6.3	2944 ±11.7	1.320± 0.013	1.621± 0.004
<b>100</b>	1054 ±8.0	2971 ±20.7	1340 ±13.3	4724 ±24.4	1010 ±8.8	2926 ±20.7	1.337± 0.006	1.627± 0.005
<b>200</b>	1067 ±8.6	2999 ±23.5	1357 ±10.1	4754 ±32.2	1020 ±8.6	2953 ±23.8	1.339± 0.003	1.627 ±0.005
<b>400</b>	1055 ±8.9	2988 ±15.4	1351 ±9.6	4755 ±23.5	1009 ±8.1	2942 ±14.7	1.347± 0.005	1.623± 0.003
<b>800</b>	1058 ±8.3	3002 ±11.4	1348 ±7.8	4741 ±24.1	1012 ±8.4	2955 ±11.6	1.341± 0.008	1.616± 0.004
<b>Pro</b>	0.73	0.81	0.37	0.73	0.79	0.84	0.12	0.29
<b>b&gt;F</b>								
<b>CV,</b>	2.28	1.69	2.37	1.53	2.37	1.71	1.75	0.81
<b>%</b>								

Não apresentou efeito significativo ( $P>0.05$ ). Fonte: Próprio autor.

#### 4.5.2 Rendimento de carcaças

Para os parâmetros de rendimento de carcaças em diferentes temperaturas (quente, fria e congelada) após o abate (42 dias), não houve diferença significativa (Tabela 5). O rendimento das carcaças não foi influenciado pela temperatura e suplementação da vitamina E

Quanto ao rendimento dos cortes de carne de frango, foi possível notar diferença significativa nos cortes de sobrecoxas nos grupos tratados com 100, 400 e 800% de vitamina E, mostrado na Tabela 6. Nessa variável analisada, houve um melhor rendimento no corte de peito dos grupos tratados com 100% que é a dose padrão (35 mg/Kg), com 400% a mais de vitamina E (140 mg/Kg) e com 800% a mais de vitamina E (280 mg/Kg) em comparação com os demais. Em relação aos outros parâmetros avaliados, não foi possível notar diferença significativa nessas condições experimentais, nos períodos de 21 e 42 dias de vida.

Tabela 5 - Rendimento de carcaça quente (RCQ), rendimento carcaça fria (RCF) e rendimento carcaça congelada (RCC) (%) (Média  $\pm$  Erro Padrão) de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Nível de Vitamina E	RCQ 42d	RCF 42d	RCC 42d
<b>0</b>	78.24 $\pm$ 0.42	79.20 $\pm$ 0.42	76.45 $\pm$ 0.41
<b>50</b>	78.24 $\pm$ 0.50	78.98 $\pm$ 0.51	76.34 $\pm$ 0.57
<b>100</b>	78.44 $\pm$ 0.25	79.39 $\pm$ 0.30	76.53 $\pm$ 0.28
<b>200</b>	78.71 $\pm$ 0.31	79.71 $\pm$ 0.31	76.97 $\pm$ 0.41
<b>400</b>	78.19 $\pm$ 0.29	79.17 $\pm$ 0.31	76.39 $\pm$ 0.29
<b>800</b>	78.08 $\pm$ 0.38	78.96 $\pm$ 0.42	76.26 $\pm$ 0.37
<b>Prob &gt; F</b>	0.7174	0.5892	0.684
<b>CV %</b>	1.443	1.506	1.605

Não apresentou efeito significativo ( $P > 0.05$ ). Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 - Rendimento asas (RA), rendimento coxas (RC), rendimento sobrecoxas (RS), rendimento peito (RP), rendimento dorso (RD) e gordura abdominal (GA) (%) (Média ± Erro Padrão) de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Nível de Vitamin a E	RA 42d	RC 42d	RS 42d	RP 42d	RD 42d	GA 42d
<b>0</b>	9.810±0.08 3	12.72±0.1 4	17.99±0.1 7 ab	36.52±0.2 5	20.49±0.1 5	1.616±0.11 3
<b>50</b>	9.777±0.10 9	12.76±0.0 9	17.76±0.2 1 ab	36.74±0.4 5	20.61±0.2 0	1.662±0.15 2
<b>100</b>	9.736±0.09 9	12.74±0.0 9	18.28±0.2 2 a	36.32±0.3 1	20.57±0.1 2	1.699±0.07 4
<b>200</b>	9.727±0.11 3	12.60±0.1 4	17.97±0.1 6 ab	36.76±0.3 3	20.64±0.2 2	1.511±0.16 0
<b>400</b>	9.881±0.07 3	12.79±0.1 2	18.29±0.1 2 a	36.04±0.3 2	20.68±0.1 5	1.614±0.11 4
<b>800</b>	10.03±0.12	12.66±0.1 5	17.41±0.1 5 b	36.98±0.2 5	20.57±0.1 6	1.708±0.11 0
<b>Prob &gt; F</b>	0.2465	0.9023	0.0081	0.3787	0.9794	0.8203
<b>CV %</b>	3.305	3.025	3.430	2.820	2.504	23.285

Médias seguidas por diferentes letras na coluna são estatisticamente diferentes baseadas no teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Próprio autor.

#### 4.6 DISCUSSÃO

O uso de vitamina E na alimentação de frangos de corte, em níveis mais altos que o recomendado tem se tornado uma prática rotineira. Os benefícios trazidos por essa vitamina antioxidante tanto no desempenho zootécnico como no rendimento de carcaça tem sido mostrado em vários trabalhos (FÉLIX; MAIORKA; SORBARA, 2009).

Estudo realizado por Barreto; Ferreira e Moraes (1999), utilizando níveis crescentes de vitamina E (25 a 750 mg/Kg) na dieta de frangos de corte, observaram aumento de peso corporal conforme

aumento da dosagem de vitamina E. Da mesma forma, o trabalho feito por Raza et al. (1997) avaliando o desempenho de frangos de corte até 49 dias de idade suplementados com níveis abaixo, normal e acima do exigido e verificaram uma melhora na conversão alimentar e maior ganho de peso corporal nas aves suplementadas com 300 mg de vitamina E/Kg quando comparadas com as que receberam quantidades normais desta vitamina (20 mg/Kg). Além disso, Blum et al. (1992), analisando desempenho de frangos de corte machos sexados suplementados com níveis de vitamina E (20, 40, 80 e 160 mg/Kg), observaram melhores taxas de crescimento em machos suplementados com 40 e 80 mg/Kg quando comparadas com fêmeas que não apresentaram diferença no ganho de peso.

Esses trabalhos divergem dos resultados encontrados nesse presente estudo. Pode-se observar que a vitamina E não influenciou nos parâmetros avaliados para desempenho zootécnico e tão pouco para rendimento de carcaça em frangos de cortes machos, apesar de apresentar uma ótima conversão alimentar. Resultado semelhante foi encontrado por Souza et al. (2006), que com o objetivo de avaliar a influência de níveis de vitamina E sobre o desempenho e qualidade da carne de frangos de corte, analisou frangos de corte, machos, da linhagem Cobb, recebendo suplementação de 100, 150 e 200 mg/Kg de vitamina E e verificou que não houve interferência desta vitamina nos índices produtivos e nas características de carcaças avaliadas.

Outro aspecto importante constatado nesse experimento foi que, a suplementação com vitamina E abaixo e acima dos níveis normais não afetou diretamente o peso e consumo de ração dos frangos de corte, nem com o rendimento de carcaças inteiras ou dos cortes específicos analisados. Esses resultados sugerem que a suplementação desta vitamina não interfere nas variáveis analisadas de desempenho e rendimento de carcaça e que, a quantidade de vitamina E presente nos alimentos basais da dieta seria o suficiente para suprir as necessidades básicas das aves. Esses resultados foram relatados também por Niu et al. (2009), os quais não observaram diferença significativa de peso e consumo de ração em aves suplementadas com 100 e 200 mg/Kg de vitamina E. Entretanto, as aves apresentaram uma melhor conversão alimentar quando suplementadas com 100 mg/Kg de vitamina E.

A par disso, alguns trabalhos têm encontrado resultados semelhantes ao encontrado neste experimento. Estudo feito por Toledo et al. (2006), utilizando dosagens de 10, 20 e 30 mg/Kg de vitamina E como suplementação na dieta das aves, não encontraram diferença

significativa de desempenho nas aves avaliadas, sugerindo que as doses de vitamina E abaixo dos valores médios preconizados não interferem no desempenho produtivo das aves.

De maneira semelhante, Oliveira (2009) utilizando suplementação com nutracêutico e vitamina E (25 e 225 mg/Kg) não encontrou diferença no desempenho e nos parâmetros morfométricos intestinais de frangos de cortes. Outro trabalho realizado em frangos de corte suplementados com 16, 110 e 220 mg/Kg de vitamina E, avaliados com 3, 5 e 7 semanas de idade, não verificou diferença no ganho de peso das aves (KONJUFCA et al., 2004).

No entanto, estudo feito por Chung e Boren (1999), utilizando suplementação de vitamina E, constataram que as aves que receberam 240 mg/Kg desta vitamina apresentaram melhor conversão alimentar em relação ao grupo controle as quais receberam 33 mg/Kg de vitamina E. Um trabalho realizado por Silva (2009), utilizando vários níveis de suplementação de vitamina E (30, 65 e 100 mg/Kg) na dieta de frangos vacinados contra coccidiose, verificou que as aves vacinadas e suplementadas com 65 mg/Kg de vitamina E, mostraram melhor ganho de peso total e conversão alimentar bem como, melhores índices de imunidade.

Contudo ocorrem divergências entre as melhores dosagens, sugerindo que interferências extrínsecas de fatores ambientais e alimentares, e intrínsecas do próprio organismo do animal, sejam responsáveis por essa disparidade de resultados vistos em diversos estudos.

#### 4.7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que não houve diferença no desempenho e no rendimento de carcaça em frangos de corte, machos, suplementados com diferentes níveis de vitamina E. Sugerem também que a quantidade de vitamina E presente nos alimentos basais de uma dieta a base de soja e milho para frangos de corte, seria o suficiente para suprir as necessidades básicas das aves.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propósito deste trabalho foi de constatar a influência da vitamina E na resposta imunológica das aves bem como no desempenho zootécnico e também avaliar a melhor dosagem de suplementação que beneficiaria as aves nestes aspectos. E, ainda, juntamente com essa suplementação avaliar a resposta mediada por células ocasionada pelo VBI, uma doença de extrema importância para o setor avícola.

Resultados positivos sobre a interferência da vitamina E na resposta imunológica de aves foram observados, e de uma maneira mais significativa na resposta imune inata. Ressaltando assim, a importância deste micronutriente na avicultura, uma vez que a capacidade imunológica das aves está diretamente relacionada ao bom desenvolvimento e desempenho dos animais.

Foi verificado que a imunidade celular está totalmente envolvida no processo de combate contra o VBI, e que os macrófagos assumem papel importante nesta batalha. Assim, sugerem-se mais pesquisas nesta área a fim de descobrir o real funcionamento da resposta do sistema imunológico das aves frente ao VBI.

Em relação ao desempenho zootécnico e rendimento de carcaça não foi possível verificar interferência da vitamina E em nenhum dos parâmetros avaliados, mesmo em dosagens inferiores a preconizada. Isso induz um questionamento interessante de que, nessas condições experimentais, talvez a quantidade de vitamina E presente nos grãos que compõe a dieta básica das aves poderia ser suficiente para suprir as necessidades fisiológicas que interferem nessas variáveis analisadas. Esse pensamento seria inovador e digno de mais estudos para ser concluído.

Analisando os resultados deste experimento em conjunto com a literatura, pode-se concluir que a vitamina E é um suplemento extremamente importante para as aves, pois foram observados resultados satisfatórios para imunidade também encontrada por outros autores. Entretanto muito ainda deve ser estudado a fim de verificar a melhor dosagem para essa suplementação, e também para tentar esclarecer a enorme diferença encontrada entre as dosagens relatadas na literatura.



## 6 REFERÊNCIAS

### 6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ARTIGOS

BARRETO S. L. T., FERREIRA W. M.; MORAES T. Efeito de níveis de vitamina E na dieta sobre o desempenho e concentração de  $\alpha$ -tocoferol na carne de frangos de corte, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 4, p. 387-392, 1999.

BEIRÃO, C. B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo**. 2011. 135f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2011.

BLUM, J.C. Effect of dietary vitamin E supply in broilers, male and female growth rate, viability, immune response, fat content and meat flavor variations during storage, **Archiv Fur Geflugelkunde**, v.56, p.37-42, 1992.

BOWEN, O. T. et al. Variation in the pulmonary hypertensive responsiveness of broilers to lipopolysaccharide and innate variation in nitric oxide production by mononuclear cells, **Poultry Science**, v. 85, p. 1349-1363, 2006.

CHAMIZO, C.; RUBIO, J.M.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative análise of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.83, p.191-202, 2001.

CHAPMAN, M. E.; WIDEMAN, R. F. Jr. Evaluation of Total Plasma Nitric Oxide Concentrations in Broilers Infused Intravenously with Sodium Nitrite, Lipopolysaccharide, Aminoguanidine, and Sodium Nitroprusside. **Poultry Science**, v.85, p. 312-320, 2006.

CHUNG, T. K.; BOREN, B. Vitamin E use in commercial flocks examined, **Feedstuffs**, v.71, n.6, p.11-14, 1999.

COLLISSON, E. W. et al. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental; Comparative Immunology**, v.24, p. 187-200, 2000.

COOK, M. E. Nutrition and the immune response to the domestic fowl. **Critical Reviews in Poultry Biology**, v.3, p. 167–189, 1991.

DESIDERIO, J. V.; CAMPBELL, S. G. Intraphagocytic killing of *Salmonella typhimurium* by liposome-encapsulated cephalothin. **Journal of Infectious Diseases**, v.148. n.3, p.563-570, 1983.

FÉLIX, A. P.; MAIORKA, A.; SORBARA, J. O. B. Níveis vitamínicos para frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 2, p. 619-626, 2009.

FRANCHINI, A., et al. Vitamin E as adjuvant in emulsified vaccine for chicks. **Poultry Science**, v.70, p.1709–1715, 1991.

FRANCHINI, A., et al. Vitamin E in viral inactivated vaccines. **Poultry Science**, v.74, p.666–671, 1995.

GORE, A. B.; QURESHI, M. A Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure **Poultry Science**, v.76, p. 984–991, 1997.

GREEN, L. C. et al. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v.212, p. 56-8, 1981.

HE, H.; GENOVESE, K. J.; KOGUT, M. H. Modulation of chicken macrophage effector function by Th1/Th2 cytokines, **Cytokine**, v.53, p. 363-369, 2011.

HIGGINS, S. E. et al. Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage number and phagocytosis of *Salmonella* Enteritidis by abdominal exudate cells, **Poultry Science**, v. 86, p. 2315-2321, 2007.

HUSSAIN, I.; QURESHI, M.A. Nitric oxide synthase and mRNA expression in chicken macrophages, **Poultry Science**, v.76, p.1524-1530, 1997.

JENSEN, C.; LAURIDSEN, C.; BERTELSEN, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry, **Trends in Food Science e Technology**, v. 9, p. 62-72, 1998.

KIDD, M. T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v.83, n.4, p.650-657, 2004.

KLASING, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, n.8, p.1119-1125, 1998.

KONJUFCA, V. K. et al. Influence of dietary vitamin E on phagocytic functions of macrophages in broilers. **Poultry Science**, v.83, p.1530-1534, 2004.

LESHCHINSKY, T. V.; KLASING, K.C. Relationship between the level of dietary vitamin E and immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, v.80, p.1590-1599, 2001.

MAST, J. et al. Characterization of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.61, n.2-4, p.343-357, 1998.

NASCIMENTO, B.; COMERLATO, J.; SPILKI, F. R. Detecção molecular de vírus da bronquite infecciosa em plantéis de avós, matrizes e frangos de corte no Rio Grande do Sul e Mato Grosso. **Ciência Rural**, v.43, n.3, mar, 2013.

National Research Council. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9 ed. Washington: National Academic Press; 1994.

NIU, Z.Y. et al. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. **Poultry Science**, v.88, p.2101-2107, 2009.

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Avian Infectious Bronchitis**. 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em 10 set. 2010.

OLIVEIRA, R. S. **Suplementação de nutracêutico (LECIPALM®) e vitamina E para frangos de corte: desempenho zootécnico e metabolismo.** 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PEI J. et al. Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness, **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v.21, p. 1071-1077, 2001.

PEI, J.; BRILES, W. E.; COLLISSON, E. W. Memory T cells protect chicks from acute infectious bronchitis vírus infection, **Virology**, v. 306, p. 376-384, 2003.

QURESHI, M. A. Avian macrophage and immune response: An overview, **Poultry Science**, v. 82, p. 691-698, 2003.

RAJ, G. D; JONES R. C. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broiler chickens of a variant infectious bronchitis virus of economic importance, **Avian Pathology**, v.25, n.3, p.481-501, 1996.

RAZA, F. K. et al. Effect of vitamin E deficiency and excess on immune system of broiler chickens, **International Journal of Animal Science**, v. 12, p. 39-41, 1997.

ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais.** 3ed. Viçosa: UFV-DZO, 2011. 252p.

SABET, T. et al. A simple method for obtaining peritoneal macrophages from chickens. **Journal of Immunological Methods**, v.14, p.103-110, 1977.

SILVA, I. C. M. **Resposta imune e desempenho de frangos de corte submetidos a variações dietéticas de vitamina E e selênio.** 2009. 176f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SOUZA, P. A. et. al.; Efeito da suplementação de vitamina E no desempenho e na qualidade da carne de frangos de corte. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 87 – 94, 2006

TENGERDY, R. P.; BROWN, J. C. Effect of vitamin E and A on humoral immunity and phagocytosis of Escherichia coli infected chickens, **Poultry Science**, v. 56, p.957–963, 1977.

TOLEDO, G.S. et al. Níveis das vitaminas A e E em dietas de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade, **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.624-629, 2006.

TORO H. Infectious bronchitis virus: dominance of ArkDPI-type strains in the United States broiler industry during the last decade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.12, n.2, p.79-86, 2010.

TREMBICKI, K. A. et al. Avian peritoneal exudate cells: a comparison of stimulation protocols. **Developmental; Comparative Immunology**, v.8, 1984.

## 6.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMANN, A. H. Citocinas. In: **Imunologia celular e molecular**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap. 11. p. 251-282.

ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde Aviária e Doenças**. Ed. Roca, São Paulo, 2006, 341p.

ASSAYAG, M. S. J. **Características Patogênicas e Moleculares de Variantes Brasileiras do Vírus de Bronquite Infecciosa Inoculados em Aves Comerciais e SPF**. 2009. Doutorado (Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BACK, A. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: **Manual de Doenças de Aves**. Cascavel: Integração, 2010. p.35-39.

BERNARDINO, A. Programas de Vacinação. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. A; MACARE, M. **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: FACTA, 2004.

BOA-AMPONSEM, K. et al. Vitamin E and immune responses of broiler pureline chickens, **Poultry Science**, v. 79, p.466-470, 2000.

CARON, L. F. O sistema imune das aves e a resposta às vacinações. In: CURSO DE SANIDADE AVÍCOLA, Jaguariúna, SP. **Anais...** Jaguariúna: 2008.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus **Veterinary Research**, v. 38, p. 281–297, 2007.

CAVANAGH, D. Structural polypeptides of coronavirus IBV. **Journal of General Virology** v. 53, p. 93-103, 1981.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; COOK, J. K. A. Infectious bronchitis vírus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathology**, v.21, p.401-403, 1992

CAVANAGH, D.; NAQI, S.A. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, H.W. **Disease of poultry**, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, p. 511–526, 1997.

CHEW, B.P. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, n.3, p.103-114, 1996.

COLLISSON, E. W. et al. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental; Comparative Immunology**, v.24, p. 187-200, 2000.

DI FABIO, J. et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v.44, p.582-589, 2000.

- DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.283-300.
- ERF, G. F. Cell-Mediated Immunity in Poultry. **Poultry Science**, v.83, p. 580-590, 2004.
- ERF, G. F. et al. Effects of dietary vitamin E on the immune system of broilers: Altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. **Poultry Science**, v.77, p. 529-537, 1998.
- FÉLIX, A. P.; MAIORKA, A.; SORBARA, J. O. B. Níveis vitamínicos para frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 2, p. 619-626, 2009.
- FRANCHINI, A., et al. Vitamin E as adjuvant in emulsified vaccine for chicks. **Poultry Science**, v.70, p.1709–1715, 1991.
- FRANCHINI, A., et al. Vitamin E in viral inactivated vaccines. **Poultry Science**, v.74, p.666–671, 1995.
- FRIEDMAN, A., BARTOV, I. and SKLAN, D. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey, **Poultry Science**, v.77, p. 956-962, 1998.
- FRIGG, M. Effects of dietary vitamin E supplies in broilers. Evaluation of parameters related to oxidative stability of broiler meat, **Nutrition Abstract**, v.22, p.24-30, 1990.
- GORE, A. B. e QURESHI, M. A. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure, **Poultry Science**, v.76, p. 984–991, 1997.
- JENSEN, C.; LAURIDSEN, C.; BERTELSEN, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry, **Trends in Food Science e Technology**, v. 9, p. 62-72, 1998.
- KHAN, R. U. et al. Immunomodulating effects of vitamin E in broilers, **World's Poultry Science Journal**, v. 68, p. 31-40, 2012.

KIDD, M. T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v.83, n.4, p.650-657, 2004.

KLASING, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, n.8, p.1119-1125, 1998.

KONJUFGA, V. K. et al. Influence of dietary vitamin E on phagocytic functions of macrophages in broilers. **Poultry Science**, v.83, p.1530-1534, 2004.

KREUTZ, L. C. Resposta imunológica contra vírus. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Ed da UFSM, 2007. cap. 9. p.237-261.

LESHCHINSKY, T. V.; KLASING, K.C. Relationship between the level of dietary vitamin E and Immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, v.80, p.1590-1599, 2001.

MCDOWELL, L. R. Vitamin E. In: *Vitamins in animal nutrition: Comparative aspects to human nutrition*. San Diego, CA.: Academic Press; 1989. p. 93-131

MONTASSIER, H. J. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.12, no.2, p. 87-96, 2010.

MONTASSIER, M. F. S. **Diversidade Genética de Amostras Brasileiras do Vírus da Bronquite Infeciosa Determinada pelo Sequenciamento de Nucleotídeos dos Genes N e S<sub>1</sub>**. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MORGULIS, M. S. Imunologia Aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLEZ, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 231-245. 2002.

National Research Council. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9 ed. Washington: National Academic Press; 1994.



NIU, Z.Y. et al. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. **Poultry Science**, v.88, p.2101-2107, 2009.

PEI J. et al. Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness, **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v.21, p. 1071-1077, 2001.

POWELL, P. C. Immune mechanisms in diseases of poultry. **Veterinary Immunology & Immunopathology**, v. 15, p. 87-113, 1987.

QURESHI, M. A. Avian macrophage and immune response: An overview, **Poultry Science**, v. 82, p. 691-698, 2003.

RITCHIE, B.W. Viral attack and avian response. In: **Avian Viruses: Function and Control**. 1995.

RUTZ, F.; LIMA, G. J.M.M. Uso de antioxidantes em rações e subprodutos. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas; 1994; Campinas, São Paulo. Brasil. p.73-84.

SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poultry Science**, v.83, p.574-579, 2004.

SHARMA, J.M., Section ed. **Avian Immunology**. In: P.P. Pastoret, P. Griebel, H. Bazin, A. Govaats, eds. 1998. In: Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press. pp73-136.

SIDDEL, S.; WEGE, H.; MEULEN, V. T. The biology of coronaviruses. **Journal of General Virology**, v.64, n.4, p.761-776, 1983.

STERN, D. F.; SEFTON, B. M. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus proteins. **Journal of Virology**, v.44, n.3, p.794-803, 1982.

SURAI, P. F. **Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction**. 1 ed. Nottingham University Press, Nottingham, 2002.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo, Roca, 1998.

TOLEDO, G. S. et al. Níveis das vitaminas A e E em dietas de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.624-629, 2006.

TREVISOL, I. M.; JAENISCH, F. B. Bronquite Infecciosa das galinhas: Crise atual. **Avicultura Industrial**. Nº3, p. 14-20. 2010.

União Brasileira de Avicultura – **UBABEF**. Relatório Anual 2010/2011.

VILLARREAL, L. Y. B. et al. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. **Avian Diseases**, v.51, p.974-978, 2007.