

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**A INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA
E E SELÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y (IGY) NO
SORO DE POEDEIRAS LEVES VACINADAS CONTRA *ESCHERICHIA COLI* E
ENCEFALOMIELITE AVIÁRIA**

GISELLE KINDLEIN
Médica Veterinária (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau
de Mestre em Zootecnia
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Área de Concentração - Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio, 2002.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Agronomia, da UFRGS, pela oportunidade de realizar o curso.

À orientadora e professora Andréa Machado Leal Ribeiro, que com o seu exemplo profissional e humano, foi fundamental para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao professor Cláudio Wageck Canal, pois seus conhecimentos de Imunologia tornaram este trabalho viável.

Aos demais professores do Curso.

A todos os colegas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, pela acolhida tão amigável, em especial à bolsista Marisa Macagnan, que me auxiliou nas análises laboratoriais.

A todos os colegas do Laboratório de Ensino Zootécnico – LEZO, em especial à bolsista Maitê Vieira, que participou ativamente de todo o trabalho, sempre atenta e encontrando boas soluções em meio a tantos cálculos e diluições.

À AVIPAL, pelo fornecimento das aves e ingredientes das rações.

Ao IRFA, pelo fornecimento das vacinas contra colibacilose.

À Fort Dodge, pelo fornecimento das vacinas contra encefalomielite aviária.

À Nutron, pelo fornecimento da vitamina E e do selênio.

À Roche, pelas análises para quantificação da vitamina E.

Aos familiares e amigos, força e razão para continuar e querer sempre mais.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram em mais esta etapa.

A Deus, por ter tão pouco a pedir e tanto a agradecer!

A INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA E E SELÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y (IGY) NO SORO DE POEDEIRAS LEVES VACINADAS CONTRA *ESCHERICHIA COLI* E ENCEFALOMIELEITE AVIÁRIA¹

Autora: Giselle Kindlein

Orientadora: Andréa Machado Leal Ribeiro

RESUMO

Foram estudados os efeitos da suplementação de vitamina E (VE) e selênio (Se) sobre a imunidade de galinhas vacinadas contra *Escherichia coli* (EC) patogênica para suínos e com o vírus da encefalomyelite aviária (VEA). Foram avaliados peso corporal (PC), peso de ovos (PO) e produção de anticorpos (AcP) em noventa poedeiras (H&N nick chick) com 49 semanas de idade alimentadas à vontade com dietas suplementadas com 0, 50, 150, 250 e 250 UI VE/kg + 0,3 ppm de Se. Às 51 semanas de idade, metade das galinhas foram vacinadas contra EC e todas as aves foram vacinadas contra VEA. Duas semanas após, receberam uma segunda dose da vacina contra EC. Amostras de sangue foram coletadas semanalmente e a quantidade de IgY foi determinada por ELISA, como densidade óptica (DO). As aves vacinadas apresentaram maior DO do que as aves não vacinadas ($P \leq 0,05$). As DO foram significativamente aumentadas ($P \leq 0,05$) quando as aves vacinadas foram alimentadas com 50 e 150 UI de VE/kg e comparadas com as DO das aves que receberam a dieta de 250 UI de VE + Se. Se não afetou AcP, PC e PO. A vacinação e a VE suplementada não afetaram PC. O PO não foi afetado pela vacinação, mas foi maior ($P \leq 0,05$) nas semanas 3, 5 e 7, quando as poedeiras receberam 250 UI VE/kg e comparados com aquelas que receberam 50, 150 e 0. A AcP contra VEA foi influenciada pela VE ($P \leq 0,13$). Cento e cinquenta UI VE e 0 UI VE aumentaram IgY produzida, quando comparados a 250 UI. Também o Se aumentou AcP. Os resultados deste estudo sugerem que níveis médios de VE aumentam a produção de IgY por poedeiras vacinadas e Se adicionado ao mais alto nível de VE também possui efeito imunomodulador.

¹Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98 p.) Maio, 2002.

INFLUENCE OF FEEDING DIFFERENT LEVELS OF VITAMIN E AND SELENIUM ON SERUM IMMUNOGLOBULIN Y (IGY) PRODUCTION BY LAYERS VACCINATED AGAINST *ESCHERICHIA COLI* AND AVIUM ENCEPHALOMYELITIS VIRUS¹

Author: Giselle Kindlein

Adviser: Andréa Machado Leal Ribeiro

ABSTRACT

The effects of vitamin E (VE) and selenium (Se) supplementation on immunity of hens vaccinated with *Escherichia coli* (EC) pathogenic for swines and avian encephalomyelitis virus (AEV) was studied. Body weight (BW), egg weight (EW) and antibody production (AbP) were evaluated in ninety 49 week old H&N nick chick hens fed *ad libitum* diets supplemented with 0 (control), 50, 150, 250 and 250 IU VE/kg + 0,3 ppm Se. At 51 wks of age, half of the hens were vaccinated against EC and all birds were vaccinated against AEV. Two weeks later birds received a second dose of EC vaccine. Blood samples were collected weekly and IgY was analysed by ELISA, as optical density (OD). Challenged birds presented greater OD on serum than unchallenged ones ($P \leq 0,05$). OD was significantly increased ($P \leq 0,05$) when vaccinated hens were fed 50 and 150 IU of VE/kg compared with 250 IU + Se. Se did not affect AbP, BW and EW. Neither vaccination nor VE supplementation affected BW. EW was not affected by vaccination, but was heavier ($P \leq 0,05$) on wks 3, 5 and 7 when layers received 250 IU VE/kg compared to 50, 150 and control, respectively. AbP against AEV was influenced by VE ($P \leq 0,13$). 150 IU VE and control enhanced IgY compared to 250 IU. Also Se enhanced AbP. The results of this study suggest that medium levels of VE supplementation enhance IgY production by challenged layer hens and Se added to a high level of VE also has an immunomodulatory effect.

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (98 p.) May, 2002.

SUMÁRIO

	Página
Capítulo I	
1. INTRODUÇÃO (GERAL) E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Conceitos básicos em imunologia.....	6
1.2. Estrutura e funções gerais da vitamina E.....	9
1.3. Função da vitamina E no sistema imune.....	10
1.4. Função do selênio sobre o sistema imune.....	16
1.5. Vitamina E na resposta imune contra <i>Escherichia coli</i>	18
1.6. <i>Escherichia coli</i> como patógeno para aves.....	20
1.7. Vitamina E: desempenho produtivo das aves e produção de imunoglobulinas.....	22
1.8. Encefalomielite aviária.....	23
1.9. Imunização das aves.....	25
1.10. <i>Escherichia coli</i> como patógeno para suínos.....	29
1.11. Imunização passiva: uso preventivo e terapêutico da IgY.....	30
Capítulo II	
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4. CONCLUSÕES.....	56
Capítulo III	
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	58
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
3. APÊNDICES.....	65

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Capítulo II	
1.Peso médio (PM) (g) e desvio-padrão (DP) (g) por tratamento no início do experimento.....	38
2.Composição de ingredientes e composição nutricional calculada da ração basal.....	39
3. Níveis de VE e Se das dietas experimentais.....	41
4.Cronograma experimental.....	43
5.Densidade ótica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves vacinadas e não vacinadas contra <i>E. coli</i> em função da data de coleta.....	47
6.Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) na densidade ótica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves vacinadas e não vacinadas contra <i>E. coli</i>	49
7.Densidade ótica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves na primeira coleta.....	50
8.Efeito da vacinação contra <i>E. coli</i> no peso médio das aves (g) ao longo do período experimental.....	51
9.Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) no peso médio das aves (g) ao longo do período experimental.....	52
10.Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) sobre o peso médio dos ovos (g) ao longo do período experimental.....	53
11.Efeito da vacinação contra <i>E. coli</i> no peso médio dos ovos (g) ao longo do período experimental.....	54
12.Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) sobre a densidade ótica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves vacinadas contra encefalomielite aviária na Coleta 4.....	55

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
Capítulo II	
GRÁFICO 1. Títulos dos soros das aves vacinadas e não vacinadas contra <i>Escherichia coli</i> na coleta 4.....	51
GRÁFICO 2. Títulos dos soros das aves vacinadas contra encefalomielite aviária nas coletas 1 e 4.....	55

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C.....	Graus centígrados
µL.....	microlitro
Ac(s).....	Anticorpo(s)
Ag(s).....	Antígeno(s)
APEC.....	Escherichia coli patogênica para aves
C.V.....	Coeficiente de variação
DO.....	Densidade ótica
DP.....	Desvio-padrão
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA.....	Encefalomielite aviária
EM.....	Energia metabolizável
g.....	grama
GSH.....	Glutathione
GSH-Px.....	Glutathione peroxidase
Ig(s).....	Imunoglobulina(s)
Kcal.....	Quilocaloria
Kg.....	Quilograma
LSMeans.....	<i>Least square means</i>
mg.....	miligrama
mL.....	mililitro
NC.....	Não coletado
nm.....	nanômetro
P.....	Probabilidade
PB.....	Proteína bruta
pH.....	Potencial hidrogênio
PM.....	Peso médio
ppm.....	Partes por milhão
Prob.....	Probabilidade
RI.....	Resposta imune
RL(s).....	Radical(is) livre(s)
Se.....	Selênio
SI.....	Sistema imune
SPF.....	<i>Specific pathogen free</i>
UI.....	Unidade internacional
VE.....	Vitamina E
VEA.....	Vírus da encefalomielite aviária
Vit.....	Vitamina

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO (GERAL) E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção de proteína animal alcançou grandes avanços nas últimas décadas, principalmente devido ao melhoramento genético, à sanidade, à reprodução e à nutrição dos animais de interesse zootécnico. Os sistemas intensivos de criação são uma realidade nos mais diversos países do mundo, desde os desenvolvidos até aqueles em desenvolvimento. Este sistema pressupõe a existência de um grande número de animais em um espaço relativamente restrito, o qual deve ser racionalmente utilizado. Neste tipo de sistema leva-se os animais a produzirem de acordo com o seu máximo potencial genético, através de um eficiente manejo reprodutivo, sanitário e nutricional.

A suinocultura está presente em 46% das 5.800.000 propriedades rurais existentes no País, sendo predominante nas pequenas propriedades rurais. O plantel suinícola brasileiro ocupa o 4º lugar no mundo, abaixo da China, da Rússia e dos Estados Unidos. No entanto, a participação do Brasil no mercado exportador de carne suína é baixa, em torno de 2,5% do total mundial. Em 2001, porém, houve um incremento significativo deste índice devido a maior importação feita pela Rússia. Assim, as 128 mil toneladas exportadas em 2000 passaram para

265 mil em 2001 e é esperado que cheguem a 320 mil em 2002, constituindo-se em um aumento de 250% em 2 anos (ABCS, 2002). Entre os empecilhos para um aumento ainda maior das exportações brasileiras pode-se destacar as restrições de ordem sanitária e os subsídios às exportações praticados por outros países.

A nutrição representa um grande percentual dos custos de produção animal. Portanto, qualquer avanço nesta área significa uma economia representativa para o setor. Entre os maiores problemas relacionados à nutrição dos suínos é possível citar a diminuição de desempenho que se verifica nos períodos pré e imediatamente pós-desmame, principalmente devido à ocorrência de diarreias.

A *Escherichia coli* é um dos principais agentes envolvidos com as enteropatias de suínos. O desencadeamento de um quadro de colibacilose depende do nível de exposição do animal à bactéria e do grau de competência imunológica do mesmo, bem como de variáveis de manejo, ambiente e alimentação. Em leitões, a doença pode ocorrer em seguida ao nascimento (colibacilose neonatal) ou após o desmame (diarreia do desmame).

Os antimicrobianos regulam o crescimento bacteriano intestinal. Sua administração aos animais pode ter o propósito de eliminar ou alterar drasticamente a flora bacteriana. No entanto, o crescimento da inquietação pública quanto ao uso destes produtos e seus problemas potenciais, como toxicidade, alergia e desenvolvimento de resistência tem estimulado o interesse de pesquisadores por alternativas a estes medicamentos (Montes & Pugh, citados por Fernandes et al., 2000).

A imunização passiva, através da administração oral de imunoglobulinas, é uma alternativa viável ao uso de antimicrobianos para combater as doenças infecciosas intestinais. A imunoglobulina da gema do ovo de galinha (IgY) ganhou atenção especial de muitos pesquisadores devido ao seu potencial valor terapêutico e aos métodos práticos pelos quais estes anticorpos podem ser obtidos e aplicados em larga escala (Yokoyama et al., 1993). Gemas ricas em imunoglobulinas específicas contra um microorganismo patogênico são obtidas através da hiperimunização de galinhas poedeiras com este mesmo patógeno. Características da dieta podem modular a susceptibilidade das aves aos desafios infecciosos e sutis influências devidas aos níveis dos nutrientes ou aos tipos de ingredientes podem ter uma importância crítica (Klasing, 1998). Ou seja, através da dieta é possível obter um aumento da quantidade absoluta de IgY no soro das aves e, conseqüentemente, em seus ovos.

Este trabalho é a primeira etapa de um projeto que tem por objetivo a produção de ovos ricos em imunoglobulinas para serem fornecidos na dieta de leitões recém-desmamados ou mesmo para aqueles recém-nascidos (fornecimento da gema *in natura* via oral). Nesta primeira etapa, o objetivo foi verificar a existência da relação entre o nível de vitamina E na dieta (nutriente imunomodulador devido principalmente à sua função antioxidante) e o título de IgY específica contra *Escherichia coli* no soro de poedeiras imunizadas contra esta bactéria. Concomitantemente, foi avaliado o papel do selênio nesta mesma função.

Escherichia coli (*E. coli*) foi o patógeno escolhido como modelo de pesquisa. Como já foi comprovado por trabalhos anteriores que os anticorpos do

soro das aves são eficientemente transferidos para a gema do ovo, tais ovos ricos em anticorpos poderiam ser utilizados como prevenção e terapia contra as diarreias dos suínos, tanto naquelas cujo principal patógeno envolvido é a *E. coli* quanto naquelas causadas pelos demais microorganismos. Porém, deve-se ressaltar a importância desta técnica como modelo para a produção de ovos ricos em imunoglobulinas específicas contra os demais microorganismos responsáveis por enteropatias dos suínos, quais sejam: *Serpulina hyodysenteriae* (disenteria suína), *Ileobacter intracellularis* (enteropatia linfoproliferativa), *Clostridium perfringens* tipo C (enterotoxemia), *Salmonella sp.* (salmonelose), *Rotavirus* (rotavirose) e *Coronavirus* (gastroenterite transmissível) (Barcellos et al., 1998).

Foi trabalhada a hipótese de que a *E. coli*, sendo uma bactéria amplamente distribuída no organismo e no ambiente das aves, tornaria difícil a determinação da quantidade de anticorpos produzida exclusivamente pelos efeitos da vacina e da suplementação da dieta. Portanto, as aves foram concomitantemente imunizadas contra o vírus da encefalomielite aviária, um microorganismo ao qual o sistema imune das aves, provavelmente, não havia sido apresentado.

Este trabalho objetivou verificar o efeito da suplementação de vitamina E e selênio na dieta de poedeiras imunizadas sobre a produção de anticorpos contra amostras de *Escherichia coli* envolvidas nas enteropatias de suínos. Também objetivou-se avaliar a produção de anticorpos contra o agente causal da encefalomielite aviária, um importante patógeno das aves. Assim, o espectro de estudo deste trabalho foi ampliado, pois foi avaliado o efeito da suplementação da

dieta com VE e Se sobre a resposta imune das aves contra uma bactéria (*E. coli*) e contra um vírus (encefalomielite).

1.1. Conceitos básicos em imunologia

O sistema imune é composto por um conjunto de células hematopoiéticas e moléculas que encontram-se na superfície destas células ou que são secretadas, transmitindo sinais entre as mesmas. A resposta imune (RI) é convencionalmente classificada em natural ou adaptativa, com o objetivo principal de melhor discriminar os elementos envolvidos na mesma. Fagócitos polimorfonucleares (heterófilos, nas aves), células *natural killer* e citocinas derivadas de macrófagos relacionam-se à resposta imune natural. Já a resposta imune adaptativa possui como elementos principais os linfócitos T e B e as citocinas produzidas por eles, bem como os fagócitos mononucleares, todos pertencentes ao sistema hematopoiético. Na resposta imune adaptativa, um segundo encontro com o agente que desencadeou a resposta induz a uma reação mais rápida e mais forte, o que é chamado de memória imunológica (Abbas et al., 2000).

A RI adaptativa pode ser dividida em fase indutora e fase efetora. A fase indutora é composta por uma etapa cognitiva, na qual o antígeno (Ag), que é um agente estranho ao organismo, é apresentado ao sistema imune, e por uma etapa de ativação, durante a qual o Ag provoca uma série de reações de ativação, proliferação e diferenciação celular. Na fase efetora, o sistema imune gera processos humorais e celulares que normalmente levam à eliminação do Ag (Abbas et al., 2000).

Em geral, o sistema imune dos vertebrados, incluindo as aves, é dividido em dois segmentos efetores: imunidade celular e imunidade humoral. Os linfócitos, como todas as células hematopoiéticas, derivam de uma célula tronco

comum, presente na medula óssea. As células precursoras de linfócitos T migram para o timo, onde completam seu processo de diferenciação. Os linfócitos B completam seu desenvolvimento na bursa de Fabricius das aves e na medula óssea dos mamíferos. A partir do timo e da bursa, que são chamados órgãos linfóides centrais, os linfócitos T e B adultos migram para os órgãos linfóides periféricos, como baço, tonsilas cecais e folículos linfóides associados às mucosas do trato respiratório superior (glândulas de Harder) e inferior e do trato digestivo (Montassier, 2000).

Os linfócitos T podem ser subdivididos em 3 populações: T auxiliares (*helper*), T citotóxicos e T supressores. Os linfócitos T auxiliares têm uma função fundamental de regulação da RI, interagindo com linfócitos B e T citotóxicos para controlar o tipo e a intensidade da reação imune (Abbas et al., 2000). A RI celular é caracterizada pela participação de linfócitos T citotóxicos (CD8+), que desenvolvem-se após o estímulo antigênico sobre linfócitos T auxiliares (CD4+). A RI humoral é caracterizada pela participação de imunoglobulinas como IgG, IgM e IgA secretadas por plasmócitos, que derivam de linfócitos B estimulados após contato e reconhecimento de antígenos (Montassier, 2000).

Os antígenos podem ser classificados conforme seu tamanho, forma ou local de produção. Antígenos endógenos são aqueles produzidos dentro de células do hospedeiro, como os vírus ou qualquer outro parasita intracelular. Já os antígenos exógenos, como as bactérias e fungos, são produzidos fora destas células. Os antígenos convencionais são timo-dependentes, ou seja, dependem da participação de linfócitos T helper para induzir a produção de anticorpos. Por outro lado, antígenos timo-independentes (geralmente polímeros grandes com

múltiplas subunidades repetidas) têm a capacidade de ativar linfócitos B na ausência de T helper (Abbas et al., 2000).

As imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos (Ac), moléculas produzidas por linfócitos B ativados, são proteínas tetraméricas, compostas por 2 cadeias polipeptídicas pesadas e 2 cadeias leves. As cadeias leves são unidas às pesadas, e estas entre si, por ligações bissulfídricas. Em uma molécula, as 2 cadeias leves são iguais, assim como as duas pesadas. A extremidade amino-terminal possui uma seqüência de aminoácidos única, exclusiva para cada Ig (região variável), enquanto a porção carboxi-terminal apresenta uma seqüência constante (região constante). As Igs podem ser divididas em 5 classes ou isotipos, conforme a seqüência de aminoácidos na região constante: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Cada linfócito B só pode produzir um tipo de Ig em um dado momento e cada Ig só pode reconhecer um epítipo antigênico, o qual é a parte do Ag passível de ser percebida pelo sistema imune (Abbas et al., 2000).

O principal tipo de imunoglobulina isolado da gema e do soro das aves é a IgY. Outras classes de imunoglobulinas estão presentes, mas em quantidades desprezíveis. A IgY das galinhas é correlata das IgG dos mamíferos. No entanto, possui uma estrutura molecular mais instável e flexível do que a IgG (Shimizu et al., 1993).

As aves transferem todos os isotipos de anticorpos para o ovo, ou seja, IgY, IgM e IgA. Existem 2 possíveis rotas de transferência (Lösch et al., 1986): primeiro, o anticorpo do plasma sangüíneo circulante é secretado para dentro do folículo em amadurecimento (e posteriormente para a gema); a segunda ocorre

quando o anticorpo é incorporado à clara do ovo no oviduto, junto com o albúmen ali secretado.

Kaspers et al. (1990) determinaram a quantidade de imunoglobulinas no soro sanguíneo e na gema de ovos de galinhas e concluíram que a secreção de IgA para a gema depende de sua concentração no soro. Wallmann et al. (1990) verificaram que a concentração de IgY nos ovos foi igual ou superior à concentração desta imunoglobulina no soro das aves.

Com um pequeno atraso (cerca de uma semana), o nível de IgY no soro reflete-se na gema do ovo. Segundo Lösch et al.(1986), apenas a IgY é secretada para dentro da gema, a qual contém de 3 a 25 mg de IgY/ml. A gema contém apenas IgY, enquanto IgM e IgA são encontradas apenas na clara.

1.2. Estrutura e funções gerais da vitamina E

De acordo com Sheffy e Schultz, citados por Strauss (1998), a vitamina E (VE) tem uma variedade de funções que afetam os sistemas reprodutivo, nervoso, circulatório, muscular, esquelético e hematopoiético. Aparentemente, é essencial para a integridade e otimização das funções de todas as células corporais. Geralmente, os sinais clínicos de deficiência são de natureza degenerativa e estão associados com a estabilidade e função das membranas biológicas. A VE possui várias funções diferentes, porém relacionadas, sendo que uma das mais importantes é a de antioxidante intracelular: previne a oxidação de lipídios insaturados dentro das células, protegendo tanto as membranas internas quanto as externas dos danos resultantes desta oxidação. Foi demonstrada a

exigência de VE para o desenvolvimento e funcionamento normais do sistema imune.

O termo vitamina E compreende todos os tocol e tocotrienol derivados que exibem atividade biológica de α -tocoferol (AOAC, 1990), sendo que podem ser encontrados em fontes naturais como óleos vegetais, ovos, fígado, legumes e plantas verdes (Tappel, citado por Gore & Qureshi, 1997). O representante mais importante do grupo da vitamina E, de ocorrência natural, é o α -tocoferol, o qual está disponível principalmente como acetato (na forma de óleo ou pó).

1.3. Função da vitamina E no sistema imune

Aparentemente, a VE, assim como outros fatores nutricionais, afeta o desenvolvimento e manutenção da imunocompetência através de múltiplas funções, agindo diretamente na célula do SI ou indiretamente, alterando parâmetros endócrinos e metabólicos que influenciam a função imune (Gershwin et al., citados por Leshchinsky & Klasing, 2001). Apesar de o mecanismo de ação da VE não estar ainda completamente entendido, sua bioatividade está principalmente associada ao potencial antioxidante. Como antioxidante, reduz patologias induzidas por radicais livres (RL) produzidos durante a inflamação e pelo metabolismo normal. Controlando a produção de radicais livres, a VE afeta eventos de transdução de sinais mediados por esses RL, modulando a expressão de alguns genes.

Como antioxidante primário das membranas celulares, a VE é particularmente importante na prevenção da peroxidação dos ácidos graxos.

Ácidos graxos podem agir como moléculas imunoreguladoras que interferem na comunicação celular, na fluidez das membranas e na elaboração do segundo mensageiro (Klasing, 1998).

Outro mecanismo imunoregulador potencial da VE é a modulação do metabolismo do ácido araquidônico através das vias da cicloxigenase e lipoxigenase, que levam à síntese de prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (Blumberg, citado por Leshchinsky & Klasing, 2001).

É conhecido que a vitamina E apresenta uma poderosa atividade antioxidante relacionada à degradação de lipídios, à estabilização dos ácidos graxos polinsaturados ingeridos e dos produtos resultantes da síntese metabólica (Strauss, 1998). Atuando como antioxidante, detoxica radicais livres e previne a destruição das células do hospedeiro. Seu principal local de atuação é nas membranas celulares, ricas em lipídios facilmente oxidáveis (Chung & Boren, 1999). A produção química e enzimática de radicais livres em um sistema biológico é um processo normal, originado do metabolismo respiratório celular, da fagocitose (realizada nas aves pelos macrófagos e heterófilos) e da produção enzimática de eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos). Quando a produção de radicais livres é excessiva, as defesas antioxidantes atuam detoxicando estes radicais, assim prevenindo a destruição das células do hospedeiro.

A vitamina E exerce influência sobre várias células do sistema imune, como os linfócitos e macrófagos (Gebremichael et al., 1984). Todas as células influenciadas pela vitamina E estão envolvidas na produção de interferons, os quais possuem uma atividade moduladora sobre vários fenômenos imunológicos

(Franchini et al., citados por Strauss, 1998). Interferon é um termo aplicado a pequenas proteínas com atividade antiviral inespecífica (Tizard, 1985).

A maioria das respostas imunes a patógenos são acompanhadas por uma resposta inflamatória sistêmica, que é a fase aguda de resposta. Esta fase caracteriza-se pelo aumento na síntese de proteínas específicas, aumento do *turnover* protéico, da gliconeogênese e da temperatura corporal (Chung & Boren, 1999). A inflamação induzida imunologicamente inicia-se com o reconhecimento específico do antígeno, mas os eventos que se seguem não possuem especificidade imunológica. Embora a inflamação seja um meio eficiente de proteção contra microorganismos patogênicos invasores e de recuperação da infecção, as células e os mediadores químicos participantes da inflamação também são capazes de danificar tecidos e interferir com o funcionamento de órgãos do hospedeiro (Terr, 1991).

A vitamina E também exerce seus efeitos benéficos na imunocompetência limitando a produção de prostaglandinas e leucotrienos (potentes indutores de inflamação) e alterando a liberação de citocinas. Citocinas são peptídeos semelhantes a hormônios que estão envolvidos na comunicação celular, atuando como ligantes para os receptores celulares. Pela ativação destes receptores, as citocinas determinam o equilíbrio entre inflamação, resposta celular e resposta humoral contra um dado desafio imunológico. Como as células do sistema imune são a fonte primária e o alvo principal das citocinas, a alteração na produção das mesmas pode ter efeitos profundos sobre a RI, bem como sobre as respostas metabólicas originadas da inflamação (Chung & Boren, 1999).

O aumento na ingestão de vitamina E deve aumentar a resistência às doenças por permitir uma resposta imune mais persistente e efetiva (Chung & Boren, 1999). Os efeitos moduladores da vitamina E se expressam através de componentes inflamatórios e imunes da função imune (Grimble, 1998). Em geral, a deficiência de vitamina E e um baixo conteúdo tecidual da mesma aumentam componentes da resposta inflamatória e suprimem componentes da resposta imune. Vários estudos já demonstraram que a deficiência de vitamina E desequilibra as imunidades celular e humoral e está associada a uma crescente incidência de doenças. A suplementação desta vitamina na dieta visa ao efeito oposto.

Willson, citado por Sell et al. (1997) demonstrou que o ácido ascórbico tem um efeito poupador sobre a VE por restaurar a capacidade antioxidante da VE oxidada, reconvertendo o radical tocoferol ao seu estado reduzido. Franchini et al. (1994) observaram que o aumento no consumo de ácido ascórbico durante as primeiras fases de crescimento de frangos aumentou a formação de anticorpos nestes animais. Todos os elementos do sistema antioxidante interagem entre si de forma eficiente. Esta interação provavelmente inicia em nível de absorção de nutrientes e continua no metabolismo. O selênio dietético, por exemplo, poupa a VE, de forma que patos apresentam concentrações mais elevadas de VE no plasma ao receberem dietas suplementadas com selênio (Combs et al., 1975).

Tengerdy & Nockels (1973) concluíram que o nível de VE normalmente usado nas rações comerciais para matrizes (15-30 mg/kg) parece ser adequado ao desenvolvimento embrionário. Por outro lado, o nível que conduz a uma ótima resposta imune é de cerca de 100-150 mg/kg. Aparentemente, a VE não possui

uma ação direta sobre o desenvolvimento do SI, já que pintos que recebem níveis deficientes ou excessivos de VE na dieta respondem da mesma forma à imunização contra hemácias de ovinos. No entanto, a quantidade de Ac produzida é dependente do nível de VE.

Anderson & Menzel, citados por Tengerdy & Brown (1977), sugeriram que o aumento de proteção contra doenças ocorre devido a um efeito regulador da VE sobre os níveis de prostaglandinas. Um alto nível desta vitamina diminuiria os níveis de prostaglandinas, o que reprime a atividade do AMPc, levando ao aumento da fagocitose e da imunidade.

A partir dos resultados de Erf et al. (1998), pode-se considerar que a VE aumenta a proporção de linfócitos T helper maduros dentro do timo, o que é um indício de seus efeitos sobre a diferenciação celular neste órgão. Em níveis 3 a 5 vezes maiores do que aqueles usados nas formulações comerciais, a VE aumentou o percentual de linfócitos T helper maduros no timo e no baço de frangos de 7 semanas de idade. Estes pesquisadores ainda citam vários trabalhos em que foram demonstrados os efeitos imunomoduladores da VE, tanto em humanos quanto em uma grande variedade de espécies animais, sendo tais efeitos mais evidentes nos animais muito jovens ou muito velhos e naqueles indivíduos imunocomprometidos.

Os dados do trabalho de Gore & Qureshi (1997) indicam uma possível produção preferencial de linfócitos T helper em frangos que recebem altos níveis de VE. Estas células são fundamentais para a produção de anticorpos.

Leshchinsky & Klasing (2001) verificaram que em níveis moderados de suplementação (25 a 50 UI/kg) a VE foi mais eficiente como imunomodulador do

que quando em níveis elevados (100 e 200 UI/kg), no que se refere à produção de Ac contra alguns Ag, proliferação de linfócitos e alteração no número de heterófilos.

Estudando 3 níveis de suplementação de VE nas rações inicial e final de frangos de corte (60 e 50; 90 e 75; 120 e 100 UI/kg, respectivamente), Mazija et al. (1992) concluíram que a maior resposta imune (medida por títulos de hemoaglutinação de anticorpos específicos) ocorreu no grupo ao qual foi dada a maior quantidade de vitamina E, ou seja, 120 UI/kg na ração inicial e 100 UI/kg na ração final.

Um experimento realizado com ovos de peru e ovos de galinha por Gore & Qureshi (1997) mostrou uma melhora no título de anticorpos e na resposta dos macrófagos dos respectivos pintos quando 10 UI de VE foi injetada nos ovos 3 dias antes da eclosão dos mesmos, quando comparados com os grupos controles que receberam solução salina.

1.4. Função do selênio sobre o sistema imune

De acordo com Grimble (1998), muitos dos componentes da defesa antioxidante do organismo interagem para manter a capacidade antioxidante dos tecidos. O peróxido de hidrogênio é um dos compostos formados continuamente como subprodutos do metabolismo aeróbico e através de reações com drogas e toxinas ambientais. Estes compostos são altamente reativos e podem causar

lesão química séria ao DNA, às proteínas e lipídios insaturados. Porém, a célula possui vários mecanismos protetores que servem para minimizar o potencial tóxico destas substâncias. A vitamina E, ao remover o peróxido de hidrogênio, fica oxidada, tornando-se inativa. A forma oxidada da vitamina E é restaurada à forma não-oxidada através de redução realizada pelo ácido ascórbico (vitamina C). O ácido deidroascórbico formado no processo é reconvertido a ácido ascórbico pela interação com a forma reduzida da glutathiona (GSH). A glutathiona reduzida, presente na maioria das células, pode neutralizar quimicamente o peróxido de hidrogênio. Esta reação, catalisada pela glutathiona peroxidase (GSH-Px), que contém selênio no seu centro ativo, forma glutathiona oxidada, a qual não possui mais propriedades protetoras, necessitando ser regenerada à forma reduzida pela glutathiona redutase (Champe & Harvey, 1997). Então, assim como a vitamina E, o selênio também atua na remoção dos radicais livres, só que indiretamente. As vitaminas E e C e a glutathiona estão, portanto, intimamente ligadas à defesa antioxidante.

O selênio foi descoberto há cerca de 180 anos atrás mas, até 1957, era tido apenas como substância tóxica. Em 1974, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para suplementação da dieta de suínos e frangos no nível de 0,1 ppm. O nível de 0,3 ppm para as dietas de aves, suínos, ovinos e bovinos foi aprovado em 1987 (Ullrey, 1992).

Colnago et al. (1984) pesquisaram o efeito do selênio e da VE sobre o desenvolvimento de imunidade contra *Eimeria tenella* em frangos de 22 a 32 dias de idade. A suplementação da dieta com 0,25 ppm de Se (0,31 ppm, incluindo o Se contido na dieta basal) e 100 UI de VE reduziu a mortalidade e aumentou o

ganho de peso das aves infectadas com o protozoário quando comparadas com aquelas que foram suplementadas com 0,1, 0,5 e 1,0 ppm de Se.

Inglot et al. (1996) analisaram 65 compostos orgânicos de selênio, dos quais 50% possuíam atividade imunoestimuladora através do aumento da produção de interferons e do fator de necrose tumoral. Os interferons constituem uma grande família de glicoproteínas secretadas com atividade antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. São produzidos pela maioria das células dos vertebrados em resposta à infecção viral. O fator de necrose tumoral é uma citocina produzida por macrófagos e linfócitos T que possui efeitos inflamatório, imunointensificador e tumoricida, exercidos principalmente através da trombose vascular e necrose tumoral (Terr, 1991).

Surai et al. (1998) verificaram que existe um efeito positivo da suplementação de Se na dieta materna sobre a concentração de glutathiona no fígado de pintos recém-nascidos, sendo que a combinação de 0,4 ppm de Se com altas doses de VE (100 a 200 mg/kg) ainda aumentava a concentração de glutathiona. Isto ocorreu porque o Se suplementado aumentou significativamente a atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px), enzima dependente de Se, diminuindo a susceptibilidade do mesmo à peroxidação.

Larsen et al. (1997) adicionaram selênio à dieta de poedeiras que foram desafiadas com *Escherichia coli* e hemácias de ovinos. Encontraram como dose ótima de selênio o nível de 0,45 mg/kg de ração (0,45 ppm), pois o mesmo reduziu a incidência de mortes ou lesões de 86% para 21%.

Swain et al. (2000) estudaram o efeito da suplementação de VE (0 a 300 UI/kg) e do selênio (0 a 1 mg/kg) no ganho de peso, consumo de ração,

eficiência alimentar, inibição da migração de leucócitos e produção de anticorpos em frangos imunizados contra o vírus da doença de Newcastle. Foram encontrados títulos de Ac significativamente maiores nas aves que receberam 0,06 mg de Se e 150 UI/kg de VE.

1.5. Vitamina E na resposta imune contra *Escherichia coli*

Tengerdy & Nockels (1975) mostraram que VE suplementada em níveis de 150 a 300 UI/kg diminuiu a mortalidade de frangos, do nascimento aos 42 dias de idade, devida ao desafio com *E. coli* (40% no grupo controle para 27% e 5% nos grupos suplementados com 150 e 300 UI/kg, respectivamente).

Gore & Qureshi (1997) e Erf et al. (1998) relataram que a vitamina E aumenta a competência imunológica de galinhas, melhorando sua imunidade contra várias doenças, entre as quais infecção por *E. coli*, coccidiose, doença infecciosa da bursa e doença de Newcastle.

Tengerdy & Brown (1977) demonstraram que altas doses de VE protegeram frangos contra *E. coli*, como resultado de um aumento da fagocitose e da produção de anticorpos. Como a fagocitose de antígenos particulados, que é feita pelos macrófagos, é um fenômeno mediado pela membrana dos mesmos, níveis elevados de VE podem manter a integridade de membrana essencial para esta função. O grupo que recebeu 300 UI/kg de VE na dieta apresentou maior remoção de *E. coli* do sangue do que o grupo controle. Aqueles pesquisadores observaram que tanto a VE quanto a vitamina A ajudaram a reduzir a mortalidade resultante da infecção por *E. coli*. Entretanto, a combinação de ambas vitaminas foi menos efetiva. Também concluíram que o efeito destas vitaminas no

desempenho imune deve estar interligado ao nível das mesmas nos órgãos linfopoiéticos e de armazenamento. O fígado parece ser este órgão de armazenamento, pois aumenta o seu conteúdo de vitamina E com o aumento do nível da dieta, alcançando um aparente ponto de saturação ao nível de 16 g/kg.

Yang et al. (2000) trabalharam com 2 grupos de aves White Leghorn selecionados de forma divergente para resposta humoral contra hemácias de ovinos. Os pintos foram alimentados com rações contendo alta (300 UI / kg) ou baixa (10 UI / kg) quantidade de vitamina E e foram infectados com *Escherichia coli* via inoculação nos sacos aéreos, os quais foram analisados por escores de lesões. Embora a vitamina E da dieta não tenha tido efeito sobre as lesões em qualquer dos grupos, a perda de peso 24 horas após a inoculação da *E. coli* foi significativamente reduzida nas aves alimentadas com a mais alta concentração desta vitamina. Os resultados daquele trabalho sugerem que a seleção genética pode ter modificado a imunocompetência em relação às respostas à suplementação de vitamina E, e que sua concentração ótima na dieta depende, entre outros fatores, do genótipo das aves.

Gore & Qureshi (1997) e Erf et al. (1998) concluem que os efeitos da vitamina E parecem ser influenciados por muitos fatores, incluindo idade das aves e níveis da VE na dieta. Wakikawa et al. (1999) verificaram que camundongos jovens que receberam alta dose de VE na dieta apresentaram melhor resposta imune antes e após estresse. Por outro lado, o efeito oposto foi verificado em camundongos velhos.

1.6. *Escherichia coli* como patógeno para aves

Em aves, a infecção por *E. coli* é considerada secundária a outros agentes e a manifestação da doença é extra intestinal. A colibacilose é uma das principais doenças da avicultura industrial moderna devido aos grandes prejuízos econômicos causados no mundo inteiro por quadros como colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerosaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, doença respiratória crônica complicada, onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada, panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite.

E. coli faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves. A colonização do intestino ocorre logo após o nascimento e, embora o papel da microbiota entérica ainda não tenha sido completamente elucidado, existem evidências da participação destes microorganismos na nutrição, servindo como fonte de vitaminas. Também ocupam sítios da mucosa intestinal, impedindo a colonização do epitélio por outros microorganismos potencialmente patogênicos. *E. coli* também pode ser facilmente isolada da região da faringe e do trato respiratório superior de aves saudáveis.

Há uma excreção contínua de *E. coli* através das fezes, o que torna a sua distribuição cosmopolita. A bactéria pode permanecer nas criações por longos períodos, contaminando o alimento e a água, os quais servem como via de disseminação da mesma.

O corpo bacteriano é composto de estruturas antigênicas que contribuem para a determinação dos sorogrupos de *E. coli*, baseada na identificação dos antígenos somáticos ("O"), capsulares ("K"), flagelares ("H") e fimbriais ("F"). Atualmente, são descritos 177 antígenos somáticos, 100 antígenos capsulares e 52 antígenos flagelares. Os principais sorogrupos relacionados com

a colibacilose aviária são O1:K1, O2:K1, O36 e O78:K80 (Ferreira & Knöbl, 2000). Amostras de *E. coli* relacionadas a patologias aviárias, com fatores de virulência bem determinados, são designadas *E. coli* patogênica para aves (APEC) (Brito, 2000).

O aparecimento da colibacilose é o resultado da interação da bactéria com o hospedeiro e o meio ambiente. Apenas amostras patogênicas possuem capacidade de causar doença. As condições ambientais e de manejo contribuem muito para a ocorrência da doença, pois a bactéria é considerada um patógeno oportunista. Altas concentrações de amônia no galpão, deficiências na ventilação do ambiente, extremos de temperatura, umidade da cama, criações com alta densidade e deficiência no processo de desinfecção são considerados os principais fatores ambientais predisponentes (Ferreira & Knöbl, 2000).

O uso de vacinas contra APEC tem sido uma alternativa no controle da colisepticemia. Na maioria dos casos, a vacinação tem sido realizada por via subcutânea usando-se bactérias inteiras inativadas com formol e geralmente adicionados adjuvantes oleosos (Brito, 2000).

1.7. Vitamina E: desempenho produtivo das aves e produção de imunoglobulinas

Hossain et al. (1998) trabalharam com diferentes níveis de vitamina E na ração de matrizes de frangos de corte (25, 50, 75 e 100 mg de vit.E / kg de ração). A produção de ovos, peso de ovo, eclodibilidade, peso de pinto ao nascer e desempenho dos pintos não foram influenciados pelos níveis de vitamina E na dieta das matrizes. No entanto, os títulos de anticorpos contra o vírus de

Newcastle aumentaram com o aumento de vitamina E suplementada e com a injeção de vitamina E diretamente no ovo, sendo que o último procedimento foi mais eficiente no aumento da resposta imune. Por outro lado, Coskun et al. (1997) trabalhando com diferentes níveis de vitamina E na dieta (0, 5, 35 ou 70 UI/kg de ração) não observaram influencia do nível da vitamina no sangue, o percentual de linfócitos T, a contagem de células plasmáticas no baço nem os títulos de anticorpos contra o vírus de Newcastle em galinhas poedeiras.

Siegel et al. (2001) avaliaram as respostas a 2 diferentes níveis de VE na ração (10 e 300 UI/kg) de 2 linhagens comerciais de matrizes. O peso corporal, idade ao primeiro ovo e peso de ovos não foram influenciados pela VE. No entanto, os autores observaram que a produção de ovos aumenta com a suplementação de VE. Eles concluíram que as respostas a uma alimentação contínua suplementada com 300 UI de vitamina E/kg de ração são influenciadas pela genética, idade, duração da suplementação e parâmetros avaliados.

Vários são os trabalhos que mostram que a manipulação nutricional pode afetar os níveis de IgY no ovo. Lee et al. (1999) realizaram experimentos a fim de obter ovos de galinhas poedeiras com alto nível de IgY. Todos os suplementos testados (alho em pó, 2% e 4% de farinha de algas marinhas, alga marinha em pó e 0,5ppm Se + vit. E em um nível 300% acima do sugerido pelo NRC, 1994) tenderam a diminuir as taxas de postura. Naquele experimento não houve efeito da vitamina E sobre a produção de IgY.

Li et al. (1998) estudaram o efeito do peso do ovo e da gema no conteúdo de IgY em 2 linhagens de galinhas poedeiras. As aves White Leghorn apresentaram peso de gema maior do que Rhode Island Red, o que é considerado

um fator importante para a produção de IgY. Os pesquisadores concluíram que a quantidade de Ac específicos produzidos independe de linhagem. No entanto, o peso da gema de ovo e o percentual de produção são importantes fatores para a eficiência do processo.

1.8. Encefalomielite aviária

A encefalomielite aviária (EA) é uma doença infecciosa, causada por um picornavírus (VEA), que afeta naturalmente as galinhas, perus, faisões e codornas. O significado econômico da EA está associado ao fato da doença acometer plantéis de aves jovens e adultas. Porém, as aves jovens até 6 semanas de idade são as que desenvolvem a doença (Carter et al., 1995). Ainda hoje, mesmo com o desenvolvimento de vacinas eficazes, a avicultura industrial experimenta surtos de EA que podem afetar a produtividade dos plantéis.

As cepas de campo são enterotrópicas e transmitidas horizontalmente. Infectam as aves pela via oral e são disseminadas pelas fezes. Apresentam baixa patogenicidade, exceto para pintos susceptíveis infectados por transmissão vertical ou, mais raramente, por transmissão horizontal precoce. Assim como ocorre com outros enterovírus, e infecção pelo VEA ocorre por ingestão oral. A replicação do mesmo ocorre nas células epiteliais do intestino delgado. Em aves criadas em gaiola, como no caso das poedeiras comerciais, a transmissão horizontal também ocorre, porém de maneira mais lenta (Martins, 2000).

Em condições naturais, a presença dos sintomas clínicos depende da idade das aves, do estado imunitário do plantel e da via de transmissão do vírus. Os pintos com até 3 semanas de idade apresentam falta de coordenação motora

(ataxia), paralisia, tremores (especialmente do pescoço e cabeça), distrofia muscular e mortalidade. As aves adultas não imunizadas e infectadas podem apresentar leve queda temporária de postura (entre 5 e 10%), sem alterações significativas da qualidade da casca. Os pintos nascidos durante o período de baixas na eclosão podem apresentar sintomas nervosos e mortalidade nas primeiras semanas de vida. Esses sintomas nervosos somente podem ser observados nas primeiras semanas de vida das aves. A opacidade da tonalidade azulada do cristalino é a única alteração macroscópica em aves adultas.

Há muito é reconhecido que a presença de anticorpos neutralizantes no soro das aves é o maior determinante na resistência à infecção pelo VEA. A bursectomia, mas não a timectomia, conduz à falha no estabelecimento da imunidade contra o VEA, o que ratifica a importância da imunidade humoral. A resistência relacionada à idade está correlacionada com a habilidade das aves em produzir anticorpos neutralizantes contra o vírus.

Quando as aves são imunologicamente competentes, a resposta sorológica pode ser relativamente rápida. Ovos postos 11 dias após a infecção das reprodutoras já apresentam anticorpos passivos, o que faz que os pintos já sejam resistentes à infecção por contato ao nascimento. Os anticorpos são transferidos à progênie pela fêmea, via saco vitelino. A duração da proteção vai de 3 a 10 semanas de idade (Martins, 2000).

1.9. Imunização das aves

Respostas imunes através da produção de Ac, ou Ig, contra materiais estranhos (antígenos) são importantes para proteger as aves contra infecções. Em

galinhas poedeiras e matrizes, a IgG do sangue é eficientemente transportada através do epitélio folicular do ovário e armazenada na gema durante a oogênese (Rose & Orlans, citados por Li et al., 1998). Este fenômeno é importante para a proteção da progênie da ave.

Larsson et al. (1993) observaram que a concentração de IgY (IgG das aves) na gema é mais alta do que no soro. A IgY é continuamente absorvida pelo embrião durante a embriogênese, até o segundo dia pós-eclosão, evidenciando a imunização passiva que ocorre.

Apenas grandes mamíferos como bovinos e eqüinos podem produzir mais Ac do que uma poedeira. A gema de ovo crua é fonte de Ac. No entanto os lipídios lá encontrados podem interferir na atividade dos Ac. Portanto, para fins de utilização destes Ac em testes imunológicos, é ideal que os mesmos sejam purificados (Larsson et al., 1993).

Nakai et al., citados por Li et al. (1998), calcularam que em um período de 6 semanas uma galinha imunizada produz 298 g de IgY, quantidade muito maior do que aquela obtida no mesmo período a partir do soro de um coelho (16,6 mg). Além disso, segundo estudo de Jensenius et al., citados por Li et al. (1998), as galinhas produzem mais Ac específicos contra antígenos de mamíferos do que os próprios mamíferos. Isso ocorre devido à distância filogenética entre aves e mamíferos. Outras vantagens citadas na bibliografia são a maior facilidade de purificação das Ig a partir da gema e a compatibilidade desta produção com os modernos regulamentos de proteção animal.

A vacinação envolve a administração de antígenos derivados de um agente infeccioso a um animal, de modo que seja iniciada uma resposta imune e

adquirida resistência contra aquele agente infeccioso. Na maioria dos animais, após uma única injeção do antígeno, nenhuma resposta é detectada durante alguns dias (período de latência). Os anticorpos tornam-se detectáveis cerca de 1 semana após a primeira imunização, aumentando até o 14^o dia e depois declinando. A resposta a uma segunda imunização é muito mais rápida e atinge níveis de Ac muito mais altos. Esta resposta é específica, já que pode ser induzida somente por um antígeno semelhante ao primeiro (Tizard, 1985). Desta forma, a possibilidade de manipular a produção de IgY através da nutrição e de um esquema de vacinações é uma alternativa que vem sendo estudada.

Lösch et al. (1986) salientaram a importância prática de saber-se quais microorganismos infecciosos dos mamíferos que podem induzir a produção de anticorpos em galinhas, principalmente quando essas espécies são criadas juntas. Se isso efetivamente ocorre, os ovos de cada propriedade poderiam servir como um antidiarréico natural, fundamentalmente em regiões subdesenvolvidas.

O nível de anticorpos no soro depende do tipo, quantidade e método de aplicação do antígeno. Comparada com a aplicação intraperitoneal do antígeno, a imunização intramuscular mostra um nível significativamente mais alto de anticorpos do 28^o dia em diante (Lösch et al., 1986).

Compostos de alumínio, como o hidróxido de alumínio – $Al(OH)_3$ – têm sido amplamente usados em um grande número de vacinas veterinárias. Estas substâncias conhecidas por adjuvantes são reconhecidas pela sua habilidade em estimular a produção de anticorpos. Segundo Ulanova et al. (2001), o $Al(OH)_3$ estimula diretamente os monócitos a produzir citocinas pró-inflamatórias, ativando as células T. Linfócitos T *helper* ativados liberam interleucina-4, que estimula a

proliferação de linfócito B, que diferencia-se em plasmócito para produzir anticorpos.

Muitos trabalhos mostram que imunizações repetidas produzem maiores títulos de anticorpos. Rho et al. (1999) avaliaram o efeito da idade e da vacinação em galinhas sobre a produção de IgY nos ovos. Iniciando às 17 ou 30 semanas de idade, as galinhas foram vacinadas 2 vezes (8 semanas de intervalo), 3 vezes (4 semanas de intervalo) ou 5 vezes (2 semanas) contra *Streptococcus mutans*. Um grupo de galinhas (controle) não recebeu vacina. A taxa de postura das aves vacinadas foi menor do que das não vacinadas. A vacinação não afetou o peso corporal ou o peso do ovo. A IgY específica contra *S. mutans* foi primeiramente detectada nos ovos 2 semanas após a primeira vacinação e persistiu até 8 semanas após a última vacinação. IgY específica não foi detectada nos ovos de galinhas não vacinadas. As concentrações de IgY tenderam a crescer com o número de vacinações. Foram mais altas nos ovos de galinhas vacinadas 5 vezes iniciando às 30 semanas de idade. Os pesquisadores recomendam que, a fim de obter uma contínua concentração de IgY específica, sejam realizadas múltiplas vacinações com 2 semanas de intervalo.

Segundo Schade et al. (1994), o número total de vacinações requeridas dependerá do tipo e dosagem do antígeno, assim como do adjuvante empregado. Em qualquer caso, no mínimo 2 imunizações devem ser feitas.

Usualmente, é impossível diferenciar os anticorpos produzidos pela vacinação daqueles decorrentes do desafio por agentes patogênicos no campo. Além disso, há uma constante associação de doenças e seus reflexos na resposta imunitária. É comum o registro na literatura do papel negativo das doenças

imunodepressoras sobre a produção de anticorpos. Enfermidades como doença infecciosa bursal, micotoxicoses e anemia infecciosa das galinhas são exemplos freqüentes da afirmação anterior e devem ser monitoradas. Por outro lado, sabe-se que as linhagens genéticas, o estresse social, o meio ambiente, entre outros, também interferem nos resultados de um programa de vacinação, embora a intensidade da interferência não seja medida especificamente (Salle & Silva, 2000).

1.10. *Escherichia coli* como patógeno para suínos

Escherichia coli é uma enterobactéria envolvida em uma grande variedade de infecções em muitas espécies animais, atuando como agente primário ou secundário. A bactéria pode exercer seu efeito patogênico no intestino delgado dos animais, sendo que dois mecanismos de virulência são fundamentais: a aderência (mediada por fímbrias) e a capacidade de produzir toxinas (Barcellos et al., 1998). De acordo com os mecanismos de patogenicidade e as doenças relacionadas, esta bactéria está classificada em 4 categorias principais: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC) e enterohemorrágica (EHEC) (Carter et al., 1995). Em suínos, podemos citar ainda a *E. coli* ETEC II (enterotoxêmica), patógeno principal para o desenvolvimento da Doença do Edema.

Em suínos, a *Escherichia coli* EPEC está envolvida nos seguintes quadros patológicos: diarreia pós-desmame, disenteria (diarreia sanguinolenta) e doença do edema. A EPEC liga-se às células epiteliais do intestino delgado causando a destruição das microvilosidades. Os mecanismos pelos quais esta

linhagem de *E. coli* produz lesões ainda não são completamente entendidos (ela adere-se às células, porém não produz toxinas). Entretanto, sabe-se que certos fatores de virulência codificados por plasmídeos estão envolvidos. (Carter et al., 1995).

1.11. Imunização passiva - uso preventivo e terapêutico da IgY

O trato gastrointestinal oferece uma extensa área de superfície sobre a qual ocorre um contato direto entre o animal e uma grande variedade de nutrientes, microorganismos e toxinas exógenas. O intestino deve permitir a troca de nutrientes entre o lúmen e a circulação sistêmica, prevenindo ao mesmo tempo a penetração de agentes patogênicos (Gaskins, 1997). Se a flora natural do intestino for eliminada ou sua composição drasticamente alterada (por tratamento com antibiótico, por exemplo), resultam distúrbios dietéticos e pode ocorrer multiplicação de patógenos potenciais (Tizard, 1985).

A imunização passiva produz uma resistência temporária, transferindo anticorpos de um animal resistente para um susceptível. Estes anticorpos transferidos passivamente fornecem proteção imediata, mas como são gradualmente catabolisados, esta proteção se desfaz e o receptor finalmente torna-se novamente susceptível à reinfecção. A imunização passiva exige que os anticorpos (imunoglobulinas) sejam produzidos por um animal doador por meio de imunização ativa e que estes anticorpos sejam administrados a animais susceptíveis para conferir proteção imediata (Tizard, 1985).

Em suínos, as imunoglobulinas (Igs) são incapazes de se transferir da mãe para o feto via placenta devido ao seu grande tamanho. O colostro supre a

necessidade de Igs necessárias para o desenvolvimento da imunidade passiva. Porém, o nível de Igs no colostro inicia a declinar 48 horas após o parto. Quando isto combina-se com o fechamento das vilosidades (que ocorre cerca de 36 horas após o nascimento), o resultado é uma reduzida absorção de Igs. O leitão começa a produzir suas próprias Igs apenas a partir dos 4 meses de idade.

Yokoyama et al. (1993) destacam que o valor prático da imunização passiva de mamíferos utilizando a IgY reside na capacidade de ligação específica da IgY aos antígenos que penetram no organismo de um indivíduo não-imunizado ou imunodeficiente.

Anticorpos de galinhas oferecem algumas vantagens sobre aqueles anticorpos tradicionalmente utilizados devido a diferenças na evolução dos genes para estas imunoglobulinas. As galinhas dão uma melhor resposta de anticorpos contra antígenos de mamíferos (Larsson & Sjoquist, 1990).

A IgY da gema do ovo de galinha pode ser absorvida e transferida tão eficientemente quanto anticorpos colostrais pelo sangue de leitões recém-nascidos. Esta imunoglobulina tem uma meia-vida de 1,85 dias no soro destes recém-nascidos. Similarmente aos anticorpos colostrais, a absorção de IgY pelo intestino cessa por volta de 36 horas de vida. De acordo com estudos realizados por Yokoyama et al. (1993), a IgY da gema de ovo protege os animais contra diarreias experimentalmente induzidas quando administrada em alta dose.

Sugita-Konishi et al. (1996) investigaram as funções imunológicas da IgY isolada da gema de ovo de galinhas imunizadas com várias bactérias infecciosas (26 linhagens de bactérias patogênicas tratadas com formalina). A IgY inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, a produção de enterotoxina A

do *Staphylococcus aureus* e a adesão da *Salmonella* Enteritidis a células intestinais humanas em cultura. Concluíram que a IgY de galinhas imunizadas com múltiplas bactérias podem ser úteis na prevenção de doenças bacterianas.

Anticorpos específicos contra linhagens de *E. coli* enterotóxica depositados na gema de ovos de galinhas imunizadas foram expostos, *in vitro*, à influência de variados fenômenos digestivos, como redução de pH e digestão proteolítica. Schmidt et al. (1989) verificaram a atividade dos anticorpos remanescentes através do teste de ELISA. Os autores observaram que já no estômago ocorre uma considerável perda na atividade dos anticorpos (baixo pH e clivagem péptica). Uma perda adicional ocorre devido ao efeito proteolítico das proteases pancreáticas tripsina e quimotripsina. No entanto, verificaram que anticorpos em soluções ricas em proteína (como suspensões de ovo ou gema) foram mais resistentes do que aqueles purificados.

Wiedemann et al. (1990) observaram que, mesmo com altas doses de gema liofilizada, nenhuma atividade de anticorpos pode ser detectada no jejuno distal de leitões com idades entre 6 e 8 semanas, apesar de que a alimentação adicional com clara de ovos tenha mostrado um significativo efeito protetor para os anticorpos da gema durante a digestão. No entanto, de acordo com investigações de Lösch et al. (1986) sobre a resistência da IgY ao ácido gástrico, pode-se esperar que uma parte dos anticorpos da gema sejam capazes de atingir intactos o intestino delgado, pelo menos em animais jovens ou recém-nascidos.

Capítulo II

1. Introdução

Características da dieta podem modular a susceptibilidade das aves aos desafios infecciosos e sutis influências devidas ao nível ou aos tipos de ingredientes podem ter uma importância crítica (Klasing, 1998). Ou seja, através da dieta é possível obter um aumento da quantidade absoluta de IgY no soro das aves e, conseqüentemente, em seus ovos. A IgY das galinhas é correlata das IgG dos mamíferos, no entanto possui uma estrutura molecular mais instável e flexível do que a IgG (Shimizu et al., 1993).

A vitamina E possui várias funções diferentes, porém relacionadas, sendo que uma das mais importantes é a de antioxidante intracelular. Vários estudos já demonstraram a exigência de VE para o desenvolvimento e funcionamento normais do sistema imune.

Como antioxidante, a vitamina E reduz patologias induzidas por radicais livres, os quais são produzidos durante a inflamação e pelo metabolismo normal do organismo. Controlando a produção de radicais livres, a vitamina E afeta

eventos de transdução de sinais mediados por esses compostos, modulando a expressão de alguns genes.

Como antioxidante primário das membranas celulares, a vitamina E é particularmente importante na prevenção da peroxidação dos ácidos graxos. Ácidos graxos podem agir como moléculas imunoreguladoras que interferem na comunicação celular, na fluidez das membranas e na elaboração do segundo mensageiro (Klasing, 1998). A vitamina E exerce influência sobre várias células do sistema imune, como os linfócitos e macrófagos (Gebremichael et al., 1984). A vitamina E também exerce seus efeitos benéficos na imunocompetência limitando a produção de prostaglandinas e leucotrienos (potentes indutores de inflamação) e alterando a liberação de citocinas. Como as células do sistema imune são a fonte primária e o alvo principal das citocinas, a alteração na produção das mesmas pode ter efeitos profundos sobre a resposta imune, bem como sobre as respostas metabólicas originadas da inflamação (Chung & Boren, 1999).

Todos os elementos do sistema antioxidante interagem entre si de forma eficiente. Esta interação, provavelmente, inicia durante a absorção de nutrientes e continua no metabolismo. O selênio dietético, por exemplo, poupa a vitamina E, de forma que patos apresentam concentrações mais elevadas de VE no plasma ao receberem dietas suplementadas com selênio (Combs et al., 1975). Surai et al. (1998) verificaram que existe um efeito positivo da suplementação de Se na dieta materna sobre a concentração de glutathione no fígado de pintos recém-nascidos, sendo que a combinação de 0,4 ppm de Se com altas doses de VE (100 a 200 mg/kg) ainda aumentava a concentração de glutathione. Isto ocorreu porque o Se suplementado aumentou significativamente a atividade da glutathione

peroxidase (GSH-Px), enzima dependente de Se, diminuindo a susceptibilidade do mesmo à peroxidação.

Swain et al. (2000) estudaram o efeito da suplementação de vitamina E (0 a 300 UI/kg) e do selênio (0 a 1 mg/kg) no ganho de peso, consumo de ração, eficiência alimentar, inibição da migração de leucócitos e produção de anticorpos em frangos imunizados contra o vírus da doença de Newcastle. Foram encontrados títulos de Ac significativamente maiores nas aves que receberam 0,06 mg de Se e 150 UI/kg de VE.

A partir dos resultados de Erf et al. (1998), é possível considerar que a vitamina E aumenta a proporção de linfócitos T helper maduros dentro do timo, o que é um indício de seu efeitos sobre a diferenciação celular neste órgão. Em níveis 3 a 5 vezes maiores do que aqueles usados nas formulações comerciais, a VE aumentou o percentual de linfócitos T helper maduros no timo e no baço de frangos de 7 semanas de idade. Estes pesquisadores ainda citam vários trabalhos em que foram demonstrados os efeitos imunomoduladores da vitamina E, tanto em humanos quanto em uma grande variedade de espécies animais, sendo tais efeitos mais evidentes nos animais muito jovens ou muito velhos e naqueles indivíduos imunocomprometidos.

A encefalomielite aviária é uma doença infecciosa causada por um picornavírus que afeta naturalmente as galinhas, perus, faisões e codornas. O significado econômico desta doença está associado ao fato da mesma acometer plantéis de aves jovens e adultas. Porém, as aves jovens de até 6 semanas de idade são o alvo principal (Carter et al., 1995). Ainda hoje, mesmo com o

desenvolvimento de vacinas eficazes, a avicultura industrial experimenta surtos da doença que podem afetar a produtividade dos plantéis.

A vacinação envolve a administração de antígenos derivados de um agente infeccioso a um animal, de modo que seja iniciada uma resposta imune e adquirida resistência contra aquele agente infeccioso. Na maioria dos animais, após uma única injeção do antígeno, nenhuma resposta é detectada durante alguns dias (período de latência). Os anticorpos tornam-se detectáveis cerca de 1 semana após a primeira imunização, aumentando até o 14^o dia e depois declinando. A resposta a uma segunda imunização é muito mais rápida e atinge níveis muito mais altos. Esta resposta é específica, já que pode ser induzida somente por um antígeno semelhante ao primeiro (Tizard, 1985). Desta forma, a possibilidade de manipular a produção de IgY através da nutrição e de um esquema de vacinações é uma alternativa que vem sendo estudada.

O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de relação entre o nível de vitamina E na dieta (nutriente imunomodulador devido principalmente à sua função antioxidante) e o título de IgY específica contra *Escherichia coli* no soro de poedeiras imunizadas contra esta bactéria. Concomitantemente, foi avaliado o papel do selênio nesta mesma função. Também objetivou-se avaliar a produção de anticorpos contra o agente causal da encefalomielite aviária, um importante patógeno das aves.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) do Departamento de Zootecnia da UFRGS, utilizando-se 90 poedeiras leves da linhagem H&N nick chick com 48 semanas de idade. A detecção de anticorpos através de ELISA nos soros foi realizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (UFRGS). As aves foram mantidas em ambiente climatizado ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), em gaiolas individuais. Cada conjunto de 16 gaiolas foi equipado com um bebedouro coletivo tipo calha e cada gaiola com um comedouro individual. Foi utilizada iluminação artificial a fim de que as aves recebessem 16 horas luz/dia.

As aves foram pesadas individualmente e distribuídas nas unidades experimentais de modo que os tratamentos apresentassem peso médio similar no início do período experimental, conforme TABELA 1.

TABELA 1. Peso médio (PM) (g) e desvio-padrão (DP) (g) por tratamento no início do experimento

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Prob
PM	1556	1504	1578	1525	1546	1462	1546	1526	1528	1632	0,7905
DP	128	116	125	154	138	126	137	93	138	108	

Durante a fase de adaptação, da 48^a à 49^a semana de idade, as aves receberam como dieta pré-experimental a mesma ração de produção que recebiam na granja de origem. No dia zero do período experimental (49^a semana de idade), as aves começaram a receber uma ração de produção, farelada, elaborada no LEZO, com diferentes níveis de vitamina E e selênio. A vitamina E

na forma de acetato de dl- α -tocoferol e o selênio na forma de selenito de sódio foram incluídos na ração após a mistura de todos os demais ingredientes. No entanto, a ração basal possuía 10 UI de vitamina E e 0,18 mg de selênio suplementados por quilograma de ração. Os demais ingredientes e a composição nutricional estão relacionados na TABELA 2.

A oferta de água foi à vontade e foi mantido um estrito controle de limpeza e das condições ambientais da sala.

TABELA 2. Composição de ingredientes e composição nutricional calculada da ração basal

Composição de ingredientes (%)	
Milho (9,0% PB)	56,24
Farelo de soja (44% PB)	28,45
Óleo de soja	3,06
Fosfato bicálcico	1,69
Calcário	9,81
Sal	0,44
DL-metionina	0,16
Premix vitamínico *	0,05
Premix mineral **	0,1
Composição nutricional calculada	
EM (kcal/kg)	2800
Proteína bruta (%)	17,0
Fósforo disponível (%)	0,45
Cálcio (%)	4,0
Lisina (%)	0,8
Metionina (%)	0,42
Met+Cys (%)	0,72
Treonina (%)	0,65

*Quantidade adicionada por quilograma de ração: Vit A 8000 UI; Vit D3 2000 UI; Vit B2 4,0mg; Vit B12 10,0mcg; Ácido Pantotênico 4,0mg; Ácido Nicotínico 20,0mg; Vit K 32,0mg.; Vit E 10 UI

**Quantidade adicionada por quilograma de ração: Selênio 0,18mg; Iodo 0,38mg; Ferro 25,0mg; Cobre 6,0mg; Zinco 60,0mg; Manganês 85,0mg

As aves foram distribuídas em 10 tratamentos, onde foram estudados 4 níveis de suplementação de vitamina E, adição ou não de selênio no nível mais

alto de vitamina E e o efeito da vacinação contra *Escherichia coli* e encefalomielite aviária na produção de imunoglobulina Y no soro das poedeiras.

Os tratamentos empregados foram:

T1 - ração sem suplementação de vit. E e sem vacinação contra *E.coli*

T2 – ração + suplementação de 50 UI vit. E/kg de ração e sem vacinação contra *E.coli*

T3 – ração + suplementação de 150 UI vit. E/kg de ração e sem vacinação contra *E.coli*

T4 – ração + suplementação de 250 UI vit. E/kg de ração e sem vacinação contra *E.coli*

T5 – ração + suplementação de 250 UI vit. E/kg de ração e 0,3 ppm de selênio e sem vacinação contra *E.coli*

T6 - ração sem suplementação de vit. E + 2 vacinações contra *E.coli*

T7 – ração + suplementação de 50 UI de vit. E/kg de ração + 2 vacinações contra *E.coli*

T8 – ração + suplementação de 150 UI vit. E/kg de ração + 2 vacinações contra *E.coli*

T9 – ração + suplementação de 250 UI vit. E/kg de ração + 2 vacinações contra *E.coli*

T10 – ração + suplementação de 250 UI vit. E/kg de ração e 0,3 ppm de selênio + 2 vacinações contra *E.coli*

TABELA 3. Níveis de VE e Se das dietas experimentais

Tratamentos	Vit E (UI/kg)	Selênio (ppm)
1 e 6	14,1	0,16
2 e 7	27,1	0,16
3 e 8	58,8	0,16
4 e 9	111,4	0,16
5 e 10	111,4	0,72

O delineamento utilizado foi o DCC (delineamento completamente casualizado), com uma ave por unidade experimental e nove aves por tratamento.

Após 2 semanas de consumo das dietas experimentais (na 51^a semana de idade das aves), foi coletado o sangue de cada ave para verificação do nível de anticorpos circulantes específicos contra *E. coli* e contra o vírus da encefalomielite aviária (VEA) (coleta 1). Imediatamente após a primeira coleta de sangue, as aves dos tratamentos 6, 7, 8, 9 e 10 foram vacinadas contra *E. coli*. A imunização foi feita via intramuscular, no músculo peitoral das aves. Foram usados 0,5 mL de uma bacterina comercial contra *E. coli* contendo cerca de 10⁹ células bacterianas/mL. A bacterina administrada às aves foi produzida a partir de 6 sorotipos de *E. coli* relacionados à colibacilose suína (K12:K88ab, O157:K88ac, O8:K87:K88ad, 987P, O101:K30:F41, K99) (Enterovac-S, Laboratório IRFA, Porto Alegre-RS). Hidróxido de alumínio foi o adjuvante incluído na vacina. A segunda imunização, com o mesmo antígeno, foi feita 2 semanas após a primeira, na 53^a semana de idade das aves.

A imunização contra encefalomielite aviária foi aplicada a todas as aves, pois o bebedouro era coletivo e a vacina teve de ser diluída na água das

mesmas. Utilizou-se a vacina viva do laboratório Fort Dodge (Provac- AE), seguindo-se as instruções de uso e dosagem contidas na bula.

As coletas de sangue 2, 3, 4, 5 e 6 foram realizadas semanalmente até o final do período experimental, ou seja, da data da primeira vacinação até 3 semanas após a segunda vacinação.

Foi realizado controle semanal do consumo de ração, bem como do peso das aves. Os ovos foram coletados nos 8 primeiros dias após a primeira vacinação. Depois disso, apenas os ovos das datas de pesagem e coleta de sangue foram coletados. Após a coleta, todos os ovos foram identificados, pesados e as gemas foram congeladas. Após cada coleta, as amostras de sangue foram incubadas em estufa a 37°C por uma hora a fim de facilitar a coagulação. O soro resultante foi centrifugado a 10.000 xg durante 3 minutos e congelado em microplacas PLATE IMMUNO 96 WELL, ROUND, MAXI (cod.15516.09). A quantificação da IgY específica contra *E. coli* nos soros foi feita por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) modificado através da técnica descrita por Ponsati (2001). O protocolo de ELISA encontra-se descrito no APÊNDICE 01. A densidade ótica (absorbância) resultante do ELISA foi lida em espectrofotômetro com filtro de 490 nm.

Para a determinação do título de Ac contra *E. coli* no soro das aves, foi feito um *pool* dos soros das aves de cada tratamento, misturando-se 20µL do soro de cada ave em um mesmo tubo com 1,5 mL e executando-se a técnica ELISA descrita no APÊNDICE 01. Determinou-se apenas o título dos soros da coleta 4, pois estes apresentaram maior densidade ótica média do que os demais. O

controle negativo considerado para cada tratamento foi o *pool* formado pelos soros da coleta 1. O título de cada um dos 10 *pools* então analisados foi considerado como a recíproca anterior da diluição em que a densidade ótica do soro da coleta 4 não diferia da densidade ótica do soro da coleta 1 em mais de 2 desvios padrões. E, portanto, não houve análise estatística.

A quantificação dos anticorpos contra o VEA também foi feita pela técnica ELISA, utilizando-se um *kit* comercial do laboratório KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland, USA) e seguindo-se o protocolo descrito nas instruções do mesmo. Utilizou-se apenas os soros da coleta 1 (como controle) e da coleta 4, pois esta já havia apresentado as maiores densidades óticas no ELISA para detecção de anticorpos contra *E. coli*. Além disso, é prática de campo fazer-se a monitoração sorológica para encefalomielite 4 semanas após a vacinação (Martins, 2000). Os títulos para EA nas coletas 1 e 4 também foram calculados através do *software* ProFile, do laboratório KPL.

TABELA 4. Cronograma experimental:

Semana	Idade (semanas)	Procedimento	Vacina E.coli*	Vacina EA**	Coleta
1	49	Pesagem das aves. Inicia consumo das dietas experimentais.			
3	51	Pesagem das aves. Coleta e pesagem diária de ovos (8 dias).	1 ^a	única	1
4	52	Pesagem das aves.			2
5	53	Pesagem das aves. Coleta/pesagem de ovos.	2 ^a		3
6	54	Pesagem das aves. Coleta/pesagem de ovos.			4
7	55	Pesagem das aves. Coleta/pesagem de ovos.			5
8	56	Pesagem das aves. Coleta/pesagem de ovos. Final do período experimental.			6

* Vacinações apenas nas aves dos tratamentos 6, 7, 8, 9, 10.

** Vacinação nas aves de todos os tratamentos.

As variáveis analisadas foram a densidade ótica dos soros, o peso das aves e o peso dos ovos.

Para análise estatística do ELISA da *E. coli*, de cada amostra de soro foram realizadas duas repetições para determinação da densidade ótica, tida como a média das duas repetições menos o branco (densidade ótica determinada para todos os reagentes da técnica com exceção do soro). Já para a EA, foram feitas apenas análises únicas de cada amostra. As densidades óticas entre os tratamentos foram comparadas pelo Least Squares Means do General Linear Models Procedure (SAS Institute, 1989), considerando-se como co-variável o valor de densidade ótica do soro controle (coletado antes da primeira vacinação).

As fontes de variação do modelo foram: 4 níveis de vitamina E, 2 níveis de selênio e 2 esquemas de vacinação. Os tratamentos foram analisados como um fatorial 5x2 (suplementação e vacinação). A fim de verificar o efeito da suplementação de Se especificamente, analisou-se o contraste entre os resultados dos tratamentos 4+9 e 5+10.

Os dados coletados foram submetidos às análises de variância utilizando-se o General Linear Models Procedure (SAS Institute, 1989).

3. Resultados e Discussão

Os resultados abaixo analisados levam em consideração os níveis calculados de vitamina E (0, 50, 150 e 250 UI/kg) e selênio (0 e 0,3 ppm) suplementados à dieta. A análise das rações mostrou níveis diferentes daqueles esperados (TABELA 3). Talvez algum problema de mistura, período de armazenagem, qualidade de matéria-prima ou ataque de agentes oxidantes possam ter ocasionado tais diferenças observadas.

Nas análises estatísticas das densidades óticas (DO) do ELISA para *E. coli*, não houve interação significativa entre os fatores Suplementação e Coleta, porém houve entre os fatores Vacina e Coleta ($P \leq 0,0001$) e Suplementação e Vacina ($P \leq 0,0326$) (APÊNDICES 12 e 13). Desta forma, os efeitos principais não serão discutidos, sendo apenas analisadas as interações significativas.

A TABELA 5 apresenta a DO durante o período experimental em função do efeito vacinação e das datas de coleta de soro para todos os tratamentos. Tanto dentro do grupo das aves vacinadas quanto do grupo das não vacinadas houve diferença significativa entre as datas de coleta para DO dos soros analisados ($P \leq 0,05$) (APÊNDICES 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 e 15). A DO é diretamente relacionada à quantidade de IgY específica contra *E. coli* presente no soro. A vacinação efetivamente aumentou a DO do soro, pois em todas as coletas (exceto na coleta 1, anterior à vacinação) as aves vacinadas apresentaram valores de DO significativamente maiores do que aqueles das aves não vacinadas ($P \leq 0,05$). Como era esperado, ambos os grupos apresentaram DO semelhantes na primeira coleta, quando ainda não havia ocorrido a primeira vacinação.

As aves vacinadas apresentaram um aumento significativo da DO durante as duas semanas seguintes à primeira vacinação (coletas 2 e 3), sendo o mesmo acentuado nas duas semanas após a segunda imunização (coletas 4 e 5). Na coleta 6, ocorreu uma diminuição na DO dos soros das aves vacinadas, voltando a não diferir significativamente dos valores encontrados nas duas semanas após a primeira imunização. Estas respostas são típicas daquelas esperadas por respostas primárias e secundárias. Como o adjuvante vacinal foi o hidróxido de alumínio, tal queda na persistência dos anticorpos poderia ser esperada pois, segundo Gupta (2001), as vacinas constituídas por compostos de alumínio não apresentam vantagem sobre soluções puras de antígeno em relação ao tempo para atingir altos títulos sangüíneos de anticorpos e duração da resposta secundária.

As aves não vacinadas não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle nas coletas 2, 3 e 6. No entanto, nas coletas 4 e 5, estas aves apresentaram soros com maior DO quando estas amostras foram comparadas com o soro controle (coleta 1), o que não era esperado devido à ausência de um desafio adicional. No trabalho de Tengerdy & Nockels (1975), o grupo controle negativo (que não foi imunizado) apresentou um título de Ac contra *E. coli* bastante elevado, provavelmente devido ao contato das aves com as bactérias inevitavelmente presentes nas gaiolas. Leshchinsky & Klasing (2001), trabalhando com 5 pintos em cada gaiola (repetição), deixaram uma ave sem imunizar para confirmar a ausência de um alto nível de Ac contra o vírus IBV (*Infectious Bursal Disease*) antes do estímulo da vacina. Tal procedimento é importante para avaliar o nível de desafio no ambiente em que o experimento é conduzido e, assim, obter-

se um controle negativo que efetivamente reflita as condições experimentais. No presente trabalho, as aves não vacinadas contra *E. coli*, que apresentaram DO mais alta nas coletas 4 e 5, provavelmente estavam respondendo a um maior desafio ambiental. Ou seja, pode-se pensar na possibilidade de que o próprio ambiente tenha proporcionado esta maior DO nas coletas 4 e 5, comparadas ao controle. Parry et al. (1977) estudaram a resposta imune de pintos SPF (*specific pathogen free*) ao desafio com *E. coli*. Os níveis sorológicos de IgY e IgA dessas aves foram muito mais baixos do que os encontrados no soro de aves de mesma idade, criadas convencionalmente. O resultado deste trabalho indica que o uso de aves SPF pode ser uma boa alternativa quando objetiva-se quantificar imunoglobulinas contra patógenos comuns ao ambiente das aves.

TABELA 5. Densidade ótica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves vacinadas e não vacinadas contra *E. coli* em função da data de coleta

Coleta	Não vacinados	Vacinados
1 Controle	0,73± 0,044 bA	0,76± 0,043 dA 1 ^a vacinação
2 7 dias após	0,85± 0,043 abB	1,02± 0,042 cA
3 14 dias após	0,82± 0,043 abB	1,08± 0,042 bcA 2 ^a vacinação
4 7 dias após	0,90± 0,041 aB	1,31± 0,041 aA
5 14 dias após	0,88± 0,041 aB	1,30± 0,041 aA
6 21 dias após	0,83± 0,043 abB	1,16± 0,043 bA

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo LSMeans. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo LSMeans.

Em todos os níveis de suplementação, houve diferença significativa na DO entre aves vacinadas e não vacinadas (TABELA 6). Dentro do grupo não vacinado, as aves que receberam 50 UI tiveram DO inferior àquelas que receberam a dieta controle e a dieta com 150 UI de VE. Tal resultado inesperado pode ser devido à dificuldade de quantificar-se corretamente as imunoglobulinas

específicas produzidas contra *E. coli*, um microorganismo amplamente distribuído no ambiente das aves. Isto é, pelo contato prévio com o microorganismo, as aves podem ter diferenças quanto à concentração de imunoglobulinas, as quais não são explicadas unicamente pelo efeito vacina ou suplementação. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas comparando-se os soros da primeira coleta (TABELA 7), porém o coeficiente de variação encontrado na análise de densidade ótica inicial dos soros das aves, foi muito alto (64,45%). Talvez isto explique a dificuldade de se trabalhar com esta bactéria, uma vez que as aves partem de valores iniciais de DO muito diferentes.

Entre as aves vacinadas, também houve diferença na DO em função da suplementação. O nível de 250 UI de VE + Se produziu menos Ac do que os níveis de 50 e 150 UI de VE/kg de ração, mas não diferiu dos níveis de 0 e 250 UI de VE. Sell et al. (1997) e Friedman et al. (1998) mostraram resultados controversos a respeito do valor do excesso de vitamina E para aves, sugerindo que há interação entre genótipo e respostas imunológicas. Boa-Amponsem et al. (2000) estudaram as respostas imunológicas de 3 diferentes linhagens de frangos de corte a dois níveis de vitamina E oferecidos na dieta (10 e 300 mg/kg) após a maturação do sistema imune. Seis dias após o desafio inicial, a vitamina E não influenciou os níveis de anticorpos das linhagens A e B. No entanto, o mais alto nível diminuiu a produção de anticorpos da linhagem C. Vinte dias após o desafio, nem a linhagem, nem a VE influenciaram o nível de Ac. Leshchinsky & Klasing (2001) sugeriram que altos níveis de VE na dieta podem alterar o número e a função dos linfócitos T helper, modulando assim a produção de citocinas, a ativação de células B e, portanto, os níveis de Ac específicos. Aqueles

pesquisadores observaram que a suplementação de VE entre 25 e 50 UI/kg apresentou o maior efeito imunomodulador. Níveis mais elevados foram menos efetivos. Além disso, níveis de 25 e 50 UI aumentaram a resposta imune para alguns índices (produção de Ac) e diminuíram a resposta em relação a outros (proliferação de linfócitos induzida por mitógenos e heterofilia). Neste mesmo trabalho, níveis de VE maiores do que 50 UI/kg de ração tiveram efeito negativo sobre a produção de Ac contra hemácias de ovinos.

A suplementação de selênio não teve efeito sobre a DO do soro das aves não vacinadas, nem sobre as vacinadas, o que pode ser observado através da comparação, pelo LSMeans, dos tratamentos suplementados com 250 UI de VE com aqueles suplementados com 250 UI de VE e selênio (TABELA 6).

TABELA 6. Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) na densidade ótica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves vacinadas e não vacinadas contra *E. coli*

Suplementação (UI VE/kg)	Sem vacina	Com vacina
0	0,92± 0,039 a	1,09± 0,038 ab
50	0,75± 0,039 b	1,15± 0,039 a
150	0,87± 0,039 a	1,16± 0,039 a
250	0,81± 0,039 ab	1,10± 0,038 ab
250+Se	0,83± 0,038 ab	1,03± 0,039 b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo LSMeans.

TABELA 7. Densidade ótica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves na primeira coleta

Tratamento	Média da DO inicial	Desvio padrão
1	0,626	0,199
2	0,594	0,162
3	0,760	0,184
4	0,597	0,162
5	0,522	0,172
6	0,843	0,162
7	0,978	0,172
8	0,725	0,172
9	0,924	0,162
10	0,979	0,184

C.V. 64,45
Prob $\geq 0,4680$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo LSMeans.

A quantidade de anticorpos contra *E. coli* medidos na coleta 4 também foi expressa como título (APÊNDICE 8). O GRÁFICO 1 mostra os títulos encontrados para cada um dos tratamentos. Com exceção dos tratamentos 5 e 6, os títulos estão de acordo com os resultados de DO encontrados. Novamente, o fato do método de quantificação não ser preciso para IgY contra *E. coli* e a alta variabilidade das respostas encontradas podem ter sido os causadores de tão alta concentração de Ac no tratamento 5 (aves não vacinadas) e tão baixa no tratamento 6 (aves vacinadas).

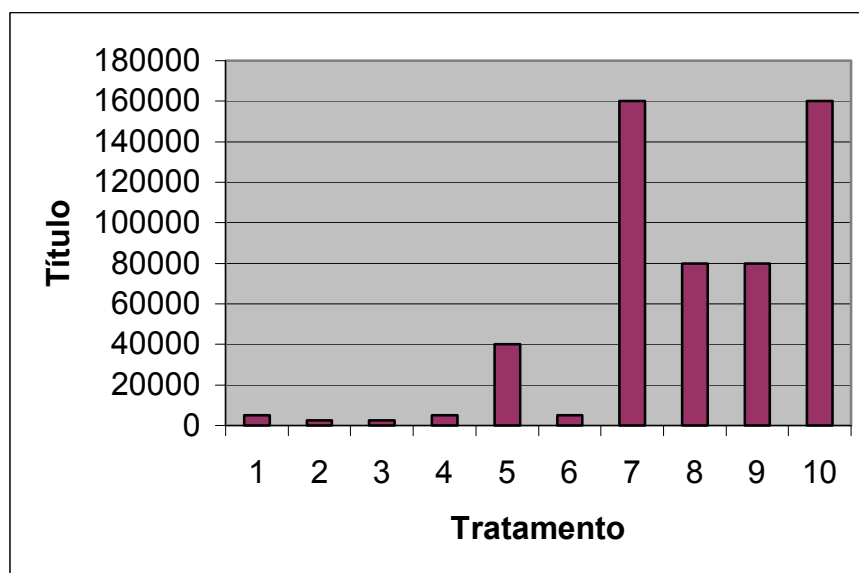


GRÁFICO 1. Títulos dos soros das aves vacinadas e não vacinadas contra *E. coli* na coleta 4

No que diz respeito ao peso médio das aves, pode ser observado na TABELA 8 que a vacinação não interferiu no peso médio das aves (APÊNDICES 10, 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

TABELA 8. Efeito da vacinação contra *E. coli* no peso médio das aves (g) ao longo do período experimental

	Semana 4*	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
Aves não-vacinadas	1550	1533	1548	1536	1525
Aves vacinadas	1565	1536	1553	1529	1569

$P \leq 0,05$

* Uma semana após a primeira vacinação

A suplementação de VE também não teve efeito sobre o peso médio das aves durante o experimento (TABELA 9). De acordo com o Manual de Manejo das poedeiras H&N nick chick (Lohmann, 1999), estas aves deveriam pesar entre 1700 e 1800 gramas no período de 49 a 56 semanas de idade e este peso tenderia a aumentar com o envelhecimento das aves. No entanto, no presente trabalho, foram verificados pesos médios mais baixos e a inexistência do ganho de peso esperado com o decorrer das semanas, apesar do consumo de ração ter sido mantido à vontade. A suplementação com selênio também não interferiu no peso médio das aves.

TABELA 9. Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) no peso médio das aves (g) ao longo do período experimental

Suplementação (UI VE/kg)	Semana 1	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
0	1509	1519	1530	1500	1538	1513	1531

50	1525	1528	1537	1521	1538	1507	1519
150	1552	1546	1570	1539	1546	1520	1539
250	1527	1540	1572	1547	1555	1561	1572
250+Se	1589	1567	1580	1565	1576	1562	1576

$P \leq 0,05$

Com relação ao peso dos ovos produzidos, observa-se que a suplementação de VE teve efeito significativo sobre o peso dos ovos nas semanas 4, 6 e 8, conforme mostra a TABELA 10 (APÊNDICES 11, 22, 23, 24, 25 e 26). Na semana 4, as aves que receberam o nível de 250 UI de VE produziram ovos mais pesados do que aquelas que receberam 50 UI. Na semana 6, os ovos das aves que receberam 250 UI foram mais pesados do que aqueles das aves que receberam 150 UI. Por fim, na semana 8, as aves do grupo controle produziram ovos mais leves do que aquelas que tiveram a dieta suplementada com 250 UI VE. O principal fator que influencia o peso do ovo, tanto na maturidade sexual quanto no período produtivo é o peso corporal, o que é mostrado no trabalho de Summers & Leeson (1993). Porém, o peso das aves foi estatisticamente semelhante durante todo o experimento, o que indicaria a contribuição da dieta para estas diferenças observadas no peso dos ovos, com resultados favoráveis à maior dose de VE. O aumento do peso de ovos com a suplementação de VE também foi observado por Puthongsiriporn et al. (2001), trabalhando com aves estressadas pelo calor. Os pesquisadores observaram que a suplementação de 65 UI de VE/ kg de ração aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) o peso e a produção de ovos quando este tratamento foi comparado ao controle (25 UI de VE). Entretanto, no presente trabalho, verificou-se que o aumento do peso dos ovos não foi linear em relação à adição de VE, o que torna inconsistente este resultado.

Diferentemente do peso das aves, o peso de ovos obtido no presente estudo foi superior àquele esperado de acordo com o Manual de Manejo desta linhagem. De acordo com o Manual, o peso médio de ovo às 49 semanas de idade é de 64,0 gramas e, às 56 semanas de idade, é de 64,7 gramas. Os dados de peso das aves e de ovos do Manual da linhagem, com os quais os dados deste trabalho estão sendo comparados, baseiam-se em uma ração com 2800 kcal EM/kg, 17% de proteína bruta, 10 a 30 UI de VE/kg e 0,2 mg de Se/kg.

Neste trabalho, a suplementação com selênio também não teve interferência sobre o peso dos ovos (TABELA 10).

TABELA 10. Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) sobre o peso médio dos ovos (g) ao longo do período experimental

Suplementação (UI VE/kg)	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
0	64,6 ab	63,2 a	64,2 ab	63,4 a	64,0 b
50	60,4 b	63,3 a	63,0 ab	64,4 a	65,7 ab
150	64,4 ab	64,2 a	62,7 b	64,7 a	64,7 ab
250	66,1 a	64,6 a	66,0 a	65,6 a	67,4 a
250+Se	65,1 ab	65,3 a	64,0 ab	64,8 a	66,3 ab

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo LSMeans.

A vacinação não influenciou o peso dos ovos, como pode ser observado na TABELA 11. Como a vacina utilizada foi constituída de bactéria inativada, era esperado que a mesma não produzisse uma fase aguda de resposta, com queda no consumo de alimentos e conseqüente queda na produção de ovos e peso de aves.

TABELA 11. Efeito da vacinação contra *E. coli* no peso médio dos ovos (g) ao longo do período experimental

	Semana 5*	Semana 6	Semana 7	Semana 8
Aves não-vacinadas	63,8	63,8	64,4	65,2

Aves vacinadas	64,5	64,2	64,8	66,0
----------------	------	------	------	------

$P \leq 0,05$
*2 semanas após a primeira vacinação

Na análise para encefalomielite aviária, observa-se na TABELA 12 que a produção de Ac foi afetada pela suplementação ($P \leq 0,13$). Aves que receberam 250 UI de VE na dieta produziram menos Ac do que aquelas que receberam 150 UI e do que as aves do grupo controle. As aves que receberam 250 UI de VE + Se suplementados, produziram mais Ac do que aquelas que receberam apenas 250 UI de VE. Ao ser utilizado também este vírus para verificar o efeito da suplementação, o objetivo foi de obter soros iniciais com baixos níveis de Ac específicos. No entanto, apesar das aves do experimento não terem sido vacinadas anteriormente contra EA, as mesmas apresentaram quantidades razoáveis de Ac no soro mesmo antes do desafio. Portanto, é possível concluir que também um vírus aviário de presumível baixa prevalência não é o antígeno adequado para medir-se o efeito da suplementação com VE e selênio sobre a produção de Ac pelas poedeiras. O GRÁFICO 2 mostra os títulos contra encefalomielite aviária obtidos a partir destes soros das coletas 1 e 4. Através dele, é possível visualizar os altos títulos que as aves já apresentavam antes da vacinação (coleta 1).

TABELA 12. Efeito da suplementação (vitamina E e selênio) sobre a densidade óptica (DO) obtida no ELISA dos soros das aves vacinadas contra encefalomielite aviária na Coleta 4

Suplementação (UI VE/kg)	DO
0	0,63± 0,038 a
50	0,60± 0,034 ab
150	0,63± 0,034 a
250	0,53± 0,031 b

250+Se 0,63± 0,037 a
Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo LSMMeans.

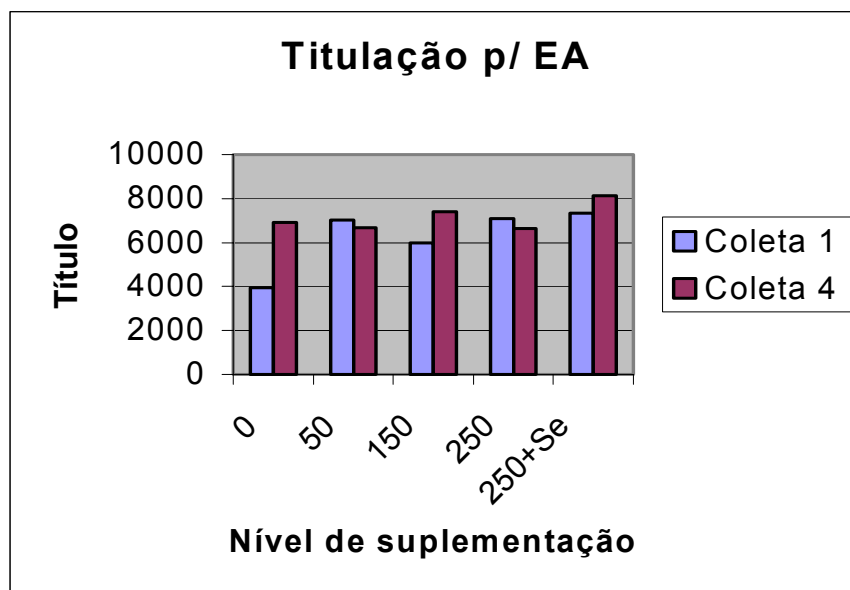


GRÁFICO 2. Títulos dos soros das aves vacinadas contra encefalomielite aviária nas coletas 1 e 4

4. Conclusões

É possível concluir que a vacinação efetivamente aumenta a quantidade de IgY específico contra *Escherichia coli* no soro das aves. No entanto, neste trabalho, os mais altos níveis de VE não apresentaram benefícios sobre a resposta imune humoral das aves. Pelo contrário, níveis médios de 50 e 150 UI produziram melhor resposta imune nas aves desafiadas quando comparadas àquelas que receberam o nível mais alto e selênio. Alguns pesquisadores já demonstraram que os efeitos da VE sobre a resposta imune humoral (produção de anticorpos) são influenciados por muitos fatores, incluindo a idade. Talvez as aves utilizadas neste experimento possam ser consideradas velhas demais para beneficiarem-se da suplementação de VE na dieta. A grande maioria dos trabalhos revisados onde a VE apresentou efeito imunomodulador foi realizada com aves bem jovens.

Além disso, tanto a *E. coli* quanto o vírus da encefalomielite aviária mostraram-se como patógenos inadequados para o desenvolvimento deste estudo, em razão das altas DO no soro inicial das aves. Talvez a utilização de antígenos completamente estranhos ao sistema imune das aves na natureza (com hemácias de ovinos, por exemplo) venha a produzir melhores resultados para a pesquisa.

O nível de 250 UI de VE reduziu a produção de anticorpos contra encefalomielite aviária pelas aves. No entanto, a adição de selênio com este nível mais alto de vitamina E (250 UI) mostrou resposta favorável na análise de anticorpos contra o vírus da encefalomielite, revertendo a redução. O mesmo efeito não foi observado na resposta contra *Escherichia coli*. A partir deste

resultado, sugere-se que selênio seja um importante mineral nas respostas imunológicas e que a dose-resposta ideal deve continuar sendo investigada.

Capítulo III

1. Considerações gerais

A vacinação contra *Escherichia coli* efetivamente aumenta a produção de imunoglobulina Y no soro das aves vacinadas.

O nível de suplementação de vitamina E para obter-se a melhor resposta imune das aves necessita ser melhor investigado. Aparentemente, para poedeiras vacinadas contra *E. coli*, níveis médios de 50 a 150 UI/kg seriam os ideais.

Aves criadas convencionalmente partem de títulos sorológicos contra *E. coli* e encefalomielite aviária muito altos para os fins deste estudo.

A adição de selênio a um alto nível de vitamina E parece ser benéfica para a produção de imunoglobulinas.

2. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2000.
- ABCS – Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Relatório de Registro e Provas Zootécnicas 2001**. Estrela: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15th ed. Washington, 1990. 972p.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I. A. Utilização de vacinas. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. A. C. **Suínocultura Intensiva: Produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília : Embrapa-SPI; Concórdia : Embrapa-CNPSa, 1998. p. 237-253.
- BOA-AMPONSEM, K. et al. Vitamin E and immune responses of broiler pureline chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.79, p. 466-470, 2000.
- BRITO, B.G. Fatores de virulência de *Escherichia coli* de origem aviária – APEC. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2, 2000, Santa Maria. **Fatores de virulência de Escherichia coli de origem aviária – APEC**. Santa Maria, 2000. p.41-49.
- CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M.; ROBERTS, A.W. **Essentials of Veterinary Microbiology**. 5th ed. Media, PA: Williams & Wilkins, 1995. 394 p.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2. ed. Artes Médicas: Porto Alegre, 1997.
- CHUNG, T.K.; BOREN, B. Vitamine E use in commercial flocks examined. **Feedstuffs**, Livingston, CA, v.71, n. 37, p.11, 1999.
- COLNAGO, G.L.; JENSEN, L.S.; LONG, P.L. Effect of selenium and vitamin E on the development of immunity to coccidiosis in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 63, p.1136-1143, 1984.
- COMBS, G.F.; NOGUCHI Jr., T.; SCOTT, M.L. Mechanism of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. **Federation Proceedings**, Washington, v. 34, p. 2090-2095, 1975.
- COSKUN, B. et al. Effects of various dietary vitamin E levels on the egg production and immunity of laying hens. **Turk Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi**, Doga, v. 21, n. 5, p. 399-406, 1997.

- ERF, G.F. et al. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 529-537, 1998.
- FERNANDES, P.C.C. et al. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Viçosa, n.31, p.53-71, 2000.
- FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 197-205.
- FRANCHINI, A. et al. Chronobiological influence of vitamin C on chicken immune functions. **Archiv fur Geflugelkunde**, Stuttgart, v. 58, n. 4, p. 165-175, 1994.
- FRIEDMAN, A.; BARTOV, I.; SKLAN, D. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 956-962, 1998.
- GASKINS, H. R. Intestinal defense mechanisms. **Feed Mix**, Doetinchem, v.5, n.1 , 1997.
- GEBREMICHAEL, A.; LEVY, E.M.; CORWIN, L.M. Adherent cell requirement for the effect of vitamin E on *in vitro* antibody synthesis. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, p. 1297-1305, 1984.
- GORE, A.B.; QURESHI, M.A. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 984-991, 1997.
- GRIMBLE, R.F. Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients. **Nutrition Research**, New York, v. 18, n. 7, p. 1297-1317, 1998.
- GUPTA, R.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Advanced Drug Delivery reviews**, New York, v. 32, p. 155-172, 1998.
- HOSSAIN, S.M. et al. Influence of dietary Vitamin E level on egg production of broiler breeders, and on the growth and immune response of progeny in comparison with the progeny from eggs injected with Vitamin E. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 73, n. 3-4, p. 307-317, 1998.
- INGLOT, A.D. et al. Seleno-organic compounds as immunostimulants: an approach to the structure-activity relationship. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Wroclaw, v. 44, n. 1, p. 67-75, 1996.
- KASPERS, B.; SCHRANNER, I.; LOSCH, U. Immunoglobulin IgA in the yolk of chicken eggs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Oxford, v. 63, n. 1-2, p. 30-37, 1990.

- KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p.1119-1125, 1998.
- LARSEN, C.T.; PIERSON, F.W.; GROSS, W.B. Effect of dietary selenium on the response of stressed and unstressed chickens to Escherichia coli challenge and antigen. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 58, n. 3, p. 169-176, 1997.
- LARSSON, A. et al. Chickens antibodies: taking advantage of evolution – a review. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1807-1812, 1993.
- LARSSON, A.; SJOQUIST, J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 13, n. 4, p. 199-201, 1990.
- LEE, N.H. et al. Effect of various hen feed supplements on IgY level in eggs and laying rates. **Korean Journal of Animal Science**, Seoul, v. 41, n. 2, p. 155-166, 1999.
- LESHCHINSKY, T.V.; KLASING, K.C. Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1590-1599, 2001.
- LI, X. et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, n. 2, p. 266-270, 1998.
- LOHMANN, L. S. L. **Classic Layer Management Guide**. Cuxhaven (Germany), 1999.
- LÖSCH, U. et al. The chicken egg, an antibody source. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 33, p. 609-619, 1986.
- MARTINS, P.C. Encefalomielite aviária. In: BERCHIERI, A., Jr.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 351-358.
- MAZIJA, H. et al. Immune response as marker of needs for vitamins in chickens. 4. The influence of vitamin E on the immune response and development of immune system organs in chickens. **Krmiva**, Strossmayerov, v. 34, n. 2, p. 77-81, 1992.
- MONTASSIER, H.J. Enfermidades do Sistema imune. In: BERCHIERI, A., Jr.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 133-150.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - N.R.C. **Nutrient Requirement of Poultry**. 9. rev. ed. Washington, DC: National Academy Press, 1994. 155p.

- PARRY, S.H.; ALLEN, W.D.; PORTER, P. Intestinal immune response to *E. coli* antigens in the germ-free chicken. **Immunology**, Atlanta, v. 32, n.5, p. 731-741, 1977.
- PONSATI, R.M. **Imunidade passiva conferida à progênie de matrizes de corte imunizadas com uma bacterina oleosa contra *Escherichia coli***. 2001. 198f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- PUTHPONGSIRIPORN, U. et al. Effects of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1190-1200, 2001.
- RHO, J.H. et al. The effect of age and vaccination of hens on the level of anti-*Streptococcus mutans* specific IgY in eggs. **Korean Journal of Animal Science**, Seoul, v. 41, n. 5, p. 563-574, 1999.
- SALLE, C.T.P.; SILVA, A.B. Prevenção de doenças / Manejo profilático / Monitoração. In: BERCHIERI, A., Jr.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 3-12.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT User's Guide**: version 6. 4th. ed. Cary, NC, 1989. v. 1, 493 p.
- SCHADE, R. et al. The production of Avian (Egg Yolk) antibodies: IgY. **The report and recommendations of ECVAM Workshop 21**. Alternatives to Laboratory Animals, Nottingham, v. 24, n. 5, p. 925-934, 1994.
- SCHMIDT, P. et al. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. II. In vitro studies on gastric and enteric digestion of egg yolk antibodies specific against pathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, Berlin, v. 36, n. 8, p. 619-628, 1989.
- SELL, J.L. et al. Influence of supplementing corn-soybean meal diets with vitamin E on performance and selected physiological traits of male turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, p. 1405-1417, 1997.
- SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K. Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, New York, v. 106, n. 2, p. 255-261, 1993.
- SIEGEL, P.B. et al. Performance of pureline broiler breeders fed two levels of vitamin E. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1258-1262, 2001.

- STRAUSS, B. **Immunity & Stress in Animal Husbandry**. Austria: Biomin Gesunde Tierernährung GesmbH, 1998. 98p.
- SUGITA-KONISHI, Y. et al. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 5, p. 886-888, 1996.
- SUMMERS, J.D.; LEESON, S. Influence of diets varying in nutrient density on the development and reproductive performance of white leghorn pullets. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1500-1509, 1993.
- SURAI, P. et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 64, p. 119-132, 1998.
- SWAIN, B.K.; JOHRI, T.S.; MAJUMDAR, S. Effect of supplementation of vitamin E, selenium and their different combinations on the performance and immune response of broilers. **British Poultry Science**, Basingstoke, v. 41, n. 3, p. 287-292, 2000.
- TENGERDY, R.P.; BROWN, J.C. Effect of vitamin E and A on humoral immunity and phagocytosis in *E. coli* infected chicken. **Poultry Science**, Champaign, v. 56, p. 957-963, 1977.
- TENGERDY, R.P.; NOCKELS, C.F. The effect of vitamin E on egg production, hatchability and humoral immune response of chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 52, p.778-783, 1973.
- TENGERDY, R.P.; NOCKELS, C.F. Vitamin E or vitamin A protects chickens against *E. coli* infection. **Poultry Science**, Champaign, v. 54, p. 1292-1296, 1975.
- TERR, A.I. Mecanismos da Inflamação. In: STITES, D.P.; TERR, A.I. (Eds.). **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1991. 187 p.
- TIZARD, I. **Introdução à imunologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1985. 329p.
- ULANOVA, M. et al. The common vaccine adjuvant aluminium hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via na interleukin-4-dependent mechanism. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 2, p. 1151-1159, 2001.
- ULLREY, D.E. Basis for regulation of selenium supplements in animal diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n.12, p. 3922-3927, 1992.

- WAKIKAWA, A. et al. Vitamin E enhances the immune function of young but not old mice under restraint stress. **Experimental Gerontology**, London, v. 34, n. 7, p. 853-862, 1999.
- WALLMANN, J.; STAAK, C.; LUGE, E. A simple method for the isolation of immunoglobulin (Y) from eggs of immunized hens. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, Berlin, v. 37, n. 4, p. 317-320, 1990.
- WIEDEMANN, V. et al. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. III. In vivo tenacity test in piglets with artificial jejunal fistula. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, Berlin, v. 37, n. 3, p. 163-172, 1990.
- YANG, N. et al. Immune competence of chicks from two lines divergently selected for antibody response to sheep red blood cells as affected by supplemental vitamin E. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, p. 799-803, 2000.
- YOKOYAMA, H. et al. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.54, n.6, p.867-872, 1993.

3. APÊNDICES

APÊNDICE 01 - Protocolo de ELISA

- 1) 100 μ L da diluição 1:160 da suspensão inativada de *E. coli* purificada em tampão de sensibilização (0,1 M Na-carbonato-bicarbonato pH 9,6) foram adicionados às placas de ELISA (Plate Immuno 96well, Round, Maxi cod.15516.09) Maxisorp, Nunc, Kkamstrub, Dinamarca) que foram incubadas em câmara úmida – dentro de um recipiente do tipo Tuperware – a 4°C por 16 horas.
- 2) As placas foram lavadas 3 vezes com 150 μ L de tampão de lavagem (PBS* pH 7,2 ; 0,05% Tween 20 ; 5% de leite em pó Molico), com intervalos de 3 minutos entre cada lavagem.
- 3) O bloqueio foi realizado com tampão de lavagem por 1 hora à temperatura ambiente.
- 4) 100 μ L das amostras de soro a serem testadas foram diluídas 1:2500 em tampão de lavagem por 1 hora à temperatura ambiente.
- 5) As placas foram lavadas como em 2).
- 6) Adicionou-se 100 μ L do conjugado *Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-Chicken IgG(H+L)*(Kirkegaard Perry Labs. Inc.) diluído 1:500 em tampão de lavagem por 1 hora à temperatura ambiente.
- 7) As placas foram lavadas com PBS pH 7,2 + 0,05% Tween 20, como em 2).
- 8) A reação foi revelada por cerca de 10 minutos com 100 μ L de uma solução de OPD (s-fenilenodiamino) 3,4 mg e 5 μ L de H₂O₂ 30 volumes em 10 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0 (preparado recentemente) e bloqueada com 50 μ L de uma solução de H₂SO₄ 12,5 %. A absorbância foi determinada a 490nm.

*PBS: solução de NaCl 0,15M e Na₂PO₄ 0,01M

APÊNDICE 02 – Densidade ótica dos soros na Coleta 1 para *Escherichia coli*

Tratamento	Coleta	Ave	Média
1	1	1.1	NC
1	1	11.1	NC
1	1	21.1	1,0655
1	1	31.1	0,1105
1	1	41.1	0,876
1	1	51.1	0,3135
1	1	61.1	0,601
1	1	71.1	0,6185
1	1	81.1	0,657

Tratamento	Coleta	Ave	Média
2	1	2.1	0,583
2	1	12.1	0,202
2	1	22.1	0,822
2	1	32.1	0,1485
2	1	42.1	0,879
2	1	52.1	1,891
2	1	62.1	0,4455
2	1	72.1	0,4675
2	1	82.1	0,356

Tratamento	Coleta	Ave	Média
3	1	3.1	0,114
3	1	13.1	0,733
3	1	23.1	0,592
3	1	33.1	0,1585
3	1	43.1	0,251
3	1	53.1	1,87
3	1	63.1	NC
3	1	73.1	0,3705
3	1	83.1	1,705

Tratamento	Coleta	Ave	Média
4	1	4.1	0,8495
4	1	14.1	0,219
4	1	24.1	0,8365
4	1	34.1	0,2315
4	1	44.1	0,1545
4	1	54.1	1,555
4	1	64.1	0,4445
4	1	74.1	0,9225
4	1	84.1	0,6005

Tratamento	Coleta	Ave	Média
5	1	5.1	0,1895
5	1	15.1	0,0775

5	1	25.1	0,292
5	1	35.1	0,3955
5	1	45.1	0,3895
5	1	55.1	0,777
5	1	65.1	1,117
5	1	75.1	NC
5	1	85.1	1,3175

Tratamento	Coleta	Ave	Média
6	1	6.1	1,142
6	1	16.1	1,1625
6	1	26.1	0,521
6	1	36.1	0,378
6	1	46.1	0,5605
6	1	56.1	1,648
6	1	66.1	0,463
6	1	76.1	1,3935
6	1	86.1	0,8615

Tratamento	Coleta	Ave	Média
7	1	7.1	0,7385
7	1	17.1	0,634
7	1	27.1	0,252
7	1	37.1	0,9655
7	1	47.1	1,168
7	1	57.1	1,9485
7	1	67.1	NC
7	1	77.1	0,8915
7	1	87.1	1,699

Tratamento	Coleta	Ave	Média
8	1	8.1	1,1985
8	1	18.1	0,609
8	1	28.1	0,2925
8	1	38.1	0,563
8	1	48.1	NC
8	1	58.1	0,6655
8	1	68.1	0,977
8	1	78.1	1,1465
8	1	88.1	0,807

Tratamento	Coleta	Ave	Média
9	1	9.1	1,3135
9	1	19.1	1,026
9	1	29.1	0,779
9	1	39.1	0,289
9	1	49.1	1,1095
9	1	59.1	1,785
9	1	69.1	0,454
9	1	79.1	1,9135
9	1	89.1	0,187

Tratamento	Coleta	Ave	Média
10	1	10.1	NC
10	1	20.1	0,562
10	1	30.1	0,5055
10	1	40.1	0,678
10	1	50.1	1,3385
10	1	60.1	1,568
10	1	70.1	NC
10	1	80.1	1,2635
10	1	90.1	1,3875

APÊNDICE 03 – Densidade ótica dos soros na coleta 2 para *Escherichia coli*

Tratamento	Coleta	Ave	Média
1	2	1.2	1,454
1	2	11.2	0,4845
1	2	21.2	1,3075
1	2	31.2	0,227
1	2	41.2	0,976
1	2	51.2	NC
1	2	61.2	0,635
1	2	71.2	0,8645
1	2	81.2	1,0675

Tratamento	Coleta	Ave	Média
2	2	2.2	0,5705
2	2	12.2	0,118
2	2	22.2	1,0495
2	2	32.2	0,184
2	2	42.2	0,5665
2	2	52.2	1,927
2	2	62.2	0,4995
2	2	72.2	0,4345
2	2	82.2	NC

Tratamento	Coleta	Ave	Média
3	2	3.2	0,2185
3	2	13.2	1,009
3	2	23.2	0,8615
3	2	33.2	NC
3	2	43.2	0,259
3	2	53.2	1,8875
3	2	63.2	1,091
3	2	73.2	0,585
3	2	83.2	1,7935

Tratamento	Coleta	Ave	Média
4	2	4.2	0,817
4	2	14.2	0,2615

4	2	24.2	0,9825
4	2	34.2	0,3085
4	2	44.2	0,6315
4	2	54.2	1,5715
4	2	64.2	NC
4	2	74.2	NC
4	2	84.2	0,829

Tratamento	Coleta	Ave	Média
5	2	5.2	0,1235
5	2	15.2	0,0535
5	2	25.2	0,843
5	2	35.2	0,3965
5	2	45.2	0,4225
5	2	55.2	0,8965
5	2	65.2	1,123
5	2	75.2	1,1565
5	2	85.2	1,1275

Tratamento	Coleta	Ave	Média
6	2	6.2	1,4915
6	2	16.2	0,914
6	2	26.2	1,171
6	2	36.2	0,6645
6	2	46.2	1,045
6	2	56.2	1,537
6	2	66.2	0,699
6	2	76.2	1,805
6	2	86.2	1,0655

Tratamento	Coleta	Ave	Média
7	2	7.2	1,248
7	2	17.2	0,4835
7	2	27.2	0,43
7	2	37.2	1,02
7	2	47.2	2,0465
7	2	57.2	2,001
7	2	67.2	1,753
7	2	77.2	1,426
7	2	87.2	1,8235

Tratamento	Coleta	Ave	Média
8	2	8.2	1,513
8	2	18.2	0,7425
8	2	28.2	0,2415
8	2	38.2	1,1655
8	2	48.2	NC
8	2	58.2	0,8725
8	2	68.2	1,042
8	2	78.2	1,654
8	2	88.2	1,3665

Tratamento	Coleta	Ave	Média
9	2	9.2	1,4355
9	2	19.2	1,048
9	2	29.2	1,364
9	2	39.2	0,397
9	2	49.2	1,628
9	2	59.2	2,019
9	2	69.2	0,6735
9	2	79.2	1,9635
9	2	89.2	1,378

Tratamento	Coleta	Ave	Média
10	2	10.2	0,157
10	2	20.2	0,9055
10	2	30.2	0,562
10	2	40.2	0,818
10	2	50.2	1,472
10	2	60.2	1,832
10	2	70.2	1,025
10	2	80.2	1,5275
10	2	90.2	1,944

APÊNDICE 04 – Densidade ótica dos soros na Coleta 3 para *Escherichia coli*

Tratamento	Coleta	Ave	Média
1	3	1.3	1,4775
1	3	11.3	0,459
1	3	21.3	1,2475
1	3	31.3	0,2405
1	3	41.3	1,013
1	3	51.3	0,2405
1	3	61.3	0,7915
1	3	71.3	0,8295
1	3	81.3	0,889

Tratamento	Coleta	Ave	Média
2	3	2.3	0,6575
2	3	12.3	0,101
2	3	22.3	1,1485
2	3	32.3	0,1785
2	3	42.3	0,6445
2	3	52.3	1,993
2	3	62.3	0,6855
2	3	72.3	0,3215
2	3	82.3	0,5285

Tratamento	Coleta	Ave	Média
3	3	3.3	0,248
3	3	13.3	NC

3	3	23.3	0,85
3	3	33.3	0,137
3	3	43.3	0,269
3	3	53.3	1,7605
3	3	63.3	1,0415
3	3	73.3	0,625
3	3	83.3	1,545

Tratamento	Coleta	Ave	Média
4	3	4.3	0,805
4	3	14.3	0,292
4	3	24.3	0,6905
4	3	34.3	NC
4	3	44.3	0,5945
4	3	54.3	NC
4	3	64.3	0,5045
4	3	74.3	1,199
4	3	84.3	0,598

Tratamento	Coleta	Ave	Média
5	3	5.3	0,2165
5	3	15.3	0,06
5	3	25.3	0,263
5	3	35.3	0,3005
5	3	45.3	0,5405
5	3	55.3	0,9515
5	3	65.3	1,247
5	3	75.3	1,2075
5	3	85.3	1,3585

Tratamento	Coleta	Ave	Média
6	3	6.3	1,3275
6	3	16.3	1,3185
6	3	26.3	0,6915
6	3	36.3	1,375
6	3	46.3	1,015
6	3	56.3	1,422
6	3	66.3	0,868
6	3	76.3	NC
6	3	86.3	0,938

Tratamento	Coleta	Ave	Média
7	3	7.3	1,2735
7	3	17.3	1,06
7	3	27.3	0,5465
7	3	37.3	1,138
7	3	47.3	2,064
7	3	57.3	1,9495
7	3	67.3	1,317
7	3	77.3	1,133
7	3	87.3	1,446

Tratamento	Coleta	Ave	Média
8	3	8.3	1,6905
8	3	18.3	1,0845
8	3	28.3	0,7595
8	3	38.3	1,3155
8	3	48.3	1,5155
8	3	58.3	1,07
8	3	68.3	1,0285
8	3	78.3	1,6715
8	3	88.3	1,224

Tratamento	Coleta	Ave	Média
9	3	9.3	NC
9	3	19.3	0,8935
9	3	29.3	1,503
9	3	39.3	0,546
9	3	49.3	1,5475
9	3	59.3	1,877
9	3	69.3	0,682
9	3	79.3	1,952
9	3	89.3	1,2655

Tratamento	Coleta	Ave	Média
10	3	10.3	0,237
10	3	20.3	1,0805
10	3	30.3	0,79
10	3	40.3	0,946
10	3	50.3	1,517
10	3	60.3	NC
10	3	70.3	1,326
10	3	80.3	1,6865
10	3	90.3	1,9725

APÊNDICE 05 – Densidade ótica dos soros na Coleta 4 para *Escherichia coli*

Tratamento	Coleta	Ave	Média
1	4	1.4	1,505
1	4	11.4	0,4545
1	4	21.4	1,067
1	4	31.4	0,3535
1	4	41.4	1,008
1	4	51.4	0,737
1	4	61.4	0,7835
1	4	71.4	0,7815
1	4	81.4	1,3435

Tratamento	Coleta	Ave	Média
2	4	2.4	0,431
2	4	12.4	0,098

2	4	22.4	0,919
2	4	32.4	0,159
2	4	42.4	0,636
2	4	52.4	2,046
2	4	62.4	0,645
2	4	72.4	0,503
2	4	82.4	NC

Tratamento	Coleta	Ave	Média
3	4	3.4	0,292
3	4	13.4	0,8645
3	4	23.4	1,1855
3	4	33.4	0,2175
3	4	43.4	0,384
3	4	53.4	1,99
3	4	63.4	1,147
3	4	73.4	0,648
3	4	83.4	1,781

Tratamento	Coleta	Ave	Média
4	4	4.4	0,6025
4	4	14.4	0,351
4	4	24.4	0,7405
4	4	34.4	0,372
4	4	44.4	0,949
4	4	54.4	1,8335
4	4	64.4	0,4835
4	4	74.4	1,2245
4	4	84.4	0,8165

Tratamento	Coleta	Ave	Média
5	4	5.4	0,258
5	4	15.4	0,047
5	4	25.4	0,217
5	4	35.4	0,3775
5	4	45.4	0,4745
5	4	55.4	1,6455
5	4	65.4	1,3415
5	4	75.4	1,1515
5	4	85.4	1,5825

Tratamento	Coleta	Ave	Média
6	4	6.4	1,194
6	4	16.4	1,5545
6	4	26.4	0,9125
6	4	36.4	1,3065
6	4	46.4	1,604
6	4	56.4	2,112
6	4	66.4	1,1675
6	4	76.4	NC
6	4	86.4	0,9115

Tratamento	Coleta	Ave	Média
7	4	7.4	1,363
7	4	17.4	1,1855
7	4	27.4	1,4255
7	4	37.4	1,664
7	4	47.4	2,107
7	4	57.4	2,0255
7	4	67.4	1,4895
7	4	77.4	1,362
7	4	87.4	2,098

Tratamento	Coleta	Ave	Média
8	4	8.4	1,5595
8	4	18.4	1,1505
8	4	28.4	0,772
8	4	38.4	1,241
8	4	48.4	1,934
8	4	58.4	1,6095
8	4	68.4	1,5185
8	4	78.4	2,043
8	4	88.4	1,5345

Tratamento	Coleta	Ave	Média
9	4	9.4	1,6045
9	4	19.4	0,9935
9	4	29.4	1,514
9	4	39.4	0,8375
9	4	49.4	1,6335
9	4	59.4	2,0315
9	4	69.4	0,898
9	4	79.4	2,0835
9	4	89.4	1,7795

Tratamento	Coleta	Ave	Média
10	4	10.4	0,2885
10	4	20.4	1,159
10	4	30.4	1,202
10	4	40.4	1,0795
10	4	50.4	1,9575
10	4	60.4	1,982
10	4	70.4	1,5995
10	4	80.4	1,8935
10	4	90.4	2,006

APÊNDICE 06 – Densidade ótica dos soros na Coleta 5 para *Escherichia coli*

Tratamento	Coleta	Ave	Média
1	5	1.5	1,42
1	5	11.5	0,351

1	5	21.5	0,969
1	5	31.5	0,2105
1	5	41.5	1,111
1	5	51.5	0,4605
1	5	61.5	0,949
1	5	71.5	0,8185
1	5	81.5	1,3455

Tratamento	Coleta	Ave	Média
2	5	2.5	0,4875
2	5	12.5	0,0795
2	5	22.5	1,2335
2	5	32.5	0,2075
2	5	42.5	0,5655
2	5	52.5	2,0055
2	5	62.5	0,8695
2	5	72.5	0,396
2	5	82.5	0,652

Tratamento	Coleta	Ave	Média
3	5	3.5	0,2105
3	5	13.5	0,962
3	5	23.5	0,892
3	5	33.5	0,198
3	5	43.5	0,281
3	5	53.5	1,953
3	5	63.5	1,291
3	5	73.5	0,6075
3	5	83.5	1,7045

Tratamento	Coleta	Ave	Média
4	5	4.5	0,709
4	5	14.5	0,2735
4	5	24.5	0,5615
4	5	34.5	0,3245
4	5	44.5	1,052
4	5	54.5	1,412
4	5	64.5	0,4805
4	5	74.5	1,396
4	5	84.5	0,789

Tratamento	Coleta	Ave	Média
5	5	5.5	0,1645
5	5	15.5	0,0825
5	5	25.5	0,2935
5	5	35.5	0,359
5	5	45.5	0,629
5	5	55.5	1,0175
5	5	65.5	1,2765
5	5	75.5	1,31
5	5	85.5	1,629

Tratamento	Coleta	Ave	Média
6	5	6.5	1,27
6	5	16.5	1,604
6	5	26.5	1,128
6	5	36.5	1,8315
6	5	46.5	1,9345
6	5	56.5	2,11
6	5	66.5	0,597
6	5	76.5	1,708
6	5	86.5	1,1525

Tratamento	Coleta	Ave	Média
7	5	7.5	1,303
7	5	17.5	1,0715
7	5	27.5	1,1425
7	5	37.5	1,86
7	5	47.5	2,118
7	5	57.5	2,0385
7	5	67.5	1,4765
7	5	77.5	1,4965
7	5	87.5	2,1165

Tratamento	Coleta	Ave	Média
8	5	8.5	1,5725
8	5	18.5	1,2305
8	5	28.5	0,8
8	5	38.5	1,268
8	5	48.5	2,064
8	5	58.5	1,323
8	5	68.5	1,2585
8	5	78.5	2,0855
8	5	88.5	1,1275

Tratamento	Coleta	Ave	Média
9	5	9.5	1,5195
9	5	19.5	0,8985
9	5	29.5	1,503
9	5	39.5	0,7255
9	5	49.5	1,8205
9	5	59.5	2,0515
9	5	69.5	0,817
9	5	79.5	2,0845
9	5	89.5	1,345

Tratamento	Coleta	Ave	Média
10	5	10.5	0,4
10	5	20.5	1,2965
10	5	30.5	1,109
10	5	40.5	1,2925
10	5	50.5	1,8965

10	5	60.5	2,006
10	5	70.5	1,8395
10	5	80.5	1,681
10	5	90.5	2,033

APÊNDICE 07 – Densidade ótica dos soros na Coleta 6 para *Escherichia coli*

Tratamento	Coleta	Ave	Média
1	6	1.6	1,0415
1	6	11.6	0,6665
1	6	21.6	1,1565
1	6	31.6	0,209
1	6	41.6	1,083
1	6	51.6	0,3745
1	6	61.6	0,963
1	6	71.6	0,738
1	6	81.6	0,9585

Tratamento	Coleta	Ave	Média
2	6	2.6	0,2595
2	6	12.6	0,0905
2	6	22.6	1,0255
2	6	32.6	0,1955
2	6	42.6	0,0635
2	6	52.6	NC
2	6	62.6	0,941
2	6	72.6	0,356
2	6	82.6	0,7325

Tratamento	Coleta	Ave	Média
3	6	3.6	0,314
3	6	13.6	1,1295
3	6	23.6	1,147
3	6	33.6	0,134
3	6	43.6	0,2305
3	6	53.6	1,7145
3	6	63.6	1,199
3	6	73.6	0,6015
3	6	83.6	1,657

Tratamento	Coleta	Ave	Média
4	6	4.6	0,5245
4	6	14.6	0,2045
4	6	24.6	0,0435
4	6	34.6	0,3025
4	6	44.6	1,1115
4	6	54.6	1,31
4	6	64.6	0,3645
4	6	74.6	1,0425
4	6	84.6	0,587

Tratamento	Coleta	Ave	Média
5	6	5.6	0,2275
5	6	15.6	0,0425
5	6	25.6	NC
5	6	35.6	0,2175
5	6	45.6	0,575
5	6	55.6	1,017
5	6	65.6	1,0065
5	6	75.6	1,1815
5	6	85.6	1,418

Tratamento	Coleta	Ave	Média
6	6	6.6	1,338
6	6	16.6	1,151
6	6	26.6	0,6605
6	6	36.6	1,601
6	6	46.6	1,2255
6	6	56.6	2,08
6	6	66.6	0,9065
6	6	76.6	1,4985
6	6	86.6	1,2175

Tratamento	Coleta	Ave	Média
7	6	7.6	1,323
7	6	17.6	0,762
7	6	27.6	NC
7	6	37.6	1,6115
7	6	47.6	2,0485
7	6	57.6	1,9225
7	6	67.6	1,5485
7	6	77.6	1,3015
7	6	87.6	2,0775

Tratamento	Coleta	Ave	Média
8	6	8.6	1,603
8	6	18.6	1,236
8	6	28.6	0,78
8	6	38.6	0,8645
8	6	48.6	1,9975
8	6	58.6	NC
8	6	68.6	1,1225
8	6	78.6	NC
8	6	88.6	0,5885

Tratamento	Coleta	Ave	Média
9	6	9.6	1,157
9	6	19.6	1,1195
9	6	29.6	1,432
9	6	39.6	0,5765
9	6	49.6	2,0585

9	6	59.6	1,958
9	6	69.6	0,8445
9	6	79.6	2,0335
9	6	89.6	1,275

Tratamento	Coleta	Ave	Média
10	6	10.6	0,589
10	6	20.6	1,1425
10	6	30.6	1,045
10	6	40.6	1,3065
10	6	50.6	1,6285
10	6	60.6	2,0225
10	6	70.6	1,6805
10	6	80.6	0,864
10	6	90.6	1,9915

APÊNDICE 08 – Títulos dos soros para *Escherichia coli*

Trat 1										
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	0,98	0,236	0,608	0,5261	1,0522	-0,4442	1,6602	0,296	0,322	0,309
2500	0,639	0,204	0,4215	0,3076	0,6152	-0,1937	1,0367	0,394	0,334	0,364
5000	0,3	0,374	0,337	0,0523	0,1047	0,2323	0,4417	0,428	0,46	0,444
10000	0,1	0,204	0,152	0,0735	0,1471	0,0049	0,2991	0,282	0,294	0,288
20000	0,086	0,086	0,086	0,0000	0,0000	0,0860	0,0860	0,128	0,146	0,137
40000	0,086	0,108	0,097	0,0156	0,0311	0,0659	0,1281	0,086	0,089	0,0875
80000	0,051	0,073	0,062	0,0156	0,0311	0,0309	0,0931	0,061	0,066	0,0635
160000	0,06	0,056	0,058	0,0028	0,0057	0,0523	0,0637	0,058	0,082	0,07
Trat 2										
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	0,133	0,154	0,1435	0,0148	0,0297	0,1138	0,1732	0,29	0,258	0,274
2500	0,135	0,109	0,122	0,0184	0,0368	0,0852	0,1588	0,221	0,233	0,227
5000	0,149	0,193	0,171	0,0311	0,0622	0,1088	0,2332	0,219	0,164	0,1915
10000	0,081	0,148	0,1145	0,0474	0,0948	0,0197	0,2093	0,192	0,122	0,157
20000	0,055	0,046	0,0505	0,0064	0,0127	0,0378	0,0632	0,083	0,083	0,083
40000	0,054	0,099	0,0765	0,0318	0,0636	0,0129	0,1401	0,091	0,089	0,09
80000	0,049	0,078	0,0635	0,0205	0,0410	0,0225	0,1045	0,053	0,04	0,0465
160000	0,068	0,058	0,063	0,0071	0,0141	0,0489	0,0771	0,056	0,047	0,0515
Trat 3										
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	0,215	0,208	0,2115	0,0049	0,0099	0,2016	0,2214	0,358	0,208	0,283
2500	0,131	0,139	0,135	0,0057	0,0113	0,1237	0,1463	0,249	0,175	0,212
5000	0,118	0,129	0,1235	0,0078	0,0156	0,1079	0,1391	0,156	0,119	0,1375
10000	0,103	0,089	0,096	0,0099	0,0198	0,0762	0,1158	0,099	0,084	0,0915
20000	0,066	0,11	0,088	0,0311	0,0622	0,0258	0,1502	0,083	0,097	0,09
40000	0,094	0,135	0,1145	0,0290	0,0580	0,0565	0,1725	0,086	0,076	0,081
80000	0,052	0,06	0,056	0,0057	0,0113	0,0447	0,0673	0,06	0,04	0,05
160000	0,05	0,05	0,05	0,0000	0,0000	0,0500	0,0500	0,054	0,057	0,0555
Trat 4										
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4

1250	0,408	0,735	0,5715	0,2312	0,4624	0,1091	1,0339	1,408	1,493	1,4505
2500	0,506	0,595	0,5505	0,0629	0,1259	0,4246	0,6764	1,126	1,203	1,1645
5000	0,424	0,429	0,4265	0,0035	0,0071	0,4194	0,4336	0,31	0,354	0,332
10000	0,292	0,319	0,3055	0,0191	0,0382	0,2673	0,3437	0,276	0,26	0,268
20000	0,202	0,193	0,1975	0,0064	0,0127	0,1848	0,2102	0,132	0,087	0,1095
40000	0,101	0,058	0,0795	0,0304	0,0608	0,0187	0,1403	0,059	0,058	0,0585
80000	0,085	0,049	0,067	0,0255	0,0509	0,0161	0,1179	0,051	0,055	0,053
160000	0,102	0,071	0,0865	0,0219	0,0438	0,0427	0,1303	0,064	0,053	0,0585
Trat	5									
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	1,028	0,958	0,993	0,0495	0,0990	0,8940	1,0920	1,38	1,367	1,3735
2500	0,504	0,591	0,5475	0,0615	0,1230	0,4245	0,6705	1,126	1,139	1,1325
5000	0,258	0,37	0,314	0,0792	0,1584	0,1556	0,4724	0,802	0,657	0,7295
10000	0,07	0,163	0,1165	0,0658	0,1315	-0,0150	0,2480	0,407	0,331	0,369
20000	0,061	0,058	0,0595	0,0021	0,0042	0,0553	0,0637	0,064	0,078	0,071
40000	0,047	0,048	0,0475	0,0007	0,0014	0,0461	0,0489	0,056	0,059	0,0575
80000	0,065	0,05	0,0575	0,0106	0,0212	0,0363	0,0787	0,053	0,05	0,0515
160000	0,05	0,047	0,0485	0,0021	0,0042	0,0443	0,0527	0,048	0,049	0,0485
Trat	6									
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	1,16	1,081	1,1205	0,0559	0,1117	1,0088	1,2322	1,635	1,667	1,651
2500	0,946	0,817	0,8815	0,0912	0,1824	0,6991	1,0639	1,471	0,446	0,9585
5000	0,604	0,55	0,577	0,0382	0,0764	0,5006	0,6534	1,202	1,274	1,238
10000	0,39	0,111	0,2505	0,1973	0,3946	-0,1441	0,6451	0,395	0,681	0,538
20000	0,113	0,076	0,0945	0,0262	0,0523	0,0422	0,1468	0,127	0,189	0,158
40000	0,062	0,055	0,0585	0,0049	0,0099	0,0486	0,0684	0,092	0,108	0,1
80000	0,053	0,051	0,052	0,0014	0,0028	0,0492	0,0548	0,076	0,068	0,072
160000	0,046	0,047	0,0465	0,0007	0,0014	0,0451	0,0479	0,064	0,067	0,0655
Trat	7									
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	1,521	1,436	1,4785	0,0601	0,1202	1,3583	1,5987	1,668	1,681	1,6745
2500	1,296	1,278	1,287	0,0127	0,0255	1,2615	1,3125	1,603	1,57	1,5865
5000	0,998	0,978	0,988	0,0141	0,0283	0,9597	1,0163	1,549	1,529	1,539

10000	0,775	0,706	0,7405	0,0488	0,0976	0,6429	0,8381	1,354	1,294	1,324
20000	0,498	0,43	0,464	0,0481	0,0962	0,3678	0,5602	0,987	0,969	0,978
40000	0,347	0,301	0,324	0,0325	0,0651	0,2589	0,3891	0,609	0,649	0,629
80000	0,237	0,204	0,2205	0,0233	0,0467	0,1738	0,2672	0,393	0,441	0,417
160000	0,136	0,097	0,1165	0,0276	0,0552	0,0613	0,1717	0,207	0,183	0,195
Trat 8										
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	1,313	1,313	1,313	0,0000	0,0000	1,3130	1,3130	1,32	1,432	1,376
2500	1,027	1,011	1,019	0,0113	0,0226	0,9964	1,0416	1,415	1,452	1,4335
5000	0,846	0,879	0,8625	0,0233	0,0467	0,8158	0,9092	1,283	1,057	1,17
10000	0,611	0,537	0,574	0,0523	0,1047	0,4693	0,6787	0,861	0,634	0,7475
20000	0,36	0,392	0,376	0,0226	0,0453	0,3307	0,4213	0,641	0,549	0,595
40000	0,224	0,247	0,2355	0,0163	0,0325	0,2030	0,2680	0,354	0,342	0,348
80000	0,188	0,199	0,1935	0,0078	0,0156	0,1779	0,2091	0,265	0,237	0,251
160000	0,144	0,087	0,1155	0,0403	0,0806	0,0349	0,1961	0,111	0,113	0,112
Trat 9										
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	1,297	1,342	1,3195	0,0318	0,0636	1,2559	1,3831	1,631	1,622	1,6265
2500	0,881	0,929	0,905	0,0339	0,0679	0,8371	0,9729	1,457	1,43	1,4435
5000	0,6	0,678	0,639	0,0552	0,1103	0,5287	0,7493	1,089	1,046	1,0675
10000	0,377	0,391	0,384	0,0099	0,0198	0,3642	0,4038	0,768	0,681	0,7245
20000	0,246	0,256	0,251	0,0071	0,0141	0,2369	0,2651	0,54	0,432	0,486
40000	0,214	0,187	0,2005	0,0191	0,0382	0,1623	0,2387	0,376	0,351	0,3635
80000	0,165	0,145	0,155	0,0141	0,0283	0,1267	0,1833	0,218	0,208	0,213
160000	0,071	0,103	0,087	0,0226	0,0453	0,0417	0,1323	0,094	0,102	0,098
Trat 10										
Titulação	Coleta 1	Coleta 1	Média 1	Desvio 1	2 X DP	Abs. Mínima	Abs. Máxima	Coleta 4	Coleta 4	Média 4
1250	1,425	1,473	1,449	0,0339	0,0679	1,3811	1,5169	1,686	1,702	1,694
2500	0,2	0,53	0,365	0,2333	0,4667	-0,1017	0,8317	1,614	1,621	1,6175
5000	0,934	0,944	0,939	0,0071	0,0141	0,9249	0,9531	1,522	1,526	1,524
10000	0,668	0,674	0,671	0,0042	0,0085	0,6625	0,6795	1,341	1,264	1,3025
20000	0,471	0,461	0,466	0,0071	0,0141	0,4519	0,4801	1,029	0,995	1,012
40000	0,307	0,311	0,309	0,0028	0,0057	0,3033	0,3147	0,693	0,674	0,6835

80000	0,238	0,238	0,238	0,0000	0,0000	0,2380	0,2380	0,434	0,46	0,447
160000	0,094	0,146	0,12	0,0368	0,0735	0,0465	0,1935	0,247	0,247	0,247

APÊNDICE 09 – Densidade ótica dos soros para encefalomielite aviária

Trat	VE Suplem(UI/kg)	Ave	Coleta 1	Coleta 4
1	0	1	0	0,8151
1	0	11	0	0,6184
1	0	21	0,5635	0,5731
1	0	31	0	0,6291
1	0	41	0,5887	0,6104
1	0	51	0,697	0,8144
1	0	61	0	0,5973
1	0	71	0,1543	0,2545
1	0	81	0	0,4069
6	0	6	0,3941	0,6195
6	0	16	0,398	0,6175
6	0	26	0,7714	0,8852
6	0	36	0,4557	0,4663
6	0	46	0,5922	0,605
6	0	56	0,514	0,4851
6	0	66	0	0,5563
6	0	76	0,1988	0
6	0	86	0,4187	0,487
2	50	2	0,6774	0,7078
2	50	12	0,6135	0,6231
2	50	22	0,7858	0,6543
2	50	32	0,4487	0,66
2	50	42	0,6052	0,747
2	50	52	0	0,7096
2	50	62	0	0,6532
2	50	72	0,5023	0,3779
2	50	82	0	0
7	50	7	0	0,6696
7	50	17	0,3774	0,4767
7	50	27	0,1405	0,4647
7	50	37	0,5733	0,4337
7	50	47	0,7761	0,7774
7	50	57	0,6053	0,5599
7	50	67	0	0,474
7	50	77	0,6847	0,5956
7	50	87	0,6925	0,6436
3	150	3	0,7571	0,8367
3	150	13	0,503	0,5454
3	150	23	0,6616	0,649
3	150	33	0,3571	0,5351
3	150	43	0	0,7742
3	150	53	0,5271	0,4116
3	150	63	0	0,4225
3	150	73	0,1271	0,4644
3	150	83	0	0,4989
8	150	8	0,5676	0,6751
8	150	18	0,7487	0,7879
8	150	28	0,6973	0,82
8	150	38	0,7242	0,8203
8	150	48	0	0,7121

8	150	58	0,6224	0,5634
8	150	68	0,675	0,4948
8	150	78	0,6031	0,6575
8	150	88	0	0,6538
4	250	4	0,6057	0,5195
4	250	14	0,6025	0,6338
4	250	24	0,6097	0,6789
4	250	34	0	0,8407
4	250	44	0	0,7317
4	250	54	0,7494	0,5178
4	250	64	0,7015	0,5508
4	250	74	0,54	0,4109
4	250	84	0,7025	0,6498
9	250	9	0,7984	0,9602
9	250	19	0,7088	0,658
9	250	29	0,5345	0,6181
9	250	39	0,4735	0,4979
9	250	49	0,7002	0,6289
9	250	59	0,3427	0,3683
9	250	69	0,3048	0,2599
9	250	79	0,7271	0,1195
9	250	89	0,5897	0,661
5	250+Se	5	0,5378	0,6431
5	250+Se	15	0,4445	0,5069
5	250+Se	25	0,7583	0,8388
5	250+Se	35	0,7945	0,8085
5	250+Se	45	0,8021	0,7835
5	250+Se	55	0	0,4302
5	250+Se	65	0,6847	0,5065
5	250+Se	75	0	0,3793
5	250+Se	85	0,4529	0,6786
10	250+Se	10	0	0,7099
10	250+Se	20	0,1375	0,3576
10	250+Se	30	0,6789	0,5287
10	250+Se	40	0,8762	0,9067
10	250+Se	50	0,5084	0,5862
10	250+Se	60	0	0,5482
10	250+Se	70	0	0,3981
10	250+Se	80	0	0,6688
10	250+Se	90	0	0,6126

APÊNDICE 10 – Peso das aves durante o período experimental

Ave	Trat	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7
1	1	1537	1429	1407	1384	1419	1460	1445
2	2	1433	1508	1486	1467	1457	1490	1491
3	3	1686	1697	1704	1678	1691	1691	1677
4	4	1474	1548	1512	1448	1462	1507	1529
5	5	1639	1709	1755	1670	1683	1678	1654
6	6	1480	1448	1510	1463	1440	1461	1495
7	7	1386	1463	1400	1445	1485	1396	1542
8	8	1563	1653	1700	1656	1657	1615	1721
9	9	1534	1535	1730	1712	1666	1700	1681
10	10	1651	1658	1720	1606	1688	1650	1681
11	1	1433	1480	1520	1464	1566	1466	1484
12	2	1519	1503	1522	1466	1541	1546	1505
13	3	1570	1669	1650	1559	1652	1616	1666
14	4	1549	1563	1556	1563	1561	1588	1576
15	5	1782	1830	1763	1812	1750	1721	1696
16	6	1586	1540	1600	1485	1565	1493	1510
17	7	1661	1796	1786	1770	1867	1735	1746
18	8	1412	1381	1445	1373	1413	1395	1475
19	9	1287	1347	1330	1369	1332	1335	1406
20	10	1482	1569	1560	1543	1611	1588	1810
21	1	1564	1631	1576	1549	1610	1572	1581
22	2	1478	1596	1514	1567	1603	1522	1500
23	3	1657	1689	1697	1559	1678	1650	1323
24	4	1654	1566	1669	1587	1578	1686	1584
25	5	1522	1509	1507	1501	1500	1513	1492
26	6	1268	1857	1853	1824	1800	1780	1846
27	7	1601	1562	1647	1650	1569	1568	1561
28	8	1527	1441	1501	1485	1383	1400	1472
29	9	1362	1425	1460	1353	1436	1421	1469
30	10	1602	1613	1685	1615	1629	1610	1579
31	1	1810	1713	1691	1685	1707	1715	1711
32	2	1370	1325	1392	1335	1328	1369	1343
33	3	1573	1656	1618	1658	1547	1569	1640
34	4	1714	1647	1695	1731	1693	1654	1672
35	5	1514	1593	1534	1584	1508	1511	1515
36	6	1684	1678	1693	1623	1660	1643	1665
37	7	1393	1301	1354	1375	1328	1341	1345
38	8	1481	1448	1498	1464	1470	1390	1471
39	9	1503	1628	1665	1634	1646	1673	1828
40	10	1655	1492	1625	1557	1548	1530	1597
41	1	1448	1510	1488	1454	1462	1470	1446
42	2	1650	1693	1657	1630	1607	1600	1608
43	3	1557	1627	1640	1618	1685	1619	1645
44	4	1331	1397	1409	1309	1378	1530	1458
45	5	1571	1537	1497	1551	1505	1428	1452
46	6	1440	1335	1400	1389	1584	1426	1447
47	7	1483	1464	1488	1468	1463	1441	1494
48	8	1720	1645	1640	1670	1624	1606	1732
49	9	1600	1548	1480	1537	1535	1460	1490
50	10	1530	1468	1480	1524	1533	1447	1470

51	1	1508	1559	1505	1510	1532	1496	1510
52	2	1666	1635	1631	1599	1630	1541	morta
53	3	1402	1354	1458	1454	1360	1315	1376
54	4	1650	1694	1714	1692	1667	1692	1730
55	5	1550	1465	1514	1457	1513	1529	1541
56	6	1347	1274	1306	1292	1245	1380	1385
57	7	1822	1764	1767	1707	1693	1651	1700
58	8	1540	1540	1623	1556	1527	1557	1562
59	9	1468	1481	1504	1471	1459	1507	1493
60	10	1578	1497	1548	1515	1544	1493	1529
61	1	1722	1704	1721	1712	1730	1728	1744
62	2	1409	1446	1438	1386	1389	1410	1340
63	3	1774	1627	1647	1616	1657	1622	1568
64	4	1590	1474	1483	1567	1600	1507	1483
65	5	1626	1605	1547	1533	1507	1527	1508
66	6	1406	1303	1350	1323	1344	1352	1466
67	7	1570	1669	1647	1588	1665	1609	1637
68	8	1586	1560	1586	1514	1473	1482	1518
69	9	1671	1609	1660	1602	1615	1657	1589
70	10	1823	1577	1510	1595	1602	1668	1700
71	1	1524	1420	1407	1452	1471	1406	1447
72	2	1622	1473	1480	1543	1533	1500	1538
73	3	1599	1501	1566	1558	1543	1466	1526
74	4	1519	1515	1585	1504	1584	1481	1500
75	5	1401	1381	1416	1446	1477	1377	1439
76	6	1535	1467	1512	1428	1460	1405	1440
77	7	1503	1485	1574	1501	1528	1501	1548
78	8	1436	1451	1412	1413	1400	1385	1394
79	9	1650	1669	1725	1645	1684	1681	1682
80	10	1764	1682	1726	1701	1697	1754	1679
81	1	1460	1598	1572	1556	1582	1573	1539
82	2	1385	1365	1401	1406	1480	1482	1496
83	3	1387	1391	1380	1372	1475	1478	1378
84	4	1246	1393	1371	1424	1352	1336	1328
85	5	1306	1443	1455	1374	1411	1498	1463
86	6	1416	1398	1428	1408	1512	1404	1399
87	7	1499	1448	1473	1482	1519	1419	1448
88	8	1472	1498	1495	1505	1584	1498	1561
89	9	1676	1686	1740	1697	1736	1687	1796
90	10	1600	1585	1595	1585	1654	1590	1563

APÊNDICE 11 – Peso dos ovos durante o período experimental

Ave	Trat	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7
1	1	59,40	59,03	56,23	56,89	62,82
2	2	69,82	69,78	65,26	60	69,8
3	3	64,68	65,14	63,47	71,07	69,26
4	4	64,36	60,97	64,59	68,08	65,03
5	5	68,38	70,16	68,63	64,69	68,85
6	6	58,70	59,06	67,45	60,71	60,03
7	7	63,48	61,93	62,12	63	66,13

8	8	63,64	66,01	61,25	62,52	61,61
9	9	62,09	66,47	68,76	58,76	71
10	10	64,43	66,85	70,7	64,14	64,37
11	1	69,99	68,62	69,08	73,39	65,08
12	2	70,08	70,04	71,41	73,09	68,34
13	3	60,89	60,97	62,07	59,51	58,67
14	4	63,05	61,18	59,98	64	65,21
15	5	70,19	59,76	68,87	65,84	68,32
16	6	59,24	60,9	57,27	59,15	61,89
17	7	68,51	68,45	64,77	71,72	72,22
18	8	54,93	52,67	54,87	60,57	57,57
19	9	60,26	55,07	63,49	59,37	64,58
20	10	64,98	65,91	61,52	62,61	68,25
21	1	67,07	63,89	68,06	66,58	60,18
22	2	0,00	59,86	62,13	59,39	61,68
23	3	65,33	66,42	62,72	65,02	66,19
24	4	66,47	66,87	69,88	66,56	65,34
25	5	60,87	62,57	60,15	63,2	64,89
26	6	71,46	72,75	73,24	68,07	70,96
27	7	72,36	65,25	69,45	73,23	68,8
28	8	62,78	57,58	62,9	61,66	58,36
29	9	65,46	61,63	65,05	72,43	65,92
30	10	65,00	63,32	67,43	66,21	63,39
31	1	63,81	57	0	0	65,01
32	2	56,71	60,77	54,85	62,57	57,34
33	3	65,34	62,74	66,54	65,9	67,11
34	4	67,60	62,93	73,71	69,51	68,39
35	5	65,04	89,06	67,79	67,4	72,01
36	6	65,31	64,73	63,92	68,46	65,93
37	7	62,10	61,63	64,41	64,69	60,74
38	8	56,19	62,4	59,06	61,51	61,74
39	9	76,37	74,69	69,23	70,49	73,46
40	10	63,66	61	58,06	66,97	66,72
41	1	66,44	59,61	61,78	64,09	63,32
42	2	55,79	57,65	58,62	57,27	60,89
43	3	67,56	68,19	69,1	67,56	65,97
44	4	67,56	0	0	60,88	66,31
45	5	62,43	61,05	63,46	57,75	60,45
46	6	70,42	68,42	63,92	69,23	67,94
47	7	59,54	63,17	62,71	67,24	67,89
48	8	71,13	63,41	64,71	57,86	66,72
49	9	70,24	68,66	66,23	67,34	70,17
50	10	61,98	60,43	59,23	60,53	60,77
51	1	65,88	63,56	69,18	65	66,24
52	2	60,28	59,47	55,08	60,97	0
53	3	69,34	67,18	67,64	65,39	75,14
54	4	60,71	62,46	63,78	59,78	60,62
55	5	73,13	71,54	68,02	78,43	79,62
56	6	69,45	67,68	0	60,38	69,25
57	7	65,18	65,84	68,91	68,96	66,94
58	8	71,71	71,44	0	71,76	78,1
59	9	68,63	71,52	64,66	67,97	75,29
60	10	64,73	62,47	65,81	61,12	65,67

61	1	63,20	64,27	62,48	60,48	63,74
62	2	58,72	54,95	58,47	58,9	63,78
63	3	59,47	60,08	56,73	60,88	57,9
64	4	69,31	0	67,3	0	71,31
65	5	63,06	62,84	53,92	67,26	60,26
66	6	60,96	58,4	63,21	61,57	59,73
67	7	70,53	68,51	64,46	62,11	68,4
68	8	66,97	65,33	66,85	71,71	0
69	9	64,40	64,32	65,57	60,43	63,82
70	10	0,00	0	0	0	0
71	1	65,22	62,53	63,71	66,03	64,55
72	2	60,06	0	0	0	0
73	3	70,11	77,43	69,64	71,68	70,36
74	4	68,17	65,66	67,77	67,2	73,03
75	5	60,73	60,03	63,85	61,53	63,36
76	6	67,65	71,35	68,17	60,61	65,82
77	7	72,54	68,92	64,8	68,44	71,68
78	8	60,41	55,69	55,55	61,85	59,38
79	9	63,06	62,19	59,01	66,62	62,5
80	10	68,52	66,01	69,79	63,1	63,03
81	1	61,28	62,87	60,88	61,39	60,63
82	2	56,65	56,85	0	0	0
83	3	57,61	61,37	53,6	58,63	57,71
84	4	66,14	62,2	68,38	66,25	60,49
85	5	63,88	62,83	58,49	62,72	68,17
86	6	57,82	52,08	58,64	55,25	58,21
87	7	64,30	66,08	64,64	63,84	67,58
88	8	71,70	71,89	69,98	69,03	68,58
89	9	65,39	69,41	63,81	70,23	69,86
90	10	64,12	65,28	61,43	68,42	69,63

APÊNDICE 12 – Análise da variância para densidade ótica dos soros das aves vacinadas e não-vacinadas contra E. coli utilizando todas as interações

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	0.52	0.13	1.67	0.1568
VACINA	1	8.34	8.34	107.62	0.0001
COLETA	5	7.11	1.42	18.35	0.0001
DOinicial	1	69.51	69.51	896.88	0.0001
VACINA*COLETA	5	2.28	0.46	5.87	0.0001
Suplementação*VACINA	4	0.82	0.21	2.65	0.0326
Suplementação*COLETA	20	0.34	0.02	0.22	0.9999
ERRO	468	36.27	0.08		
TOTAL	508	153.87			
C.V.	28.51				

APÊNDICE 13 - Análise da variância para densidade ótica dos soros das aves vacinadas e não-vacinadas contra E. coli utilizando apenas interações significativas

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	0.55	0.14	1.84	0.1196
VACINA	1	8.37	8.37	111.57	0.0001
COLETA	5	7.11	1.42	18.94	0.0001
DOinicial	1	69.46	69.46	925.93	0.0001
VACINA*COLETA	5	2.32	0.46	6.18	0.0001
Suplementação*VACINA	4	0.83	0.21	2.76	0.0273
ERRO	488	36.61	0.08		
TOTAL	508	153.87			
C.V.	28.05				

APÊNDICE 14 – Análise de variância para densidade ótica dos soros na primeira coleta (E. coli)

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Trat	9	2.08	0.23	0.98	0.4680
ERRO	70	16.55	0.24		
TOTAL	79	18.63			
C.V.	64.45				

APÊNDICE 15 – Análise de variância para DO dos soros da Coleta 4 (encefalomielite aviária)

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	0.11	0.03	1.86	0.1296
Coleta 1	1	0.69	0.69	44.73	0.0001
Erro	58	0.89	0.02		
Total	63	1.68			
C.V. (%)	20.77				

APÊNDICE 16 – Análise da variância para peso das aves na primeira semana (peso inicial)

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	69588.71	17397.18	1.06	0.3801
Erro	85	1391632.44	16372.15		
Total	89	1461221.16			
C.V. (%)	8.31				

APÊNDICE 17 - Análise da variância para peso das aves na segunda semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	24793.49	6198.37	0.38	0.8189
Erro	85	1368764.11	16103.11		
Total	89	1393557.60			
C.V. (%)	8.24				

APÊNDICE 18 - Análise da variância para peso das aves na terceira semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	36951.71	9237.93	0.59	0.6707
Vacina	1	5152.90	5152.90	0.33	0.5677
Suplementação* Vacina	4	47489.93	11872.48	0.76	0.5554
Erro	80	1252201.56	15652.52		
Total	89	1341796.10			
C.V. (%)	8.03				

APÊNDICE 18 - Análise da variância para peso das aves na quarta semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	44341.29	11085.32	0.78	0.5413
Vacina	1	182.04	182.04	0.01	0.9102
Suplementação* Vacina	4	52741.29	13185.32	0.93	0.4520
Erro	80	1136633.78	14207.92		
Total	89	1233898.40			
C.V. (%)	7.77				

APÊNDICE 19 - Análise da variância para peso das aves na quinta semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	17538.29	4384.57	0.30	0.8753
Vacina	1	485.34	485.34	0.03	0.8552
Suplementação* Vacina	4	86974.16	21743.54	1.50	0.2096
Erro	80	1158340.00	14479.25		
Total	89	1263337.79			
C.V. (%)	7.76				

APÊNDICE 20 - Análise da variância para peso das aves na sexta semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	52205.16	13051.29	1.00	0.4140
Vacina	1	1368.90	1368.90	0.10	0.7472
Suplementação* Vacina	4	62035.16	15508.79	1.19	0.3237
Erro	80	1046762.89	13084.54		
Total	89	1162372.10			
C.V. (%)	7.46				

APÊNDICE 21 - Análise da variância para peso das aves na sétima semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	45376.88	11344.22	0.77	0.5449
Vacina	1	42967.33	42967.33	2.93	0.0905
Erro	83	1215752.49	14647.62		
Total	88	1302858.90			
C.V. (%)	7.82				

* A interação suplementação*vacina não foi significativa sendo, desta forma, retirada do modelo.

APÊNDICE 22 - Análise da variância para peso dos ovos na terceira semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	341.41	85.35	1.27	0.2865
Erro	84	5625.59	66.97		
Total	88	5967.00			
C.V. (%)	12.77				

APÊNDICE 23 - Análise da variância para peso dos ovos na quarta semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	53.20	13.30	0.42	0.7927
Vacina	1	10.00	10.00	0.32	0.5752
Suplementação* Vacina	4	175.64	43.91	1.39	0.2450
Erro	76	2398.81	31.56		
Total	85	2639.29			
C.V. (%)	8.75				

APÊNDICE 24 - Análise da variância para peso dos ovos na quinta semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	113.75	28.44	1.29	0.2837
Vacina	1	3.24	3.24	0.15	0.7029
Suplementação* Vacina	4	98.47	24.62	1.11	0.3572
Erro	73	1615.17	22.13		
Total	82	1817.07			
C.V. (%)	7.35				

APÊNDICE 25 - Análise da variância para peso dos ovos na sexta semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	42.72	10.68	0.49	0.7465
Vacina	1	4.27	4.27	0.19	0.6607
Suplementação* Vacina	4	130.14	32.54	1.48	0.2172
Erro	75	1650.54	22.01		
Total	84	1828.66			
C.V. (%)	7.26				

APÊNDICE 26 - Análise da variância para peso dos ovos na sétima semana

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Suplementação	4	125.59	31.40	1.39	0.2460
Vacina	1	13.09	13.09	0.58	0.4492
Suplementação* Vacina	4	106.74	26.68	1.18	0.3264
Erro	75	1695.74	22.61		
Total	84	1942.51			
C.V. (%)	7.24				

VITA

Giselle Kindlein, filha de Jane Regina Kindlein e Omar Fernando Kindlein, nasceu em 1º de dezembro de 1970, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil.

Iniciou seus estudos na Escola Estadual de 1º e 2º graus Piratini, onde permaneceu até concluir o 1º ano do 2º grau. Estudou no Colégio Assunção, onde completou o segundo grau em 1987.

Em 1988, ingressou na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Curso de Direito e na Pontifícia Universidade Católica (PUC) no Curso de Jornalismo, no qual se formou em 1991. Neste mesmo ano, tendo cancelado a matrícula no Direito (UFRGS), começou a cursar Veterinária (UFRGS), onde se formou em 1999.

Em 2000, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, da Faculdade de Agronomia da UFRGS, sob orientação da professora Andréa Machado Leal Ribeiro.