

ANTONIO CARLOS PEDROSO

**Modulação da Resposta Imune em Aves Imunizadas com Vacinas Aviárias
Associadas ao β -Glucano**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2009

ANTONIO CARLOS PEDROSO

**Modulação da Resposta Imune em Aves Imunizadas com Vacinas Aviárias
Associadas ao β -Glucano**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Área de concentração: Microbiologia

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pedroso, Antonio Carlos.

Modulação da resposta imune em aves imunizadas com vacinas aviárias associadas ao β -glucano / Antonio Carlos Pedroso. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Antonio José Piantino Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vacinas aviárias; imunomodulador.

Versão do título para o inglês: Immune response modulation in chicken immunized with vaccines associated to β -glucan.

Descritores: 1. β -Glucano 2. Resposta imune 3. Vacinas 4. Galinha I. Ferreira, Antonio José Piantino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB078/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Antonio Carlos Pedroso.

Título da Tese: Modulação da Resposta Imune em Aves Imunizadas com Vacinas Aviárias Associadas ao β -glucano.

Orientador: Antonio José Piantino Ferreira.

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a...../...../....., considerou

Aprovado

Reprovado

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 08508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3081.7733 - telefax : (55) (011) 3081.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **64** nas fls. **6** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Imunomodulação da resposta humoral em aves vacinadas com diferentes vacinas (vivas e inativadas) associadas ao glucano**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Antonio Carlos Pedroso**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **16.12.2004**.

São Paulo, 20 de dezembro de 2004.

Profª. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

**Agradeço a Deus fonte de infinita energia que sempre
ilumina os meus caminhos.**

Aos meus amados pais Antonio e Iolanda, pelo apoio, incentivo, paciência e o amor incondicional que tem por esse filho.

Aos meus irmãos Edson e Simone, pelo apoio e conselhos recebidos. Minha gratidão por sempre estarem disponíveis a me ouvirem.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e Professor Dr. Antonio José Piantino Ferreira, pela acolhida, a confiança depositada, orientação e conhecimento compartilhado, que tornou possível esse trabalho. A minha gratidão.

A Dra. Claudete S. Astolfi Ferreira, pelo apoio, amizade, a disponibilidade em sempre ajudar, e pelas valiosas sugestões e ensinamentos. Muito Obrigado.

Ao Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ/USP, por dar condições de realizar essa tese e gratificar a origem de muitas amizades que decorrerá além desse ambiente de pesquisa.

Amigos estes, que me ajudaram nos experimentos e me proporcionaram muitas alegrias fora do nosso laboratório: Jorge Chacón, Marcos Ivo, Lidiane, Liliana, Luciana, Eliana, Mário Sérgio, Amarilis, Carina, André, Joelma, Camila, Mauricio Faria.

Aos estudantes de iniciação científica e estagiários na época que colaboraram nos experimentos com as aves: Lucila, Matheus, Fernanda, Sibelle.

A Andyara pelo apoio, companheirismo, paciência e enorme demonstração de preocupação e carinho por mim.

Ao Laboratório de Patologia e Oncologia Experimental da FMVZ/USP, sob responsabilidade da Professora Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagle, por disponibilizar o uso do aparelho Real Time. E aos amigos que lá fiz; Heidje, Daniel, Patricia, Márcia, Tereza, Mirela, Bruno, Juliana. Em especial a Cynthia pela ajuda, paciência nos ensinamentos, e mais do que isso a amizade. E em especial ao meu amigo Lucas Chaible, pelo apoio, ensinamentos, e pela ajuda fundamental a qual tornou possível a conclusão de vários assuntos do molecular. Sou muito grato a vocês Cyntia e Lucas.

Aos funcionários da FMVZ/USP: Ataliba, Paulinho, Lúcio, Rosinha, Emerson, Robson, Guimarães, Luiz Negão, Marcos e Rogério.

A Juliana Rodrigues pelas contribuições no molecular.

À Alice, secretária da Pós Graduação do Departamento de Microbiologia do ICB pela sempre disponibilidade em ajudar.

A todos que direta ou indiretamente cooperaram na realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou esse projeto (Processo 04/09080-8).

“Todas as vezes que se comprometer a fazer algo na vida, procure fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e, acima de tudo, com bom senso e sensibilidade. Faça de sua vida uma eterna conquista rumo ao conhecimento, à grandeza do ser, à autenticidade e será sempre vencedor”

Gandhi

Essa tese é fruto de quatro anos e meio de trabalho árduo, de renúncias e persistências.

Hoje vejo que tudo foi válido para o meu crescimento pessoal e profissional; e que a convivência com ótimos pesquisadores e bons amigos me tornou melhor em todos os sentidos.

A todos o meu apreço e gratidão.

RESUMO

PEDROSO, A. C. **Modulação da Resposta Imune em Aves Imunizadas com Vacinas Aviárias Associadas ao β -Glucano.** Doutorado (Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os β -glucanos são formados por polissacarídeos estruturais da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), alguns cereais em grãos e fungos. Os β -glucanos apresentam a molécula de glicose ligada ao carbono nas posições β -1,3 e pode apresentar cadeias laterais com o resíduo de glicose ligado nas posições β -1,6. O β -glucano tem sua ação benéfica como antiinflamatório, antitumoral, hipocolesterolêmico e hipoglicêmico. A inocuidade do β -glucano solubilizado nesse trabalho foi demonstrada *in vitro*, em cultivo celular de fibroblastos de embriões de galinhas SPF, e confirmado *in vivo* após a injeção no músculo peitoral de frangos. O β -glucano é um modulador biológico devido sua capacidade de aumentar a resposta imune inata, aumentando os mecanismos inespecíficos de defesa dos animais. O β -glucano solúvel na dose de 240 μ g/ave, associado ao diluente da vacina de Marek, apresentou efeito imunomodulador na resposta imune humoral. Os níveis de IgG no plasma foram detectados pela técnica de ELISA, e a resposta imune celular foi avaliada pela detecção de IFN- γ , IL-2 e IL-6 em frangos vacinados com vacina recombinante e viva contra doença de Gumboro. O β -glucano solúvel nesse experimento demonstrou ser um potente imunoadjuvante após aumentar a resposta imune humoral e celular para os antígenos da doença infecciosa da Bursa, quando associado em vacinas recombinantes e vivas.

Palavras-chave: β -Glucano. Resposta imune. Vacinas. Galinha.

ABSTRACT

PEDROSO, A. C. **Immune Response Modulation in Chicken Immunized with Vaccines Associated to β -Glucan**. Ph. D. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2009.

The β -glucans are structural polysaccharides from yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*), some cereal grains and fungi. The β -glucans have a glucose molecule carbon linked in sites β -1,3 and they have side chains of glucose residue in sites β -1,6. The β -glucans have a helpful effect as anti-inflammatory, antitumoral, hypoglycemic and hypocholesterolemic activity. The safety of β -glucan water-soluble obtained in this work was demonstrated *in vitro*, using specific-pathogen-free (SPF) cell culture chicken embryo fibroblast and it was confirmed *in vivo* after injection in chicken pectoral muscle. The β -glucan is a biological modulator due to its ability to increase the innate immune response. The soluble β -glucan in 240 μ g/bird dose, associated to Marek's disease vaccine diluent's showed immunomodulatory effect in humoral immune response. The IgG plasma levels were detected by ELISA method, and the cellular immune response was evaluated by detection IFN- γ , IL-2 and IL-6 in vaccinated chickens with recombinant and live vaccines against Gumboro's disease using Real-Time PCR technique. The soluble β -glucan used in this trial demonstrated a powerful immune-adjuvant effect enhancing the cellular and humoral immune response against Bursal disease, when associated to recombinant vaccine and live vaccines.

Keywords: β -Glucan. Immune Response. Vaccine. Chicken.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

CT – Ciclo do Threshold

DEPC – Dietilpirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucléico.

ECP – Efeito citopático

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FEG – Fibroblastos de embrião de galinha

GALT – Tecido linfóide associado ao intestino

HI – Inibição da hemaglutinação

IBDV – Vírus da doença infecciosa da bolsa (Doença de Gumboro)

IBV – Vírus da bronquite infecciosa das galinhas

IFN – Interferon gama

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mMOL – Milimolar

NDV – Vírus da doença de Newcastle

nM – Nanomolar

Pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Concentração hidrogeniônica

pMOL – Picomol

ppb – Partes por bilhão

RNA: ácido ribonucléico.

rpm – Rotação por minuto

RT-PCR – Real Time PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

SDS – Sódio dodecil sulfato

SPF: Specific pathogen free – Animais livres de patógenos específicos.

TBE – Triziborato de EDTA

LISTA DE TERMOS EM INGLÊS CONSAGRADOS

Na literatura científica existem termos em inglês que já estão de tal maneira consagrada e conhecida que perderiam seu sentido se fossem traduzidos para o português.

Nesse trabalho optamos por manter esses termos em sua forma original.

cdNA: fita de ácido desoxirribonucléico complementar ao ácido ribonucléico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína.

CD: *Cluster of differentiation* – Grupamento de diferenciação é o conjunto de moléculas marcadores da superfície celular usado para diferenciar variados tipos de células.

Cycle Threshold: ponto no qual se compara o nível de expressão dos genes no RT-PCR.

Foward: *primer* que é lido pela Taq polimerase no sentido 5'-3' da fita de DNA senso.

GenBank: banco de dados públicos onde estão contidos as seqüências genômicas de várias espécies.

PFU – Unidades formadoras de placas. Certos agentes infecciosos produzem lesões características sobre culturas celulares, como a formação de placas. Podendo determinar a concentração do vírus na amostra a partir de contagem ao microscópio ótico.

Primer: é uma seqüência de geralmente 20 pb que é ponto inicial de reconhecimento pela polimerase na duplicação do DNA senso.

Probe: nome dado a seqüência de oligonucleotídeos (20 bp) que contém os fluoróforos utilizados no RT-PCR.

Quencher: molécula utilizada na confecção das sondas fluorescentes utilizadas no RT-PCR com a finalidade de capturar a luz emitida pelo reporte.

Reporter: molécula fluorescente utilizada na confecção das sondas utilizadas no RT-PCR.

Reverse: primer que é lido pela Taq polimerase no sentido 5'-3' da fita de DNA anti-senso, mas que na fita senso seria lido no sentido 3'-5'.

Taqman: nome dado ao conjunto de primers e probe fluorescente utilizados no RT-PCR.

SyberGreen: sonda de ligação a DNA dupla fita, emite grande fluorescência após ligar-se a DNA dupla fita.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração da parede celular de levedura.....	27
Figura 2	– Ilustração da estrutura química do β -glucano.....	27
Figura 3	– Modelo de interação do zimosan com a Dectina-1 e <i>Toll-like</i>	33
Figura 4	– Apresentação de β -Glucano comercial insolúvel.....	40
Figura 5	– RNA degradado	55
Figura 6	– RNA íntegro	55
Figura 7	– Representação esquemática da sonda	58
Figura 8	– Representação esquemática da reação	58
Figura 9	– Fibroblasto de embrião de galinha infectado com o vírus de Marek a seta mostra um unidade formadora de placa (100 X)	60
Figura 10	– Fibroblastos de embrião de galinha infectados com o vírus de Marek associado ao β -glucano, mostrando a vacuolização do fibroblasto (200 X).	60
Figura 11	– Fotomicrografia por varredura de moléculas de β -glucano (1.100 X)	61
Figura 12	– Fotomicrografia por varredura de moléculas de β -glucano (190 X)	62
Figura 13	– Efeito de 31 mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção	64
Figura 14	– Efeito de 62 mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção	64
Figura 15	– Efeito de 125mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção	65
Figura 16	– Efeito de 250 mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção	65
Figura 17	– Miosite heterofílica focal aguda após 24 horas da inoculação de β -glucano insolúvel (10X)..	68
Figura 18	– Miosite linfocítica focal crônica após 72 horas da inoculação de β -glucano insolúvel (10X)	69
Figura 19	– Miosite heterofílica focal aguda após 24 horas da inoculação de β -glucano insolúvel. (Aumento 10X)	69
Figura 20	– Miosite heterofílica focal aguda após 24 horas da inoculação de β -glucano insolúvel. (Aumento 40X)	70

Figura 21 – Miosite linfocítica focal crônica após 72 horas da inoculação de β -glucano insolúvel. (Aumento 10X)	70
Figura 22 - Títulos de anticorpos para bronquite infecciosa das galinhas (IBV).....	73
Figura 23 - Títulos de anticorpos para doença de Gumboro (IBDV).....	74
Figura 24 - Títulos de anticorpos para doença de Newcastle (NDV)	75
Figura 25 – Títulos de anticorpos para doença de Gumboro – Vacina Recombinante via SC ..	78
Figura 26 – Títulos de anticorpos para doença de Gumboro – Vacina Viva (via OC no 1° e 10° dia)	79
Figura 27 – Títulos de anticorpos para Bronquite Infecciosa das Galinhas dos tratamentos que receberam β -glucano no diluente da vacina de Marek e foi vacinado contra doença de Gumboro cepa viva – via ocular.....	81
Figura 28 – Títulos de anticorpos para Bronquite Infecciosa das Galinhas dos tratamentos que receberam β -glucano no diluente da vacina de Marek e foi vacinado contra doença de Gumboro com a vacina recombinante – via SC	82
Figura 29 – Evolução da expressão do gene Interleucina-2 nos diferentes programas de vacinação	84
Figura 30 – Evolução da expressão do gene Interferon- γ nos diferentes programas de vacinação	86
Figura 31 – Evolução da expressão do gene Interleucina-6 nos diferentes programas de vacinação	88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição dos grupos de aves que receberam glucano no músculo peitoral profundo, as diferentes concentrações de glucano insolúvel e solúvel na forma sulfatada e fosfatada 45
- Tabela 2** - Descrição dos tratamentos, vacinação, números de aves e os procedimentos para a criação de frangos em um ciclo de criação de 42 dias 47
- Tabela 3** - Programa de vacinação..... 50
- Tabela 4** - Descrição dos tratamentos e a combinação dos programas vacinação 51
- Tabela 5** - Descrição das lesões de uma ave de cada tratamento que receberam diferentes concentrações e forma de obtenção do glucano após 24 horas da inoculação..... 63
- Tabela 6** - Descrição das lesões histopatológicas após 24, 48, e 72 horas no músculo peitoral de frangos após receberem a inoculação de β -glucano insolúvel e solúvel nas formas fosfatada e sulfatada..... 67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Histórico	25
2.2	Estrutura dos componentes da parede celular das leveduras	26
2.3	β-glucanos	27
2.4	Fontes e utilização dos β-glucanos	28
2.5	Uso β-glucano na nutrição animal	29
2.6	Atividade do β-glucano como imunoestimulante, imunomodulador ou imunopotenciador	30
2.7	Interação do β-glucano com sistema imune	31
2.8	Estudos <i>in vivo</i>	34
2.9	Justificativa para uso do β-glucano como um imunoadjuvante vacinal	36
3	OBJETIVOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Substância teste	40
4.2	Procedimentos para a solubilização da fração glucana (Insolúvel)	41
4.2.1	Análise das características do β-glucano solúvel	41
4.3	Efeito do β-glucano sobre cultivos celulares de fibroblastos de embrião de galinha SPF e seu comportamento na associação com a vacina de Marek	41
4.3.1	Características do vírus de Marek	41
4.3.2	Obtenção de fibroblastos de embrião de galinhas SPF	42
4.3.3	Diluição do β-glucano ao diluente da vacina de Marek	43
4.4	Microscopia eletrônica	44
4.5	Avaliação do β-glucano solúvel e insolúvel sobre o músculo peitoral das aves	44
4.5.1	Análise histopatológica	45
4.6	Local, instalações e equipamentos do experimento	45
4.7	Manejo das aves	46
4.8	Primeiro experimento <i>in vivo</i>	46

4.8.1	Aves	46
4.8.2	Dosagem padrão	48
4.8.3	Especificações das vacinas comerciais utilizadas.....	48
4.8.4	Colheita de amostras	49
4.8.4	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	49
4.9	Segundo experimento <i>in vivo</i>	50
4.9.1	Aves	50
4.9.2	Descrição dos tratamentos, dosagens e via de administração.....	51
4.9.3	Especificações das vacinas comerciais utilizadas.....	52
4.9.4	Colheita de amostras	52
4.9.5	Ensaio imunoenzimático.....	52
4.10	Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	53
4.10.1	Extração de RNA	53
4.10.2	Quantificação da concentração e determinação da razão A260/280	54
4.10.3	Eletroforese em gel de agarose 1,5%	54
4.10.4	Preparo do DNA complementar (cDNA)	56
4.10.5	PCR em tempo real com o uso do sistema <i>SybrGreen</i>	56
4.10.6	PCR em tempo real com o uso do sistema <i>Taqman</i>	57
5	RESULTADOS	59
5.1	Solubilização da fração glucana (Insolúvel)	59
5.2	Efeito do β-glucano sobre cultivos celulares de fibroblastos de embrião de galinha SPF e seu comportamento na associação com a vacina de Marek	59
5.3	Microscopia eletrônica	61
5.4	Avaliação do β-glucano solúvel e insolúvel sobre o músculo peitoral das aves	62
5.5	Análises histopatológicas	66
5.6	Primeiro experimento <i>in vivo</i>	71
5.6.1	ELISA para vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV).....	71
5.6.2	ELISA para vírus da doença de gumboro (IBDV)	71
5.6.3	ELISA para o Vírus de Newcastle.....	72
5.7	Segundo experimento <i>in vivo</i>	76
5.7.1	ELISA para o Vírus o Doença de Gumboro (IBDV)	76
5.7.2	ELISA para o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV).....	80

5.8	Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	83
5.8.1	Expressão de Interleucina-2 (IL-2).....	83
5.8.2	Expressão de Interferon-gama (IFN- γ).....	85
5.8.3	Expressão de Interleucina-6 (IL-6).....	87
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

Os β -glucanos são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de alguns cereais em grãos, da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), de alguns tipos de fungos filamentosos e de muitas espécies de cogumelos. Os polissacarídeos se diferenciam pelo tipo de ligação presente entre as unidades de glicose e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Como a maioria dos polissacarídeos de parede celular, os β -glucanos são sintetizados no Complexo de Golgi. Acredita-se que o modelo de biossíntese esteja associado à enzima sacarose sintase (SS) que efetua a hidrólise de sacarose produzindo frutose livre e UDP-glucose, esta última utilizada como substrato para a síntese de glucanos de parede celular (BUCKERIDGE et al., 1999, 2001).

Na literatura há descrições dos efeitos benéficos do β -glucano como o efeito antiinflamatório, antitumoral, hipocolesterolêmico e hipoglicêmico. A capacidade imunomoduladora de β -glucanos tem sido objeto de vários estudos (TOKUNAKA et al., 2002; De PAULA et al., 2005; DORE et al., 2007; LI et al., 2007).

A parede celular de leveduras é composta de manana (30%), glucana (30%) e proteínas (12,5%). O glucano apresenta a molécula de glicose ligada ao carbono nas posições β -1,3 e pode apresentar cadeias laterais com o resíduo de glicose ligado nas posições β -1,6. Estas paredes que contêm glucanos e mananoligossacarídeos são substâncias biológicas naturais, imunoestimulantes que podem aumentar os mecanismos inespecíficos de defesa nos animais (ENGSTAD e ROBERTSEN, 1993). Atuam estimulando os órgãos linfóides primários e secundários, e sua ação sobre os macrófagos, tanto em sua estimulação como no número de células circulantes foi estudada por Guo et al. (2003).

Ensaio clínicos têm demonstrado que o β -glucano nas posições de ligação 1,3 e 1,6 originados de levedura são mais eficazes na ativação do sistema imunitário e que os macrófagos apresentam receptores específicos para a molécula de β -glucano, estes receptores foram também encontrados em outras células do sistema imune, como os neutrófilos e as células *Natural Killer* (NK) (VETVICKA et al., 1997; COUSO et al., 2001).

O mecanismo de ação dos β -glucanos parece estar relacionado ao peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e

grau de polimerização (WILLIAMSON et al., 1992) .

Estudos envolvendo β -glucanos em diferentes aspectos da saúde humana foram realizados. Demonstrou-se que estas moléculas podem auxiliar na resistência infecciosa a bactérias, vírus, parasitas, doenças metabólicas como o diabetes e atividades anticarcinogênicas. (KOKOSHIS et al., 1978; MEIRA et al., 1996; BROWN e GORDON, 2001; DAVIS et al., 2004; BEHALL et al., 2006; VOLMAN et al., 2008).

O presente estudo teve o intuito de demonstrar a ação imunoestimuladora de β -glucano em frangos de corte. A presença de mRNA para os genes 28S, Interleucinas 2 e 6, Interferon- γ , em células do baço, foi detectada em um período de um 01 a 42 dias de idade. Assim como, a produção de IgG para o vírus de Gumboro.

O 28S é um dos componentes da subunidade maior do ribossomo, ou seja, a subunidade 60S. O RNA ribossômico 28S é usado como um controle endógeno da reação de PCR em tempo real, pois está presente em todas as células (GANDRA et al., 2008).

A Interleucina-2 (IL-2) é uma citocina produzida pelas células T ativada por antígenos, atuam de forma autócrina estimulando a proliferação destas células. Agem também, potencializando a morte celular por apoptose de células ativadas por antígeno. Dessa forma, a IL-2 é necessária tanto para a indução como para a regulação de respostas imunes mediadas pela célula T, apresenta também a capacidade de estimular a proliferação e a diferenciação de células NK e de células B.

A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina produzida por muitos tipos celulares, incluindo os fagócitos mononucleares, as células endoteliais e fibroblastos, atua na imunidade inata e adaptativa. A IL-6 estimula a síntese de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos e estimula a proliferação de linfócitos B produtores de anticorpo.

O Interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina produzida pelos linfócitos T e células NK cuja principal função é ativar os macrófagos estimulando a fagocitose e a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II. Em *Gallus gallus* o MHC classe I e II são denominados respectivamente como classes BF e BL.

O glucano ligado na posição β -1,3 de diferentes fontes biológicas demonstrou estimular a resposta imune humoral e celular para vários antígenos, agentes infecciosos e tumores (HUNTER et al., 2004).

Jung et al. (2004) comprovaram que o β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae*, administrados oralmente, aumentava a produção de IFN- γ e óxido nítrico (NO) no pulmão, reduzia o grau de lesões pulmonares e a replicação viral em suínos infectados experimentalmente com o vírus da influenza suína.

Guo et al. (2003) sugeriram que o β -glucano poderia ser utilizado como imunomodulador, pois após a administração de β -glucano em frangos de corte ocorria um aumento na produção de nitrito e interleucinas-1 (IL-1), assim como, um aumento da atividade fagocitária de macrófagos e na porcentagem de linfócitos duplos positivos CD4⁺ e CD8⁺ entre os leucócitos intra-epiteliais intestinais. Foi observado também uma hipertrofia de órgãos linfóides primários e secundários quando comparado aos animais controle.

Estudos têm demonstrado que os β -glucanos isolados da parede celular de fungos agem como estimuladores do sistema imune e exercem um efeito benéfico em uma variedade de experimentos com doenças bacterianas, virais, parasitárias e por fungos (Di LUZIO, 1983; STONE e CLARKE, 1992; BOHN e BEMILLER, 1995). O uso deste imunomodulador solúvel em água associado às vacinas para aves poderia ser uma excelente alternativa para alcançar maiores níveis de anticorpos, uma vez que já foi demonstrado em algumas doenças haver correlação entre concentração de anticorpos circulantes e proteção (TIMMS e BRACEWELL, 1983; SAWATA et al., 1982; TEKES et al.; 1992).

A utilização deste produto associado às vacinas inativadas poderia potencializar a ação da resposta imune das aves, contribuir para a diminuição da quantidade de adjuvantes e reduzir os problemas de reação local, principalmente com os adjuvantes oleosos. Além disso, poderia também diminuir o número de vacinações com vacinas vivas ou inativadas, que são necessárias em algumas regiões, diminuindo assim os custos e o estresse produzido com este procedimento.

O glucano poderia também contribuir com a exportação, pois como a Europa banuiu o uso da maior parte dos agentes antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal, isto foi um fator determinante para que os países exportadores recorressem a tratamentos preventivos como o uso de probióticos, prebióticos, imunoestimulantes e outros. O seu uso poderia também influenciar a opinião pública que, cada vez mais, exige produtos alimentares com menor risco a saúde humana, assim como a medidas de melhoria das condições higiênico-sanitárias ambientais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

O fenômeno da ativação do complemento por *Saccharomyces cerevisiae* foi descrito pela primeira vez por Von Dungern (1900), posteriormente Whitehead¹ et al. (1925) *apud* Pillemer e Ecker (1941) propuseram que esse fenômeno poderia ser consequência da interação do *Saccharomyces cerevisiae* com o terceiro componente do complemento (C3). Pillemer e Ecker (1941), estudando separadamente as diversas frações do *Saccharomyces cerevisiae*, demonstraram que a ação ativadora sobre o C3 residia numa fração insolúvel da parede deste fungo, conhecida como zimosan. Todo o conhecimento relativo ao β -glucano iniciou-se na Europa com o estudo do zimosan, este se apresentava como uma mistura bruta da parede celular de leveduras incluindo proteínas, lipídios e polissacarídeos.

Pillemer et al. (1956) estudaram o fenômeno da ativação do complemento pelo zimosan. Evidenciaram a necessidade da presença de uma euglobulina, presente no soro, denominada de properdina. Descreveram, em cobaias, que a interação do zimosan com a euglobulina, aumentava em 200 a 300 vezes a euglobulina quando comparada ao valor basal.

Em 1957, o interesse pelo zimosan aumentou com os trabalhos de Benacerraf e Sebestyen *apud* Kelly et al. (1960); Riggi e DiLuzio (1961), pois demonstraram que a injeção de zimosan em camundongos promovia um aumento da atividade fagocitária, provavelmente devido à formação de novas células reticuloendoteliais, ou, como atualmente é denominado, do sistema fagocítico mononuclear.

Cutler (1960) atribui ao zimosan um efetivo potencializador da produção de anticorpos, após observar em ratos tratados com zimosan um aumento na formação de hemolisinas oriundas do baço.

Riggi e DiLuzio (1961) descobriram que o composto imunoativo do zimosan era o β -1,3 D-glucano, uma cadeia longa de polissacarídeo que não apresentava os efeitos negativos do zimosan.

¹ WHITEHEAD, H. R.; GORDON, J.; WORMALL, A. The third component or heat stable factor of complement. **The Journal of Biochemistry**, v. 10, p. 618-625, 1925.

Na década de 80, Czop (1986) encontrou sítios de ligação específicos para os β -glucanos presentes em receptores da superfície dos macrófagos.

Utilizado como um modificador da resposta biológica, o zimosan é reconhecido como um ativador de uma via alternativa do sistema complemento (HIDA et al., 2006). Desde então, esses polímeros vem recebendo especial atenção, principalmente no que se refere à imunomodulação. É citado na literatura como sendo capaz de ativar a resposta imune independente do tipo de invasor ou patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos, parasitas e tumores.

2.2 Estrutura dos componentes da parede celular das leveduras

As paredes celulares de leveduras têm entre 200 e 600 nm de espessura e são compostas por três moléculas: quitina, glucana e mananoproteína (TRABULSI et al., 1999). Em *Saccharomyces cerevisiae* a parede celular representa 15-30% do peso seco da célula (ORLEAN, 1997). O percentual encontrado desses componentes na parede celular foi de 1 a 3% para quitina, 40% para mananoproteína e aproximadamente 60%, de β -glucano, existindo 50% de ligações β -1,3 e 10% de ligações β -1,6 (LIPKE e OVALLE, 1998). O glucano é um polissacarídeo de peso molecular de aproximadamente 6.500 Dalton (HASSID et al., 1941). A distribuição dos componentes da parede celular (Figura 1) está organizada em duas estruturas principais, sendo a externa composta de glicoproteínas ou mananoproteínas e a interna de glucana e quitina. Quimicamente o β -glucano é um polímero de glicose que se repetem cerca de 1.400 vezes (Figura 2).

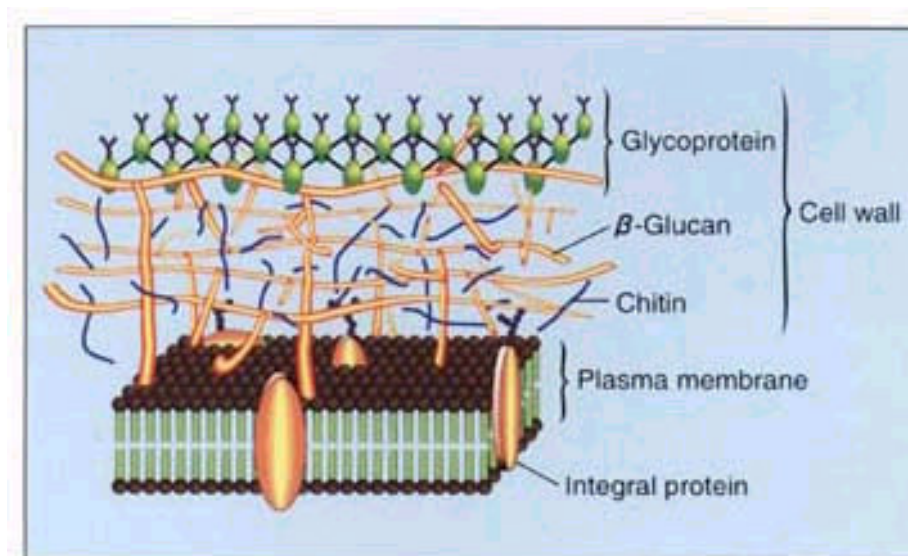


Figura 1 – Ilustração da parede celular de levedura.

Fonte: http://www.sambomed.co.kr/product/wako_reagent/betaglucan.htm

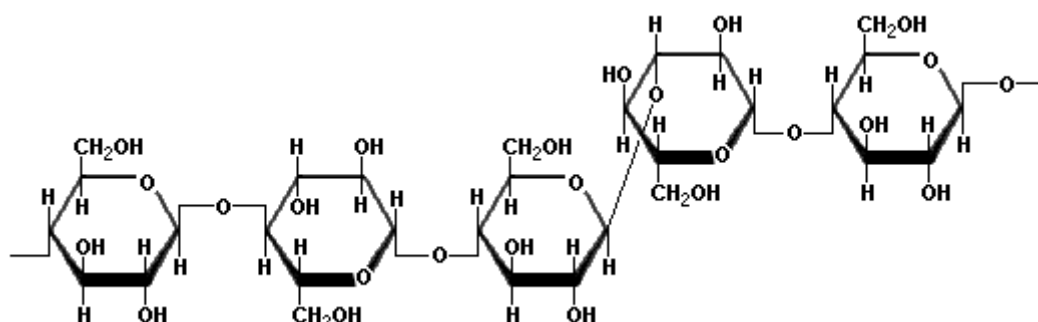


Figura 2 – Ilustração da estrutura química do β-glucano.

Fonte: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/glucan>

2.3 β-glucanos

As moléculas de β-glucanos são ordenadas, se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de D-glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (BROWN e GORDON, 2001).

Quanto à solubilidade de β-glucano em álcalis, são encontradas duas frações de β-1,3, sendo uma solúvel e a outra insolúvel. A porção insolúvel contém de 3 a 6% de ramificações unidas em β-1,6 e representa o maior componente da parede. A porção solúvel

representa 15 a 20% e apresenta uma estrutura semelhante à insolúvel, entretanto com maior número de ramificações β -1,6 (SHAHINIAN e BUSSEY, 2000).

A estrutura β -1,3 glucana tem tamanho estimado de 1500 resíduos de glicose e β -1,6 glucana apresentam de 150 a 200 resíduos. Na parede de *S. cerevisiae* são rearranjadas por ramificações introduzidas por glicosiltransferases (STRATFORD, 1994). Segundo Lee et al. (2002), a solubilidade em água depende do número de resíduos de glicose unidos em β -1,6 das cadeias laterais, e do grau de polimerização. E, de acordo com Klis et al. (2002) o grau de polimerização de β -1,3 glucana pode variar com as condições em que a levedura se encontra. Essa molécula possui uma longa cadeia de unidades de glicose e a ausência de um grupo final no polissacáride metilado sugere que a molécula seja uma cadeia fechada (HASSID et al., 1941).

É insolúvel em água e, ao contrário do amido, não se cora em azul com a solução de iodeto de potássio. Sua peculiar estrutura, com ligações β -glicosídicas entre os carbonos 1 e 3, a diferencia dos polissacarídeos de cadeia longa mais conhecidos, tais como a celulose, o amido e o glicogênio, que possuem ligações entre os carbonos 1 e 4.

Ao microscópio óptico se apresenta como grumos, ou como unidades isoladas, da parte interna da cápsula do *Saccharomyces cerevisiae*, a qual tem cerca de 3 μ m de diâmetro (RIGGI e Di LUZIO, 1961).

2.4 Fontes e utilização de β -glucanos

No Brasil um grande volume de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é produzido como subproduto nas indústrias cervejeiras, nas indústrias produtoras de etanol e no setor de panificação, com valores de produção de 140 mil toneladas/ano (GAIOTTO, 2005).

Na indústria de alimentação humana são utilizadas leveduras autolisadas e extrato de leveduras como flavorizante, aditivos, suplemento nutritivo, componentes de sopa e produtos cárneos (CABALLERO-CÓRDOBA e SGARBIERI, 2000).

2.5 Uso β -glucano na nutrição animal

Na nutrição animal se utiliza a levedura desidratada, sendo que esta foi usada como probiótico, simbiótico. Para bovinos, caprinos e ovinos devido a sua câmara fermentativa (rúmen) existem trabalhos citando a utilização de leveduras vivas na sua alimentação. Dawson (2000) divulgou benefícios na nutrição de ruminantes com aumentos de 7 a 8% em ganho de peso e produção de leite.

Na nutrição de peixes existem vários estudos relatando os resultados promissores com o uso de β -glucano, como o aumento da taxa de sobrevivência dos peixes, principalmente quando desafiados frente a parasitas e bactérias; aumento da população de leucócitos, neutrófilos e monócitos; diminuição da concentração de cortisol. (VOLPATTI et al., 1998; JENEY e JENEY 2002; CAIN et al., 2003; SELVARAJAV et al., 2005; MISRA et al., 2006; PALIC et al., 2006).

Na nutrição de aves, existem muitos produtos comerciais que contêm β -glucano e exploram suas indicações como: aditivo com funções probióticas, prebióticas e simbióticas; um potente imunestimulante que auxilia na resistência à exposição infecciosa; induzir a ativação do sistema imune no trato gastrointestinal, pois a imunidade intestinal, relacionada ao tecido linfóide associado ao intestino (GALT), nas aves amadurece durante as primeiras duas semanas de vida (MUIR et al., 2000). Dessa forma, o sistema imune das mucosas tem um papel importante na proteção dos animais às infecções, pois vários mecanismos da imunidade inata cooperam com a ativação da imunidade adaptativa (MESTECKY, 1987; BRANDTZAEG, 2007).

Os oligossacarídeos podem atuar como prebióticos estimulando seletivamente a multiplicação de bactérias do trato intestinal, e servindo de fonte energética para a microflora benéfica (PRZEMYSŁAW e PIOTR, 2003).

Franco et al. (2005) demonstraram que as leveduras podem substituir os antibióticos testados na ração de frangos de corte, com eficiência semelhante à dos antibióticos em relação ao ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração. Dessa forma pode ser uma alternativa viável na substituição de promotores de crescimento antimicrobianos.

Quando se utiliza na nutrição das aves dietas a base de cereais de alta viscosidade e que contem β -glucano como o trigo, centeio, cevada, aveia, tritcale e farelo de arroz podem

ocorrer dificuldades na digestibilidade do bolo alimentar. Assim, se utiliza de complexos enzimáticos contendo β -glucanase, melhorando a digestibilidade do quimo. Há uma diminuição na umidade da cama, fator determinante no aparecimento de lesões de dermatite de contato (TUCKER e WALKER, 1992).

A beta-glucanase é uma enzima que atua sobre o polissacarídeo β -glucano presente no cereal, liberando maior quantidade de açúcares disponível. Em virtude da concentração de β -glucanases ocorrerá uma maior permanência de β -glucano no sistema hepático, permitindo que o polissacarídeo fique acumulado no fígado, baço e outros órgãos do sistema reticuloendotelial sem sofrer mudanças estruturais significativas (BROWN e GORDON, 2003).

A metabolização do β -glucano é lenta e ocorre por oxidação (MIURA et al., 1998), ou pela secreção através de filtração glomerular (SUDA et al., 1996). O estudo de Ohno et al. (1999), com mamíferos, sugere uma relação entre a permanência do β -glucano no organismo e sua atividade imunoestimulante. Após obter um β -glucano solubilizado por oxidação, com estrutura similar àquela depositada, a atividade biológica foi avaliada e constatou-se que ocorreu um estímulo para a biossíntese de IL-8 e atividade antitumoral.

2.6 Atividade do β -glucano como imunoestimulante, imunomodulador ou imunopotenciador

Segundo Vetvicka e Vetvickova (2007) existem mais de 1.600 publicações demonstrando que o β -glucano apresenta propriedade estimulatórias. Os imunomoduladores ou imunoestimulantes são substâncias que, alteram o sistema imune, de forma a estimular ou suprimir este sistema (MULCANY e QUINN, 1986). A resposta imunológica pode ser inespecífica ou específica. Quando ocorre a ativação da resposta imune a um estímulo antigênico particular, esta é denominada ativação específica. São exemplos de imunomoduladores: produtos quimicamente definidos obtidos de bactérias ou fungos (lipopolissacarídeos, polissacarídeos como o glucano), substâncias biológicas do sistema imune (citocinas, interferon), microrganismos (vírus, bactérias).

Os imunopotenciadores atuam em combinação com um estímulo antigênico e aumentam a resposta imunológica que foi ativada por este estímulo. Levamisole é um exemplo, Krakowsk et al. (1999) ao administrarem 0,19mg/Kg de 1,3-1,6 \rightarrow β -glucanos e

levamisole em éguas prenhes observaram que o colostro dessas apresentaram altos níveis de imunoglobulinas quando comparado ao grupo não estimulado.

Os adjuvantes são substâncias que desencadeiam uma resposta imune mais intensa a um antígeno do que aquela conferida a este antígeno quando inoculado sozinho (RAMON, 1926). Os imunoadjuvantes são mais efetivos quando combinados com uma administração única de antígeno. Um dos mecanismos de ação é a retenção dos antígenos nos tecidos, sendo denominados adjuvantes de depósito, como por exemplo, os sais de alumínio e a emulsão oleosa. São considerados também adjuvantes de veículos, porque servem como matriz para os antígenos. Isso é um diferencial com o imunoestimulante que não realiza nenhuma função mecânica (BOTTINO, 1989).

Os adjuvantes de depósitos ou de veículos ligam os antígenos ao tecido, essa massa depositada permanece no tecido por um período prolongado, podendo causar uma irritação crônica, inflamação e cicatrização fibrosa (OLIVEIRA, 1990).

O β -glucano foi usado como aditivo alimentar, em pintinhos infectados com *Salmonella* spp. Lowry et al. (2005) demonstraram que este tratamento estimulou a resposta imune inata, na primeira semana de idade, um período de imaturidade da imunidade inata, diminuindo de forma significativa a incidência de invasão de órgãos por *Salmonella* Enteritidis e aumentando a capacidade fagocítica, microbicida e de produção de radicais livres em heterófilos desafiados contra esse patógeno. Revolledo et al. (2009) associaram este glucano com produtos de exclusão competitiva e probiótico experimental e verificaram a eficiência na prevenção da colonização e na invasão dos órgãos em aves desafiadas com uma cepa de *Salmonella* Typhimurium Na^f, além de estimular a produção de IgA sistêmica e de mucosas. Chen et al. (2008) utilizando 0,1% de β -glucanos extraído do fungo *Schizophyllum commune* observaram um aumento na defesa das aves contra *Salmonella* Enteritidis pelo aumento da atividade fagocítica e microbicida de macrófagos atraídos para a cavidade abdominal por partículas de Sephadex.

2.7 Interação do β -glucano com o sistema imune

O funcionamento efetivo do sistema imune depende da interação da imunidade inata ou natural e da imunidade específica ou adquirida.

O reconhecimento de microorganismos ou substâncias antigênicas pelos fagócitos depende de um número limitado de receptores, os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). A maioria dos PAMPs inclui receptores do tipo *Toll-like*; LPS, peptídeoglicanos e ácido lipoteicóico (LTA) de bactérias e β -glucanos de fungos. O reconhecimento dessas estruturas estimulam respostas celulares do hospedeiro que podem eliminar o patógeno (NOVAK e VETVICKA, 2008).

A presença de receptores para β -glucanos foi demonstrada em células que pertencem ou não ao sistema imune, incluindo os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células de Langerhans, eosinófilos, células NK, células endoteliais, células do epitélio alveolar e fibroblastos (BROWN e GORDON, 2003).

Herre et al. (2004) observaram que alguns fungos patogênicos mascaravam a molécula de β -glucano, ou pelo menos parte dela, evitando dessa forma o reconhecimento pelas células de defesa do hospedeiro, minimizando significativamente as respostas pró-inflamatórias para a infecção.

A interação de vários receptores em leucócitos que se ligam ao β -glucano foram identificados como: CR3 (Receptor 3 do complemento); Lactosilceramida (CDw17); *Scavenger receptors* e Dectina-1 (WILLMENT et al., 2001). O receptor 3 do complemento liga-se ao β -glucano e em associação com a molécula C3b inativada (iC3b) aumenta a resposta fagocítica e de citotoxicidade (THORNTON et al., 1996). O receptor Dectina-1 foi identificado por Ariizumi et al. (2000) em células dendríticas, apresenta peso molecular de aproximadamente 28000 D, é uma proteína que atravessa a membrana celular, sendo um receptor do tipo lectina *C like* com um único domínio extracelular e um domínio intracelular com um imunoreceptor com motivo de ativação baseado na tirosina (ITAM). Este receptor foi encontrado também em diferentes populações de macrófagos e que interagia com diferentes moléculas de 1,3- β -glucano e 1,6- β -glucano (BROWN e GORDON, 2001). Se expressa intensamente em células mielóides como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (TAYLOR et al., 2002).

A ativação celular através da Dectina-1 foi estudada com partículas de zimosan e verificou-se que a interação com os receptores Dectina-1 e *Toll-like receptor-2* (TLR-2) era necessária para que existisse a produção de citocinas pró-inflamatórias. Verificaram que a

Dectina-1 se ligava ao β -glucano e que outros componentes da parede celular da levedura interagiam com o receptor TLR-2. Observaram que existia um efeito de colaboração entre os receptores, pois através de TLR-2 ocorria o estímulo do adaptador MyD88 (gene de resposta de diferenciação mielóide primária 88) para ocorrer a ativação do fator nuclear NF κ B, um fator transcricional para que ocorresse a fagocitose e produção de TNF- α e IL-12. Na ausência de estimulação deste receptor não ocorria estes efeitos biológicos (Figura 3), (GANTNER et al., 2003).

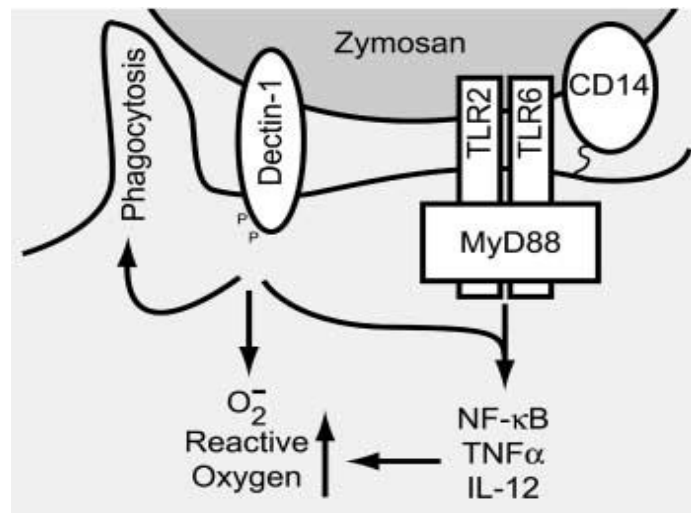


Figura 3 – Modelo de interação do zimosan com a Dectina-1 e *Toll-like*

FONTE: GANTNER et al., 2003.

No entanto, foi determinado que a interação do β -glucano com a Dectina-1, em células dendríticas, induzia a ativação intracelular de CARD9 (domínio de recrutamento e ativação de caspase) que se ligava a Bcl10 e Malt1, estimulava NF κ B e induzia a produção de citocinas pró-inflamatórias. Esta ativação era independente do receptor TLR-2 (GROSS et al., 2006). Recentemente, Goodridge et al. (2009), demonstraram que este mecanismo de ativação não ocorria em macrófagos, que era necessário a presença de GM-CSF ou INF- γ para que existisse a produção de TNF- α por estas células.

A resposta imunológica envolve diferentes células, mecanismos de ativação e síntese de diferentes proteínas e radicais como consequência da ativação de células efetoras. Dessa

forma, a análise de sua ativação envolve diferentes ensaios que medem a concentração destes produtos.

Vários estudos demonstraram que β -glucano, solúvel ou particulado, apresentavam atividade antitumoral e antimicrobiana em camundongos como modelo experimental (DILLER et al., 1963; CHIHARA et al., 1969; SELJELID, 1986; LI et al., 2006).

Estudos para determinar os mecanismos de ação de β -glucanos revelaram que podem aumentar a atividade funcional de macrófagos, neutrófilos e células NK (SHERWOOD et al., 1987; HETLAND e SANDRE, 2002) e potencializar a ação de linfócitos T ativados por antígenos celulares (ZEKOVIC et al., 2005). O tratamento com β -glucano aumentou a atividade fagocítica e microbicida de macrófagos através da interação com o receptor iC3b. Promoveu também a morte de células tumorais opsonizadas com iC3b (LI et al, 2006).

Através da detecção de citocinas pró-inflamatórias, observou-se um aumento da resposta imune (ADACHI et al., 1994). Olson et al. (1996) demonstraram que β -glucano de *S. cerevisiae* aumentava *in vitro* a produção de TNF- α nos macrófagos alveolares isolados de ratos. Estrada et al. (1997) demonstraram que β -glucano obtido de aveia estimulou *in vitro* macrófagos peritoneais e um aumento de IL-1 α , em dose e tempo dependente, enquanto baixas concentrações de TNF- α foi encontrada no sobrenadante celular. Houve também a síntese de IL-2, IFN γ e IL-4 no sobrenadante de cultura de células do baço.

A administração de β 1-3 glucano por via oral ou intraperitoneal em camundongos Balb/c aumentou a concentração anticorpos circulantes contra eritrócitos de carneiro (ACEVEDO e PEDROSO, 1999).

2.8 Estudos *in vivo*

Experimentos realizados com aves Leghorn tratados com β -glucano envolvendo a síntese de anticorpos para agentes infecciosos diferentes foram conduzidos por Pedroso et al. (2008). Em um experimento dividiram 4 grupos de aves Leghorn com 21 dias de idade, vacinaram com 0,5 mL de bacterina inativada de *Mycoplasma gallisepticum*, por via subcutânea. Os grupos 1, 2 e 3 receberam concomitantemente, via água de bebida, 5, 10 e 15 mg/Kg de β 1-3 glucano particulado lineal. O grupo 4 não recebeu o polissacarídeo. A detecção de anticorpos, através da reação de inibição da hemaglutinação (HI), mostrou um

aumento significativo da resposta imune nos grupos que receberam o polissacarídeo no 14º dia pós vacinação quando comparado ao controle vacinado. Não encontraram diferenças na concentração de anticorpos entre os grupos que receberam β 1-3 glucano particulado lineal. Em outro experimento trabalharam com dois grupos de aves Leghorn imunizados com vacina viva intermediária de Gumboro no 18º e 28º dias de idade, sendo que um grupo recebeu uma suspensão de β 1-3 glucano particulado lineal, via água de bebida, na dose de 10 mg/Kg no 10º e 17º dia de idade e o outro não recebeu este polissacarídeo. Realizaram uma cinética de síntese de anticorpos, no 6º, 14º e 21º dia pós vacinação, através do ensaio imunoenzimático (ELISA) e determinaram que a concentração de anticorpos foi significativamente maior nas amostras do 6º dia no grupo que recebeu o β -glucano quando comparado ao controle vacinado. As amostras do 14º e 21º dia não apresentaram diferenças entre os dois grupos analisados.

Santin et al. (2001) incluíram 0,2 ppm de um produto contendo parede celular de levedura em dietas de frangos contaminada com aflatoxina (1.000 ppb), através da reação de HI observaram um aumento de anticorpos específicos nestas aves após infecção experimental com a cepa velogênica do vírus de Newcastle.

Um efeito adjuvante do β 1-3 glucano particulado lineal em vacinas de Newcastle foi observado quando comparado com o de gel de alumínio (ALFONSO et al., 1995).

Leitões que tiveram o beta-glucano como suplemento na dieta por 2 semanas após o desmame, mostraram-se menos susceptíveis para a colonização da cepa F4⁺ de *Escherichia coli* causadora de diarréias. Esse estudo sugere que o glucano poderia ser uma alternativa ao uso de antibióticos para a prevenção de infecções, por *E. coli*, no período de pós-desmame (STUYVEN et al., 2009). Montes de Oca et al. (1994) utilizaram um β 1-3 glucano como adjuvante na vacina de *E. coli* K88⁺ em porcas gestantes, e demonstraram que houve um aumento na taxa de anticorpos.

Varela² et al. (1996) *apud* Lavielle et al. (2004), estudaram os efeitos da aplicação de β 1-3 glucano, por via subcutânea, na concentração de 4mg/Kg, em frangos com uma alimentação instável e deficiente em proteínas. Verificaram que ocorreu uma diminuição significativa da mortalidade, ao avaliarem as concentrações de 2 e 10mg/kg de β 1-3 glucano

² VARELA, N.; PEDROSO, M.; PROENZA, T.; ZALDIVAR, V.; ALVAREZ, V. Empleo del Evimunk (β -1,3 glucano) en aves. **Revista Salud Animal**, v. 18, n. 3, p. 159-162, 1996.

por via oral ou intraperitoneal, encontraram estimulação da resposta de linfócitos T após a injeção de fitohemaglutinina (PHA) 24 horas e 7 dias pós tratamento.

O efeito imunomodulador do glucano na resposta à vacinação anti-rábica experimental em camundongos foi estudada e o grupo de animais que recebeu o β 1-3 glucano nas doses de 0,5 mg, por via intraperitoneal antes, durante e após a imunização, tiveram um aumento da resistência a infecção e apresentaram títulos de anticorpos maiores quando comparado ao grupo controle vacinado sem o glucano (TINO et al., 1993).

2.9 Justificativa para uso do β -glucano como um imunoadjuvante em vacina

Entre as ações mais importantes na sanidade avícola, destacam-se as vacinas, adjuvantes e programas de vacinação. A vacinação constitui-se em uma das ferramentas disponíveis para promover a proteção das aves contra as principais enfermidades infecciosas a que venham a ser expostas.

Para se obter efetividade completa, as vacinas devem ser administradas adequadamente em animais saudáveis, mantidos em boas condições nutricionais, ambientais e de manejo. Entretanto, a ação do sistema imunológico é fundamental para o sucesso da vacina (NORTH e BELL, 1990). A resposta imunitária também pode ser influenciada pela idade e estágio imunológico das aves. Os desafios sanitários e as práticas de manejo de cada empresa determinam o programa de vacinação em cada região. A proteção tanto para os frangos de corte como para as poedeiras comerciais, inicia-se com um programa de vacinação correto em lotes de reprodutoras para transmitir suficiente imunidade materna, e dessa forma, assegurar à progênie a transferência de anticorpos específicos aos diferentes agentes infecciosos. Como a transmissão de anticorpos maternos não é homogênea, é necessário que a vacinação seja realizada já no primeiro dia de idade, pois os ovos provenientes de matrizes de diferentes idades e origens geralmente são misturados no incubatório (CALNECK et al., 1997). E, além disso, mesmo as aves com altos níveis de anticorpos circulantes poderão produzir ovos/aves com níveis baixos ou sem anticorpos específicos aos antígenos vacinais (SOARES et al., 2000).

Assim, é importante a estimulação precoce do sistema imune, para permitir que as aves possam ter uma proteção maior durante os primeiros dias de vida e o desenvolvimento de um bom estado sanitário (TIZARD, 2000).

O uso do β -glucano como imunoadjuvante solúvel em água associado às vacinas para aves poderia ser uma excelente alternativa para alcançar maiores níveis de anticorpos, uma vez que já foi demonstrada em algumas doenças a correlação entre determinados níveis de anticorpos e proteção (TIMMS e BRACEWELL, 1983; SAWATA et al., 1982; TEKES et al., 1992).

O desenvolvimento de vacinas para prevenir doenças humanas e animais tem sido uma das maiores conquistas no campo da imunologia. As principais ferramentas utilizadas para evitar a susceptibilidade das aves às doenças são a biossegurança e a vacinação.

Segundo o IBGE, (2008) o setor agropecuário responde por 38% das vendas externas totais do país e por quase um terço do Produto Interno Bruto (PIB). O setor da avicultura tem uma participação de mais de 1,5% no PIB brasileiro.

A posição privilegiada no cenário internacional que a avicultura brasileira tem conquistado nos últimos anos é consequência de investimentos em pesquisa nas diferentes áreas envolvidas da produção, especialmente em sanidade animal, que têm contribuído para a diminuição significativa de perdas econômicas não só decorrentes de enfermidades, mas também da possibilidade de barreiras sanitárias protecionistas dos mercados importadores.

A avicultura é uma das explorações animais onde mais se utiliza de vacinas, desde um dia de idade até o abate. No Brasil, comumente se utiliza vacinas em frangos para a doença de Marek, Bouda aviária, doença infecciosa da bolsa (Gumboro), doença de Newcastle e Bronquite infecciosa das galinhas. O percentual do plantel brasileiro de frango industrial que recebe vacinas é de: para Marek 100%, para Gumboro 80 a 90%, bronquite aproximadamente 80% e Newcastle 30% (SANTINI, 2008). É importante citar que existem outras vacinas que são utilizadas em menor quantidade ou usadas esporadicamente como a vacina de coccidiose e reovirose, respectivamente.

Para uso em matrizes e poedeiras, além das vacinas citadas para frangos existem as vacinas para Coriza infecciosa das aves, Síndrome da queda de postura (EDS), Pneumovirose aviária, Salmonelose, Encefalomielite aviária, Micoplasmose, Anemia infecciosa das aves,

Laringotraqueíte infecciosa das aves, Cólera aviária, Colibacilose aviária e ainda não comercializada no Brasil a de Influenza aviária.

Na avicultura, os tipos de vacinas disponíveis no mercado são as vivas atenuadas, as inativadas, as de subunidades, as recombinantes e, com o desenvolvimento da tecnologia molecular, houve a geração de vacinas clonadas, todas apresentando algumas vantagens e desvantagens quando há comparação entre elas. As vias de vacinação utilizadas para aves incluem o aerossol, a água de bebida, a gota ocular e nasal, o *spray* e a parenteral (subcutânea e intramuscular). Recentemente, mesmo que timidamente, o Brasil passou a usar a aplicação de vacinas vivas *in ovo* (em embriões de 18-19 dias de incubação).

3 OBJETIVOS

- Determinar a dose de β -glucano, em uma única injeção, capaz de ativar a resposta imunológica em frangos imunizados e a sua ação em um ciclo de criação de 42 dias.
- Detectar em frangos tratados com glucano, a produção de anticorpos específicos às vacinas de Newcastle, Bronquite Infecciosa das Galinhas e Gumboro, através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA).
- Avaliar o efeito da aplicação de duas (2) e quatro (4) vezes a dose pré-determinada.
- Avaliar possíveis reações adversas no músculo peitoral (*Pectoralis major*) de frangos após a aplicação injetável de cinco (05) dosagens de glucano insolúvel e de 3 dosagens de β -glucano solúvel, na forma fosfatada e sulfatada.
- Determinar através de quatro doses (30, 60, 90 e 120 $\mu\text{g/ave}$) de β -glucano solúvel. Em uma única injeção no 1º dia de idade associada à vacina de Bouba e Marek, a capacidade de estimular a ativação da resposta imunológica em frangos em um ciclo de criação de 40 dias, através de ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos específicos às vacinas de Newcastle, Bronquite Infecciosa das Galinhas e Gumboro.
- Determinar em frangos através de PCR em tempo real a produção de Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6) e Interferon-gama (IFN- γ).
- Analisar as doses de 60, 120, 240 e 480 μg de β -glucano por ave na vacina recombinante para a Doença de Gumboro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substância teste

Foi utilizado um β -Glucano comercial insolúvel, Nutricell Beta Glucano® (Biorigen–Zillo Lorenzetti S/A., Lençóis Paulista, S.P., Brasil) que é obtido a partir da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Trata-se de um pó fino (Figura 4), sem aglomerações, seco em *spray dryer*, de boa fluidez, de coloração marrom claro, com odor característico. Devido ao seu alto teor de fibras e características funcionais, pode ser usado como suplemento alimentar, imunostimulante e como agente espessante em produtos alimentícios. Apresenta em suas características físico-químicas 2,47% m/m de proteínas; 6,11% m/m umidade (105 ± 2 °C); densidade 581 g/L; pH 5,05 em suspensão a 2% e 81,6% m/m de β -glucano e capacidade de absorção de água na quantidade de 6,60 mL/g. Análises microbiológicas demonstraram os resultados: <10 bactérias mesófilas totais; <10 bolores e leveduras e ausência de coliformes totais, fecais e *Salmonella* spp. Este produto insolúvel foi utilizado nos ensaios de solubilidade realizados no laboratório de Ornitopatologia da FMVZ/USP.



Figura 4 – Apresentação de β -Glucano comercial insolúvel.

4.2 Procedimentos para a solubilização da fração glucana (Insolúvel)

O maior obstáculo para a utilização de β -glucanas é a sua insolubilidade em meio aquoso. A extração química de glucanas pode ser realizada por tratamento com ácido, a quente e com base. A possibilidade de se preparar polímeros de β -glucanos solúvel, com atividade imunológica, a partir da fração glucana de levedura insolúvel já foi demonstrada por (WILLIAMS et al., 1991, 1992). No presente estudo, houve modificações nas orientações desse protocolo, foram realizados 14 diferentes testes para se definir um protocolo de solubilização que apresentasse um melhor rendimento a partir do produto insolúvel e possuísse grandes quantidades de β 1-3 e β 1-6 glucanas, este protocolo está em tramite de objeto de patente.

4.2.1 Análise das características do β - glucano solúvel

Algumas amostras solubilizadas no Laboratório de Ornitopatologia foram encaminhadas ao Laboratório da empresa fornecedora do β -glucano, para a realização de ensaios para a determinação de concentrações de β -glucano total.

4.3 Efeito do β -glucano sobre cultivos celulares de fibroblastos de embrião de galinha SPF e seu comportamento na associação com a vacina de Marek

Os efeitos de seis (06) concentrações de β -glucano solúvel na forma sulfatada, fosfatada e cloro hidratada sobre cultura de fibroblasto de embrião de galinhas SPF foram observados. A ação de β -glucano solúvel sobre a cultura de fibroblastos associados ou não ao vírus da vacina de Marek foi analisada, nas concentrações de 1.200, 600, 300, 150, 75 e 37,5 μ g/dose de 0,2 mL.

4.3.1 Características do vírus de Marek

As vacinas contra a Doença de Marek são produzidas e tituladas em monocamadas de fibroblastos de embrião de galinha (FEG). A multiplicação do vírus sobre o tapete celular provoca alterações morfológicas e funcionais nestas células, um fenômeno conhecido como efeito citopático (ECP). As células infectadas pelo Herpesvírus (HV) entram em processo de degeneração, apresentam mudanças na estrutura da membrana, tornam-se refringentes e se

agrupam formando agregados ou placas visíveis ao microscópio óptico, denominadas unidade formadora de placa (UFP).

4.3.2 Obtenção de fibroblastos de embrião de galinha SPF

- a) desinfecção da casca dos ovos com álcool iodado a 5%, retirados os embriões com uma pinça e colocados em placas de Petri;
- b) retirado as cabeças, os membros e as vísceras;
- c) com a ajuda de seringa os embriões foram lavados em tampão fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (PBS 0,1 M, pH 7,4), contendo 4,5 mg de gentamicina por mililitro. Este procedimento se repetiu até que o líquido desprezado apresenta-se quase cristalino;
- d) os embriões foram macerados e colocados em PBS 0,1 M, pH 7,4 contendo tripsina 0,25%, estes foram mantidos a 37° 10', sob agitação magnética. Em seguida foram colocados em gelo, até que houvesse o depósito de debris celulares;
- e) o sobrenadante foi desprezado;
- f) acrescentou-se novamente tripsina ao precipitado e o procedimento descrito no item (d) foi repetido. O sobrenadante foi coletado (aproximadamente 2 mL / embrião) e colocado em tubo com o mesmo volume de meio mínimo contendo 5% de soro fetal bovino, para inibir a ação da tripsina;
- g) estas células foram novamente tripsinizadas, conforme o item (d), sendo o sobrenadante coletado (aproximadamente 2 mL / embrião), colocado em tubo com mesmo volume de meio mínimo contendo 5% de soro fetal bovino;
- h) este foi centrifugado a 1000 rpm (rotor F 45-30-11, Eppendorff, Alemanha), por 20° 5'. O sobrenadante foi desprezado;
- i) o precipitado foi coletado com 5mL de meio de cultura contendo 5% de soro fetal bovino. Inicialmente utilizou-se pipeta Pasteur para suspender, em seguida as células foram

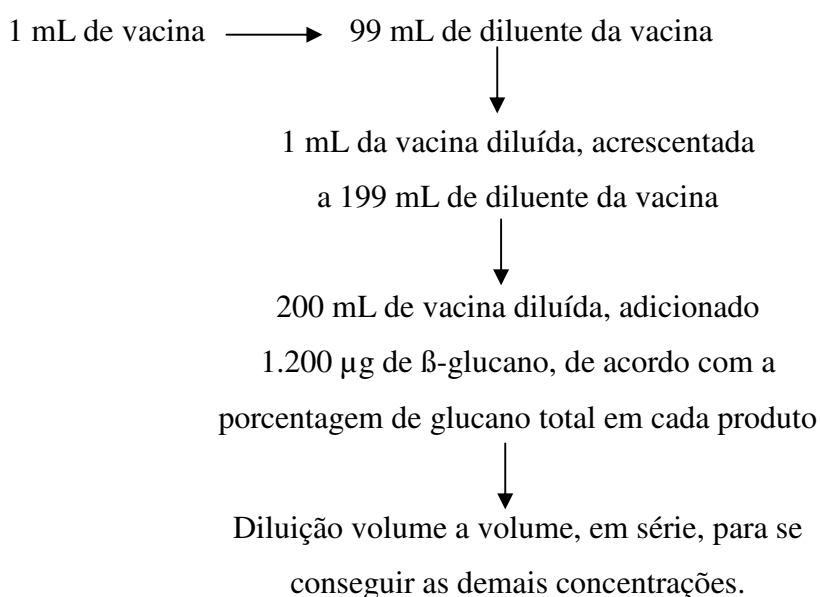
passadas em seringa com agulha 40x20 para desfazer os grumos celulares e novamente com agulha 25x7;

- j) esta suspensão celular foi filtrada em nylon e diluída em meio mínimo contendo 5% de soro fetal bovino (aproximadamente 2 mL para 50 mL de meio);
- k) as células (500 μ L) foram distribuídas em microplacas de cultivo celular com 96 poços e incubadas a 37 °C com 5% CO₂ até a completa formação da monocamada celular.

4.3.3 Diluição do β -glucano ao diluente da vacina de Marek

O β -glucano solúvel tanto na forma sulfatada, fosfatada e cloro hidratado, nas concentrações de 1.200, 600, 300, 150, 75 e 37,5 μ g/dose foram analisados. Estas concentrações foram ajustadas de acordo com a porcentagem de β -glucano total, existindo, respectivamente 58, 81 e 80%.

A vacina de Marek utilizada foi a Cryomarex HVT®, vírus vivo congelado, com as seguintes especificações: partida 005/06, fabricação abril/06 e vencimento outubro/07. O fabricante estabelece 6.000 UFP por dose de 0,2 mL. Para facilitar a visualização e contagem de UFP no poço, foi realizada a diluição da vacina da seguinte forma:



Cada placa apresentou como controle: fibroblasto com diluente da vacina de Marek e fibroblasto com a vacina de Marek, além das diferentes concentrações de cada produto. Os ensaios foram realizados em triplicata. A placa foi incubada a 37,5 °C e 5% de CO₂ por uma hora, após este período o sobrenadante foi retirado e substituído por meio de cultivo. Não houve alteração do pH da vacina controle nem das associações com o glucano solúvel. Realizou-se leituras em microscópio invertido (Leica MPS 60, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha) após uma (01); seis (06); 12; 24 e 48 horas da incubação, para a observação de efeito citopático.

4.4 Microscopia eletrônica

Amostras liofilizadas de β -glucano solubilizado nas formas sulfatada e fosfatada foram dispersas ao passarem por uma rede de aço inox de 150 Mesh e fixadas em *stubs* de alumínio. Essas amostras foram encaminhadas ao Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e de Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), e foram metalizadas com pó de ouro e incubadas em estufa a 37° no mínimo seis (6) horas. O microscópio eletrônico utilizado foi o JSM-6100 Scanning Microscope (Jeol Ltd., Tokio, Japão), e as imagens foram encaminhadas ao Setor de Fotografia pertencente ao mesmo departamento para a revelação.

4.5 Avaliação do β -glucano solúvel e insolúvel sobre o músculo peitoral das aves

Foram utilizados 44 frangos machos com 42 dias de idade, com o objetivo de se avaliar as possíveis reações adversas induzidas pelo glucano insolúvel e solúvel. Assim, foi aplicada no músculo peitoral (Pectoralis major) uma concentração de cinco (05) doses de glucano insolúvel e de três (03) doses de β -glucano solúvel na forma fosfatada e sulfatada.

As concentrações utilizadas estão demonstradas na (Tabela 1). Como os produtos apresentaram diferentes porcentagens de β -glucano totais, para que as aves recebessem as mesmas concentrações de β -glucano realizou-se uma correção em cada dose, pois os produtos apresentavam, respectivamente, 81 e 58% de glucanas totais. Os produtos foram ressuspendidos em solução salina 0,85% estéril.

Para cada concentração realizou-se quatro (04) repetições, no entanto, apenas uma ave recebeu a concentração de 500 mg/ave. As aves foram observadas diariamente, por seis (6)

dias, para a presença de alterações no consumo de ração e sinais clínicos que viessem a afetar o desempenho das aves.

As aves foram necropsiadas 24 horas (1 dia), 72 horas (3 dias) e 166 horas (6 dias) após a inoculação das substâncias testes, para a avaliação de lesões macroscópicas.

Tabela 1 – Descrição dos grupos de aves que receberam glucano no músculo peitoral profundo, as diferentes concentrações de glucano insolúvel e solúvel na forma sulfatada e fosfatada.

Tratamento N° do grupo	Identificação das aves testada	Forma da Substância	Dose mg/ave	Quantidade aplicada (ml) respectivamente ave 1, 2, 3
1	Ave: 1, 2, 3, 4	Sulfatada	31	0.5; 0.5; 0.5; 0.6
2	Ave: 1, 2, 3, 4	Sulfatada	62	0.5; 0.5; 0.5; 0.5
3	Ave: 1, 2, 3, 4	Sulfatada	125	0.5; 0.5; 0.5; 0.6
4	Ave: 1, 2, 3, 4	Fosfatada	31	0.5; 0.5; 0.5; 0.5
5	Ave: 1, 2, 3, 4	Fosfatada	62	0.6; 0.6; 0.6; 0.6
6	Ave: 1, 2, 3, 4	Fosfatada	125	0.5; 0.5; 0.6; 0.6
7	Ave: 1, 2, 3, 4	Insolúvel	31	0.5; 0.5; 0.5; 0.6
8	Ave: 1, 2, 3, 4	Insolúvel	62	0.8; 0.8; 0.8; 0.9
9	Ave: 1, 2, 3, 4	Insolúvel	250	3; 3; 3; 2.8
10	Ave: 1, 2, 3, 4	Insolúvel	125	1;1;1;1
11	Ave: 1, 2, 3, 4	Insolúvel	500	3

4.5.1 Análise histopatológica

Após 24, 48 e 72 horas da inoculação da substância teste, foi colhido um fragmento do músculo peitoral, do local injetado. Este foi fixado em formol 10% e encaminhado ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP para ser incluído em parafina, obtidos os cortes histopatológicos e a coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

4.6 Local, instalações e equipamentos do experimento

Os experimentos foram realizados no Centro Experimental de Patologia Aviária – FMVZ/USP, em ciclo de 42 dias. As aves foram criadas em um galpão convencional de alvenaria com cobertura de telha de cimento amianto, piso de concreto, tela de arame malha

2,3 cm, mureta de alvenaria de 60 cm, laterais protegidas por cortinas de plástico, com sistema móvel de catraca para sua movimentação no controle do ambiente interno do galpão que contém 30 unidades experimentais independentes de 1,7 m² cada.

Os equipamentos utilizados foram campânulas elétricas para aquecimento, comedouros tubulares e bebedouros pendulares, para a suplementação de luz à noite, foi utilizado aparelho regulador de luminosidade (*Timer*).

4.7 Manejo das aves

Os boxes receberam maravalha ou cepilho de madeira novo como cama de aviário. O controle da temperatura nos boxes, bem como o manejo das cortinas, foi realizado de acordo com as necessidades das aves. Sendo que do 1º ao 17º dia houve a necessidade de aquecimento artificial dos pintainhos.

Foi adotado um programa com 24 horas de luz até o 12º dia, e a partir do 13º dia até o final de criação com a finalidade de evitar a síndrome da morte súbita, optou-se a prática de 18 horas de luz intermitente, sendo que à noite após três horas de escuridão, fornecia-se uma hora de claridade.

As aves foram alimentadas com ração comercial sem a adição de promotor de crescimento e ionóforos, e tanto a ração e a água foram fornecidas *ad libitum* durante todo período experimental, e foram criadas sob manejo recomendado para a linhagem.

4.8 Primeiro experimento *in vivo*

4.8.1 Aves

Foram alojados 350 frangos de corte de 1 dia de idade, machos, da linhagem comercial Ross® para a criação de 42 dias de idade. Com exceção do grupo controle sem vacina/glucano que foi alojado em outro galpão, as aves do grupo controle vacinadas sem glucano e vacinadas com glucano foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizados em 20 boxes, com 16 aves em cada box. Cada tratamento apresentava duas (02) repetições, sendo que de cada uma delas foi retirado 2 aves, portanto de cada tratamento coletava-se 4 aves para serem avaliadas. Os diferentes tratamentos, o programa de vacinação proposto, as vias de administração das vacinas e do glucano estão descritos na (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos tratamentos, vacinação, números de aves e os procedimentos para a criação de frangos num ciclo de criação de 42 dias.

Tratamentos – Nome Comercial da Vacina	Dias e Vias de Vacinação	Dias de Coleta Sangue e Baço
T1 – Controle Branco (Zero) <ul style="list-style-type: none"> Sem vacina Sem glucano 	- -	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T2 – Controle – Programa Vacinal Sem Glucano <ul style="list-style-type: none"> Bouba aviária + Marek Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T3 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> Bouba + Marek associado a 30 µg de glucano sulfatado Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T4 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> Bouba + Marek associado a 60 µg de glucano sulfatado Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T5 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> Bouba + Marek associado a 90 µg de glucano sulfatado Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T6 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> Bouba + Marek associado 120 µg de glucano sulfatado Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T7 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> Bouba + Marek associado a 30 µg de glucano fosfatado Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T8 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> Bouba + Marek associado a 60 µg de glucano fosfatado Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
T9 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> Bouba + Marek associado a 90 µg de glucano fosfatado Bronquite infecciosa + Newcastle Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º

T10 – Vacinas – Programa Vacinal <ul style="list-style-type: none"> • Boubas + Marek associado 120 µg de glucano fosfatado • Bronquite infecciosa + Newcastle • Gumboro 	1º dia – SC 7º dia – Ocular 14º dia – Ocular	1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º
--	--	------------------------------------

4.8.2 Dosagem padrão

Com exceção dos tratamentos 1 e 2 que foram respectivamente os controles sem vacina/glucano e vacinados/sem glucano. Optou-se em não testar a forma cloro hidratado porque foi menos eficiente no cultivo de fibroblasto. Nesse experimento as concentrações estudadas para glucano solúvel na forma sulfatada e fosfatada foram de 30, 60, 90 e 120 µg por dose de vacina. A determinação destes valores ocorreu após a obtenção dos resultados de concentração de β-glucano nas três partidas obtidas do produto solúvel. Como os glucanos solubilizados nas formas fosfatada e sulfatada apresentaram, respectivamente, 81 e 58% de garantia de glucanas totais, realizou-se a correção para cada respectivas doses no diluente vacinal de 1000 doses. Conforme descrito na (Tabela 2), a associação dessas concentrações de β-glucan só ocorreu com a vacina de boubas e Marek no 1º dia de idade.

4.8.3 Especificações das vacinas comerciais utilizadas

- a) Vacina Contra Boubas Aviária Diftovax®, (Laboratório Merial S/A., Campinas, S.P., Brasil), cepa suave, amostra de vírus pox-galinha em cultura celular de fibroblasto de embrião de galinha livre de agentes patogênicos específicos (SPF), adicionado de estabilizador viral e liofilizado.
- b) Vacina contra doença de Marek Cryomarex HVT®, (Laboratório Merial S/A., Campinas, S.P., Brasil), vacina viva congelada contra doença de marek (cepa Herpes Vírus Turkey) associada à célula.
- c) Vacina contra Bronquite Infecciosa das Aves Chick Uni Bronc Tipo Mass®, (Laboratório Lohmann Saude Animal S/A., Cuxhaven, Alemanha).

- d) Vacina contra doença de Newcastle tipo B1, (Laboratório Lohmann Saude Animal S/A., Cuxhaven, Alemanha).

4.8.4 Colheita de amostras

Neste experimento foram realizadas colheitas de amostras no 1°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35° e 42° dia de idade das aves, sendo obtido o baço e amostras sanguíneas para a obtenção de soro. As amostras de sangue foram coletadas individualmente na veia da asa ou diretamente por punção cardíaca através de seringas e agulhas estéreis e colocadas em tubos de Falcon inclinados. Para facilitar a separação do soro foi deixado na estufa a 37 °C por 30 minutos, e 1 hora em geladeira para retração do coágulo, logo em seguida os soros foram alicotados em microtubos de eppendorfs e centrifugado por 5 minutos 3.000 rpm, novamente foram alicotados e armazenados em eppendorfs definitivos e guardados em geladeira. Os baços eram coletados e imediatamente depositados em microtubos de eppendorfs e armazenados em garrafas térmicas contendo nitrogênio líquido, todo esse processo teve o intuito de evitar a degradação do RNA. No laboratório os microtubos de eppendorf contendo baços foram armazenados definitivamente no -80 °C.

4.8.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Foram utilizados *kits* CIVTEST (Laboratório Hipra S/A, Girona, Espanha) para a detecção de anticorpos para as doenças de: Bronquite Infecciosa das Galinhas, Doença de Gumboro e Doença de Newcastle. Os procedimentos foram realizados segundo as orientações do fabricante. Todas as amostras, assim como o controle positivo e negativo foram analisados em duplicata, sendo o resultado expresso como a média destas. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 405nm (MicroQuant, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

4.9 Segundo experimento *in vivo*

4.9.1 Aves

Foram alojados 672 frangos de corte de um (01) dia de idade, machos, da linhagem comercial AgRoss® para criação de 40 dias de idade. Houve a formação de três ambientes isolados e distantes entre si para o alojamento das aves. O grupo controle normal (T1) foi alojado isoladamente em um galpão. Os outros grupos controles T2, T3, T4 e T5 foram alojados separadamente em outro ambiente com 32 aves em cada unidade experimental. As demais aves foram distribuídas em mais 16 tratamentos com duas repetições em um delineamento inteiramente casualizados em 32 boxes, sendo 16 aves em cada box. Em cada unidade experimental foram retiradas duas (02) aves, portanto de cada tratamento coletava-se quatro (04) aves para serem avaliadas. O programa de vacinação encontra-se no (Tabela 3). Os diferentes tratamentos e seus respectivos programas vacinais e as doses aplicadas de β -Glucano estão descritos no (Tabela 4).

Tabela 3 - Programa de vacinação.

Programa	Idade de Vacinação	Vacinas	Via Aplicação
1	1º dia	(Bouba) = Diftovax - Merial + (Marek+Gumboro) = Vaxxitec - Merial (BIG) = Bioral H -120 – Merial	Subcutânea Ocular
2	1º dia	(Bouba) = Diftovax - Merial + (Marek) = Cryomarex HVT - Merial (IBDV) = Bur 706 R - Merial + (BIG) = Bioral H -120 - Merial	Subcutânea Ocular
3	1º dia	(Bouba) = Diftovax - Merial + (Marek) = Cryomarex HVT - Merial (BIG) = Bioral H -120 – Merial	Subcutânea Ocular
4	10º dia	(IBDV) = Bur 706 R - Merial	Ocular

Tabela 4 – Descrição dos tratamentos e a combinação dos programas de vacinação.

Tratamento	Descrição	Programa
T1	Controle normal	Nenhum
T2	Controle vacinado	1
T3	Controle vacinado	2
T4	Controle vacinado	2 + 4
T5	Controle vacinado	3 + 4
T6	60µg	1
T7	120µg	1
T8	240µg	1
T9	480µg	1
T10	60µg	2
T11	120µg	2
T12	240µg	2
T13	480µg	2
T14	60µg	2 + 4
T15	120µg	2 + 4
T16	240µg	2 + 4
T17	480µg	2 + 4
T18	60µg	3 + 4
T19	120µg	3 + 4
T20	240µg	3 + 4
T21	480µg	3 + 4

4.9.2 Descrição dos tratamentos, dosagens e via de administração

A descrição dos tratamentos, dosagens e vias de administração estão descritas nas (Tabelas 4). Neste experimento se utilizou as concentrações de 60, 120, 240 e 480 µg de β-glucano/dose associada a diferentes combinações de tratamentos com os programas vacinais como descrito no (Tabela 3).

4.9.3 Especificações das vacinas comerciais utilizadas

- a) Vacina Contra Bouda Aviária Diftovax® (Laboratório Merial S/A., Campinas, S.P., Brasil), cepa suave, amostra de vírus pox-galinha em cultura celular de fibroblasto de embrião de galinha livre de agentes patogênicos específicos (SPF), adicionados de estabilizador viral e liofilizados.
- b) Vacina contra as doenças de Marek e Gumboro Vaxxitec®, (Laboratório Merial S/A., Campinas, S.P., Brasil), vacina vetorial congelada, contra a doença de Marek (cepa do Herpes Vírus Turkey) e contra a doença de Gumboro (gene VP₂) inserido no genoma do HVT associado à célula.
- c) Vacina contra doença de Marek Cryomarex HVT®, (Laboratório Merial S/A., Campinas, S.P., Brasil), vacina viva, congelada, contra a doença de Marek (cepa Herpes Vírus Turkey) associada à célula.
- d) Vacina contra a doença de Gumboro Bur® 706 R, (Laboratório Merial S/A., Campinas, S.P., Brasil), vacina viva, liofilizada, cepa R 706.
- e) Vacina contra Bronquite Infecciosa das Aves Bioral® H-120, (Laboratório Merial S/A., Campinas, S.P., Brasil), vacina viva, liofilizada, cepa Massachusetts.

4.9.4 Colheita de amostras

Neste experimento foram realizadas colheitas de amostras no 1°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35° e 40° dia de idade das aves, sendo obtido o baço e amostras sanguíneas para a obtenção de soro. Os procedimentos para a separação de soro e armazenamento de baços foram os mesmos já descritos no item 4.8.4.

4.9.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi realizado no laboratório de Ornitopatologia da FMVZ/USP. Foram utilizados *kits* comerciais CIVTEST™ (Laboratórios Hipra, Girona,

Espanha) para a detecção de anticorpos para as doenças de: Bronquite Infecciosa das Galinhas e Doença de Gumboro. Os procedimentos para a realização de ELISA foram fielmente seguidos conforme as instruções do fabricante. Todas as amostras, assim como o controle positivo e negativo foram analisados em duplicata, sendo o resultado expresso como a média destas. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 405nm (MicroQuant, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A reação em cadeia da polimerase em tempo real é uma técnica que monitora a fluorescência emitida durante a reação como resultado da amplificação de um determinado produto a cada ciclo (em tempo real), ao contrário das técnicas de detecção convencional (ao término da reação).

A técnica de PCR em tempo real foi realizada com as amostras do segundo experimento, dos grupos: T1- Controle normal; T2- Controle vacinado sem β -glucano; T3- Vacinado com 30 μ g de β -glucano; T4- Vacinado com 60 μ g de β -glucano; T5- vacinado com 90 μ g de β -glucano e T6- Vacinado com 120 μ g de β -glucano. Todo β -glucano utilizado foi o solubilizado, na forma sulfatada.

A técnica exige a padronização da curva de dissociação, para estabelecer a concentração de cDNA e especificidades dos *primers* nas reações.

4.10.1 Extração de RNA

A manipulação de RNA requer o máximo cuidado, uma vez que a molécula de RNA é sensível a degradação por RNases presentes em grande quantidade no ambiente. Tal procedimento necessita da utilização de luvas, as quais devem ser trocadas com frequência durante o procedimento e limpas com dietilpirocarbonato (DEPC). Como na extração de DNA, esta metodologia consiste em lisar a membrana das células na presença de solução de tiocianato-fenol-clorofórmio guanidina (TRIZOL, Invitrogen, USA) e clorofórmio. Após a exposição do conteúdo celular, o RNA total torna-se visível na presença de isopropanol. O RNA extraído é solubilizado em água livre de RNase e deve ser armazenado a -80 °C. Uma extração de boa qualidade é aquela em que se identificam duas bandas no gel de agarose 1,5%, que são os RNA ribossomais 28S e 18S. As extrações de RNA foram realizadas com o seguinte protocolo:

- a) adicionar ao microtubo 60 mg de amostra do baço;
- b) acrescentar 750µL de TRIzol® e macerar com pistilo;
- c) incubar 5 minutos em temperatura ambiente;
- d) adicionar 150 µL de clorofórmio e homogeneizar;
- e) incubar 2 minutos em temperatura ambiente;
- f) centrifugar 12.000 G 4 °C por 20 minutos;
- g) transferir o sobrenadante (200 a 250 µL) para um novo microtubo contendo 630µL de isopropanol gelado;
- h) incubar minutos no gelo;
- i) centrifugar por 17 minutos a 12.000 G, a 4 °C e desprezar o sobrenadante;
- j) adicionar 950 µL de etanol 70% tratado com DEPC gelado, homogeneizar, centrifugar 12.000 G, 4°C 10', desprezar o sobrenadante. Repetir este procedimento uma vez mais;
- l) secar pellet, deixando o microtubo invertido;
- m) ressuspender em 100 µL de água ultrapura tratada com DEPC até a completa solubilização;
- n) armazenar em -80 °C.

4.10.2 Quantificação da concentração e determinação da razão A260/280

O RNA extraído foi diluído na proporção de 1:5 em água ultrapura autoclavada e tratada com DEPC. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 260 e 280 nm. (Biophotometer®, Eppendorff, Alemenha). A razão dos valores de absorvância 260/280 nm determina a concentração em ng/µL. Considera-se que uma boa extração de qualidade deve apresentar valores entre 1,7 a 2,0 ng/µL. Foram utilizados apenas os RNAs totais que apresentaram absorvância entre esses valores.

4.10.3 Eletroforese em gel de agarose 1,5%

O RNA extraído foi diluído 1:1 da seguinte forma: 5 µL de amostra em 3 µL de água ultrapura tratada com DEPC e 2 µL de corante.

A integridade do RNA foi verificada após a eletroforese em gel de agarose 1,5%, com amperagem a 63 Volts e corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL por 15 minutos.

A (Figura 5) apresenta o resultado de uma extração com RNA degradado e a (Figura 6) mostra o resultado de uma extração de boa qualidade.

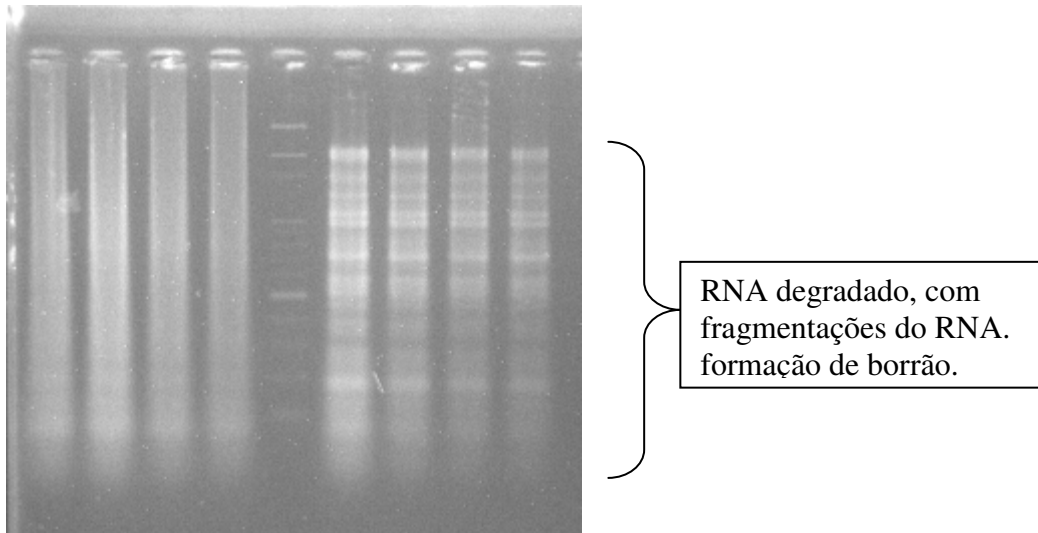


Figura 5 - RNA degradado.

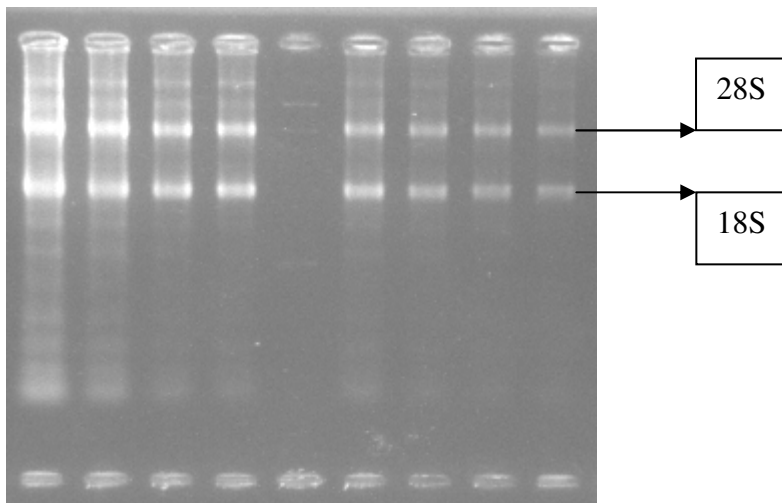


Figura 6 - RNA íntegro.

4.10.4 Preparo do DNA complementar (cDNA)

Como as amostras apresentaram uma alta concentração de RNA, determinadas pela absorbância (item 4.8.2), as amostras foram diluídas para uma concentração de 800 ng por reação. Estas foram diluídas com água ultrapura, autoclavada e contendo DEPC. A fórmula $C_i V_i = C_f V_f$ foi utilizada, onde C_i = concentração inicial, V_i = volume inicial, C_f = concentração final, V_f = volume final.

O preparo do cDNA consta de duas etapas, inicialmente ocorre o tratamento com DNase para a remoção do DNA genômico. O volume do RNA extraído após a padronização de concentração, foi adicionado ao *Mix 1* contendo 1 μ L de *DNase I Buffer* (10X), 1 μ L de *DNase I* (100U) e uma quantidade suficiente de água DEPC para completar para um volume de reação de 10 μ L. A reação foi mantida por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 2 μ L de EDTA 25 mM e a reação foi incubada 65 °C por 10 minutos. Entre cada etapa da reação, esta foi mantida em gelo para não existir risco de desnaturação. Após esse período foi adicionado 0,5 mg de Oligo DT e 1 μ L de dNTP 10 mM. A reação foi mantida a 65 °C por 5 minutos.

Na segunda etapa ocorre o tratamento com RNase, a qual ao produto obtido da primeira etapa da reação se adiciona o *Mix 2* contendo: 4 μ L de *First Strand Buffer* (5X), 2 μ L de DTT 0,1 M e 1 μ L de *RNase OUT* (5 000 UI). A reação foi incubada 42 °C por 2 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1 μ L de M-MLV RT (Invitrogen, USA) (40.000 U) e a reação foi submetida a um ciclo de 42 °C por 50 minutos, 70 °C por 15 minutos, resfriando à 4 °C em termociclador (Biometra, Alemanha). Em seguida, foi adicionado 1 μ L de *Rnase H* (30 U) e submetida a incubação de 37 °C por 20 minutos, sendo o produto conservado à -20 °C até uso.

4.10.5 PCR em tempo real com o uso do sistema *SybrGreen*

A reação da cadeia da polimerase em tempo real foi realizada usando o sistema *SybrGreen* (Invitrogen, USA). Este sistema baseia-se na afinidade do fluoróforo *SybrGreen* pela molécula de DNA de dupla fita. Dessa forma, os produtos da amplificação emitem luminosidade proporcional a sua concentração.

Na reação, foram utilizados 12,5 μ L de *Master Mix* (*SybrGreen*, *Invitrogen*, USA), 0,5 μ L de corante ROX (*5-carboxi-X-rodamine*), 1 μ L de cada *primer* 10 pMol e 1 μ L de cDNA

(45 ng), o volume final de 25 μ L foi ajustado com água ultra pura. A amplificação e a detecção de produtos específicos foram realizadas pelo sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems), com os seguintes ciclos: 1 ciclo de 50 °C por 2 minutos, 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos, 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 65 °C por 1 minuto, conforme as instruções do fabricante. A especificidade dos *primers* foi avaliada através da curva de dissociação. A seqüência dos *primers* para os genes da IL-2, do INF- γ e do 28S (RNA alvo) utilizada foram aquelas descritas por KAISER et al. (2000).

4.10.6 PCR em tempo real com o uso do sistema *Taqman*

A reação da cadeia da polimerase em tempo real foi realizada usando o sistema *Taqman* (Applied Biosystems, USA). Neste sistema além de se usar um par de *primers*, é necessário a utilização de uma sonda. Como a sonda suporta temperaturas mais altas, isto é um determinante para que a reação torne-se mais específica. Cada fita de DNA tem sua temperatura de *melting* (T_m) específica, que é definida como a temperatura em que 50% das fitas de DNA tornam-se fitas simples. A sonda apresenta na sua extremidade 5' (cinco linha) um fluoróforo, denominado R para *reporter*, e na extremidade 3' (três linha) o *Quencher*, uma molécula que tem a finalidade de absorver um sinal luminoso emitido pelo *reporter*. Quando a sonda está degradada a luminosidade emitida pelo *reporter* não é absorvida pelo *Quencher* devido à distância, sendo possível a captura desta pelo aparelho. A (Figura 7) mostra a representação esquemática da sonda, e a (Figura 8) a da reação.

Na reação foram utilizados 12,5 μ L de *Master Mix* (Applied Biosystems, USA), 1,25 μ L de *assay* (Gg0337979_g1, Applied Biosystems, USA), e 1 μ L de cDNA (45 ng), o volume final de 25 μ L foi ajustado com água ultra pura. A amplificação e a detecção de produtos específicos foram realizadas pelo sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, USA), com os seguintes ciclos: 1 ciclo de 50 °C 2 minutos, 1 ciclo 95 °C por 10 minutos, 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 65 °C por 1 minuto. A seqüência do *assay* desenhado para a IL-6 foi baseada na seqüência genômica NM_204628.1.

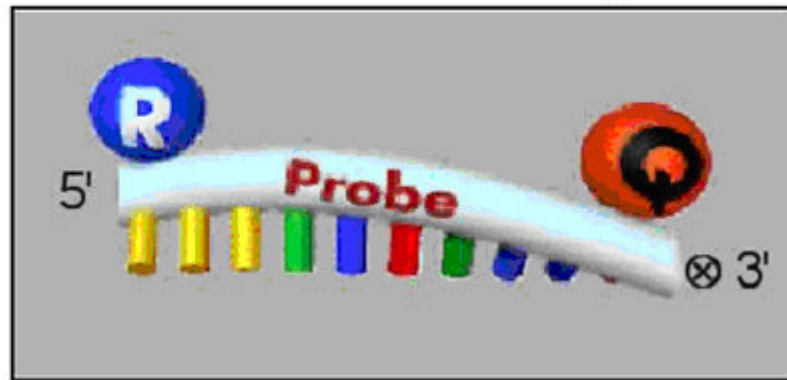


Figura 7 – Representação esquemática da sonda.

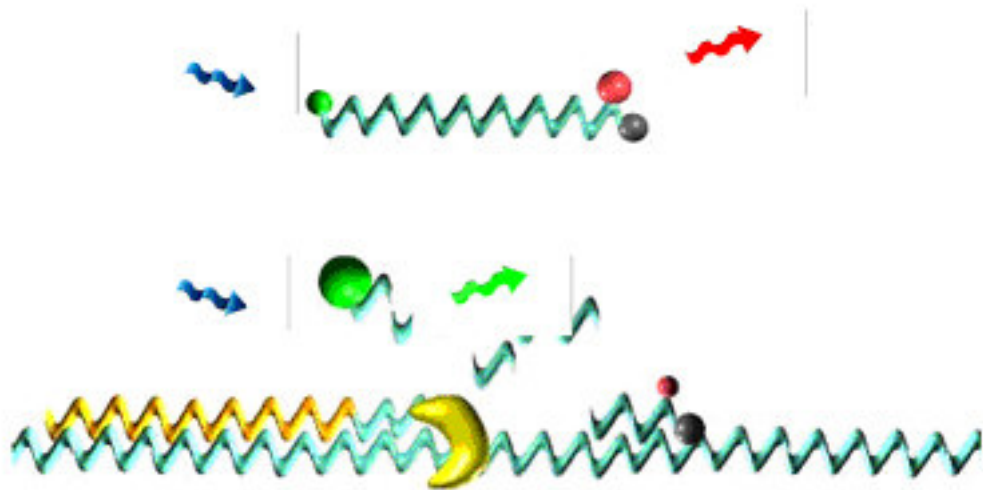


Figura 8 – Representação esquemática da reação.

5 RESULTADOS

5.1 Solubilização da fração glucana (Insolúvel)

As análises realizadas pela empresa fornecedora do glucano, a Biorigin – Zillo Lorenzetti S/A mostraram 81, 58 e 80% de β -glucano totais nas formas fosfatada, sulfatada e cloro hidratada, respectivamente.

5.2 Efeito do β -glucano sobre cultivos celulares de fibroblastos de embrião de galinha SPF e seu comportamento na associação com a vacina de Marek

A microscopia ótica mostrou a formação de uma monocamada celular uniformemente distribuída com alterações morfológicas e funcionais compatíveis com o efeito citopático (EC) características do herpes vírus de perus (HVT).

A multiplicação do vírus HVT ocorreu sobre a monocamada de fibroblastos de embrião de galinha (FEG) tanto no controle como naqueles que apresentavam o β -glucano solúvel em qualquer das concentrações analisadas. A quantidade de placas visualizadas ocorreu conforme a concentração de títulos esperados em unidades formadoras de placas (UFP) na diluição da vacina. A (Figura 9) mostra a presença de unidades formadoras de placas em fibroblasto com a vacina.

Foi observado após 24 horas da infecção, a formação de vacúolos citoplasmáticos nas concentrações de 1.200, 600 e 300 μ g/dose de β -glucano tanto com glucano solubilizado na forma sulfatada como fosfatada. Não houve a formação de vacúolos nos controles ou com β -glucano solubilizado na forma cloro hidratada. A presença de vacúolos em fibroblastos de embrião de galinha encontra-se na (Figura 10).

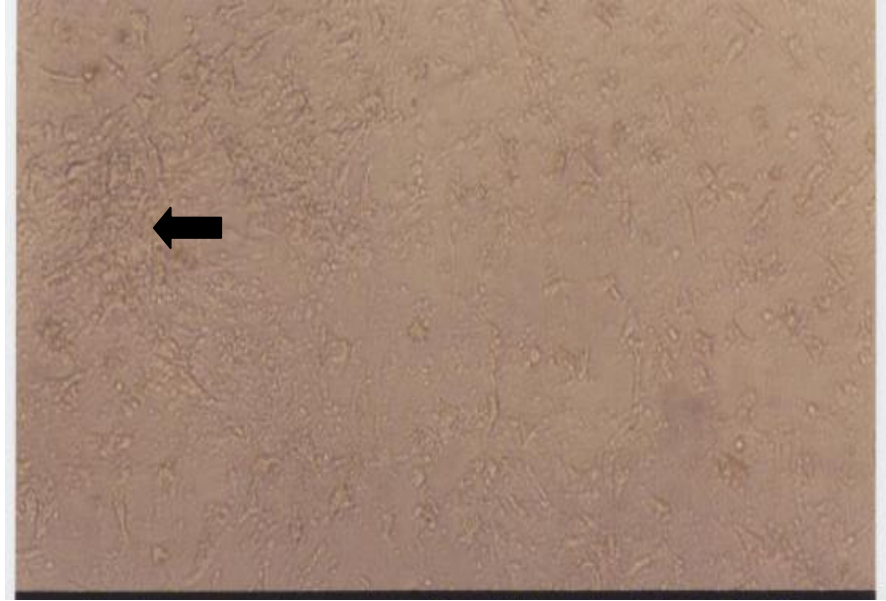


Figura 9 - Fibroblasto de embrião de galinha infectado com o vírus de Marek a seta mostra um unidade formadora de placa (100 X).

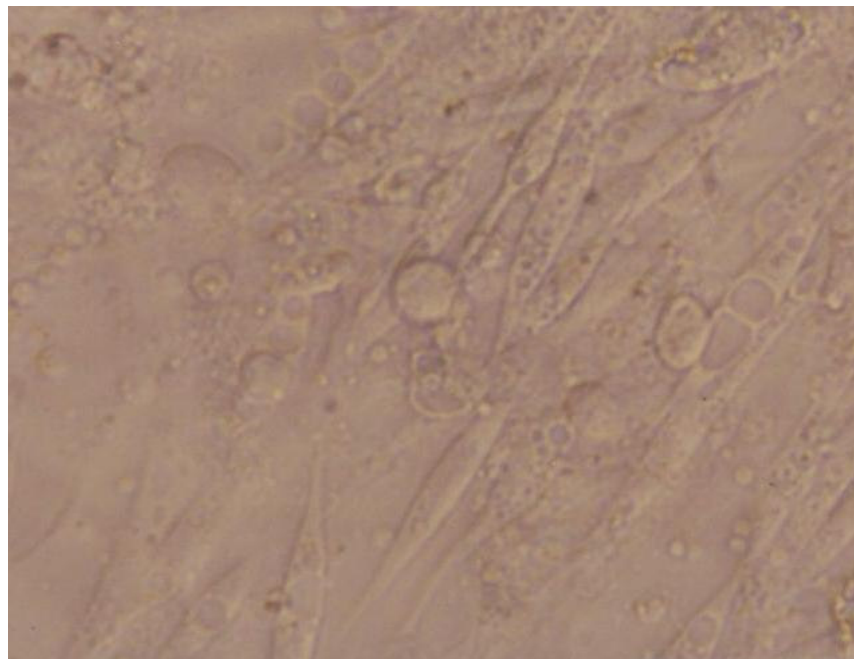


Figura 10- Fibroblastos de embrião de galinha infectados com o vírus de Marek associado ao β -glucano, mostrando a vacuolização do fibroblasto (200 X).

5.3 Microscopia eletrônica

Através das análises das fotomicrografias (Figuras 11 e 12) observou-se que o glucano liofilizado e passado em rede de inox de 150 mesh mostrava imagens de moléculas ou agregados de moléculas irregulares, com tamanhos superiores a 2 μ diâmetro.

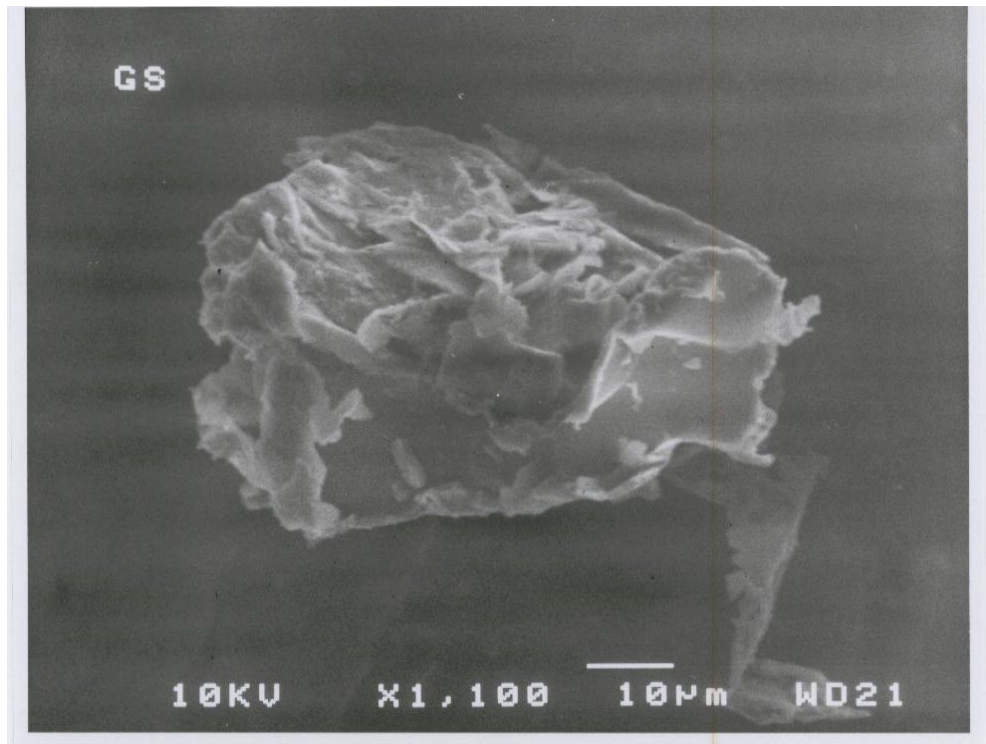


Figura 11 - Fotomicrografia por varredura de moléculas de β -glucano (1.100 X)

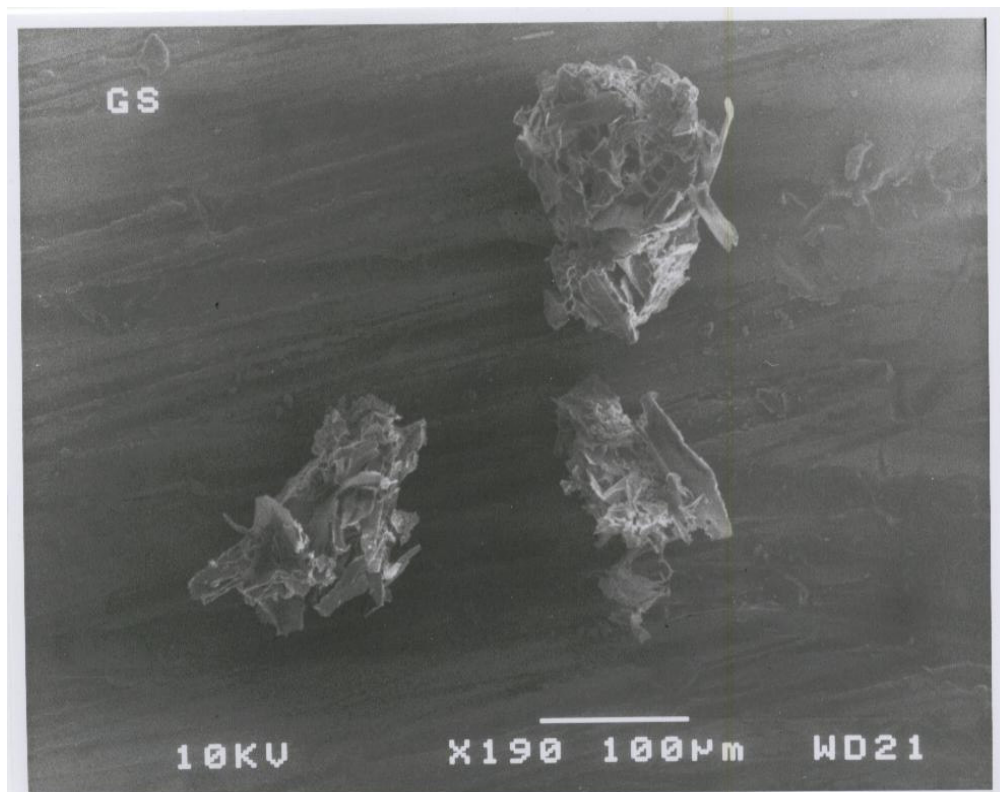


Figura 12 - Fotomicrografia por varredura de moléculas de β -glucano (190 X).

5.4 Avaliação do β -glucano solúvel e insolúvel sobre o músculo peitoral das aves

Não se observou qualquer alteração no consumo de ração, comportamento e características das fezes das aves, durante o período de seis dias.

As aves, necropsiadas após 24 horas da injeção, que receberam glucano insolúvel apresentaram lesões macroscópicas de intensidade dependente da concentração deste, existindo na dose de 500 mg/ave a presença de substância inerte com área necrótica. As aves que receberam glucano solúvel apresentaram pequenas alterações macroscópicas. Com o β -glucano sulfatado, na dose de 125 mg/ave, se observou a presença de congestão no ponto de injeção, enquanto que com o glucano fosfatado, na dose de 125 mg/ave, verificou-se ausência de processo inflamatório, mas com substância não absorvida entre a musculatura peitoral, estes resultados encontram-se no (Tabela 5).

Uma ave de cada grupo foi necropsiada 72 horas (3 dias) e 166 horas (6 dias) após a injeção das substâncias testes. No local de aplicação do β -glucano solúvel não houve

nenhuma alteração macroscópica no músculo peitoral. Entretanto, o glucano insolúvel manteve até o 6º dia após a aplicação lesões com formação de placas caseosas com extensão que variaram de 5 a 10 cm, envoltas por uma região hemorrágica. As lesões encontradas no 6º dia estão demonstradas nas (Figuras 13, 14, 15, 16), as observações macroscópicas estão descritas no (Tabela 5).

Após 24 horas em algumas concentrações de glucano solúvel tanto na forma sulfatada quanto fosfatada apresentaram uma leve lesão no músculo peitoral. Após esse período a substância foi totalmente absorvida pelo organismo. Enquanto o glucano insolúvel após 6 dias da injeção ainda apresentava um forte processo inflamatório. Assim, a utilização do glucano solúvel até 125 mg/ave, não provocou nenhuma reação adversa no ponto de injeção, enquanto que o insolúvel desqualificou a carcaça.

Tabela 5 – Descrição das lesões de uma ave de cada tratamento que receberam diferentes concentrações e forma de obtenção do glucano após 24 horas da inoculação.

Tratamento N° do grupo	Dose mg	Substância Injetada	Descrição
1	31	Glucano Sulfatado	Nenhuma alteração.
2	62	Glucano Sulfatado	Observou-se áreas de congestão entre a musculatura peitoral, na região onde ocorreu a injeção com o glucano
3	125	Glucano Sulfatado	Observou-se pequenas áreas de congestão no local da injeção.
4	31	Glucano Fosfatado	Peito direito levemente escuro, lesão bem evidente com área de necrose no peito superficial de +- 1 cm ² .
5	62	Glucano Fosfatado	Sem processo inflamatório. Substância não absorvida encontrada entre a musculatura peitoral.
6	125	Glucano Fosfatado	Sem processo inflamatório. Substância não absorvida encontrada entre a musculatura peitoral.
7	31	Glucano Insolúvel	Processo inflamatório intenso, com áreas de hemorragia e formação de placas caseosas.
8	62	Glucano Insolúvel	Processo inflamatório intenso, com formação de placas caseosas.
9	250	Glucano Insolúvel	Encontrada substância inerte, com formação de encapsulamento profundo e processo inflamatório intenso.
10	125	Glucano Insolúvel	Encontrada substância inerte, áreas de necrose com presença de placas caseosas.
11	500	Glucano Insolúvel	Encontrada substância inerte com área necrótica.



Figura 13 - Efeito de 31 mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção.



Figura 14 - Efeito de 62 mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção.



Figura 15 - Efeito de 125mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção.



Figura 16 - Efeito de 250 mg de glucano insolúvel, após 6 dias da injeção.

5.5 Análises histopatológicas

A análise histopatológica revelou a presença de alterações vasculares em todos os tratamentos realizados. O glucano insolúvel foi o que apresentou a maior intensidade de lesões como: fragmentação de fibras musculares, hialinização das fibras musculares, infiltração de heterófilos, infiltração de linfócitos, evidência de proliferação de fibroblastos, formação de sincícios e/ou células gigantes, sendo que estes efeitos foram mais evidentes após 72 horas da inoculação. O glucano sulfatado apresentou pequenas alterações vasculares, fragmentação de fibras musculares e hialinização de fibras musculares, em 72 horas, quando comparado ao β -glucano fosfatado que apresentou também necrose de fibras musculares.

As lesões histopatológicas sugerem que o glucano solúvel na forma sulfatada é a substância que causou a menor injúria no tecido muscular. A análise histopatológica da ação do glucano insolúvel no músculo peitoral confirmou os resultados macroscópicos que desqualificam a carcaça, com miosite focal aguda nas 24 horas de observação e conduziu a crônica em 72 horas. Estes resultados encontram-se no (Tabela 6).

Tabela 6 – Descrição de lesões histopatológicas após 24, 48 e 72 horas no músculo peitoral de frangos após receberem a inoculação de β -glucano insolúvel e solúvel nas formas fosfatada e sulfatada.

Lesões histopatológicas	Glucano								
	Glucano Fosfatado			Glucano Sulfatado			Glucano Insolúvel		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Alterações vasculares	++	+	+	+	+	+	+	++	++
Fragmentação das fibras musculares	++	++	++	+ (focal)	+ (focal)	+ (focal)	++	++	++
Hialinização das fibras musculares	+	+	+	+	+	+	++	++	++
Necrose das fibras musculares	++	+	+	-	-	-	+	+	+
Infiltração de heterófilos	-	-	-	++	+	-	+++	+	+
Infiltração de linfócitos	+	-	-	-	+	-	+	++	++
Evidencia de proliferação de fibroblastos	-	-	-	-	-	-	-	++	++
Macrófagos, formação sincícios e/ou células gigantes	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Diagnóstico:	1	-	-	3	-	-	4	5	5

Nenhuma lesão visualizada: (-) negativo

Grau de incidência das lesões visualizadas: (+) leve

(+) moderada

(+) severa

O símbolo tracejado corresponde a um resultado não conclusivo ou local de nenhuma alteração, os números citados correspondem a observações que sugerem:

- 1) Migração linfocítica, sugerindo ativação de linfócitos.
- 2) Miosite heterofílica difusa aguda severa, inflamação muscular com grande deslocamento de heterófilos para a região inflamada.
- 3) Miosite heterofílica focal moderada , inflamação muscular envolvendo um local mais limitado com leve gravidade, processo de injúria caminhando para o restabelecimento celular da região.
- 4) Miosite heterofílica focal aguda, inflamação muscular localizada com processo inflamatório em desenvolvimento no local da ação do agente lesivo.
- 5) Miosite linfocítica focal crônica, inflamação muscular localizada com uma reação tecidual caracterizada pelo aumento dos graus de celularidade e de outros tecidual elementos teciduais mais próximos da reparação, diante da permanência do agente agressor.

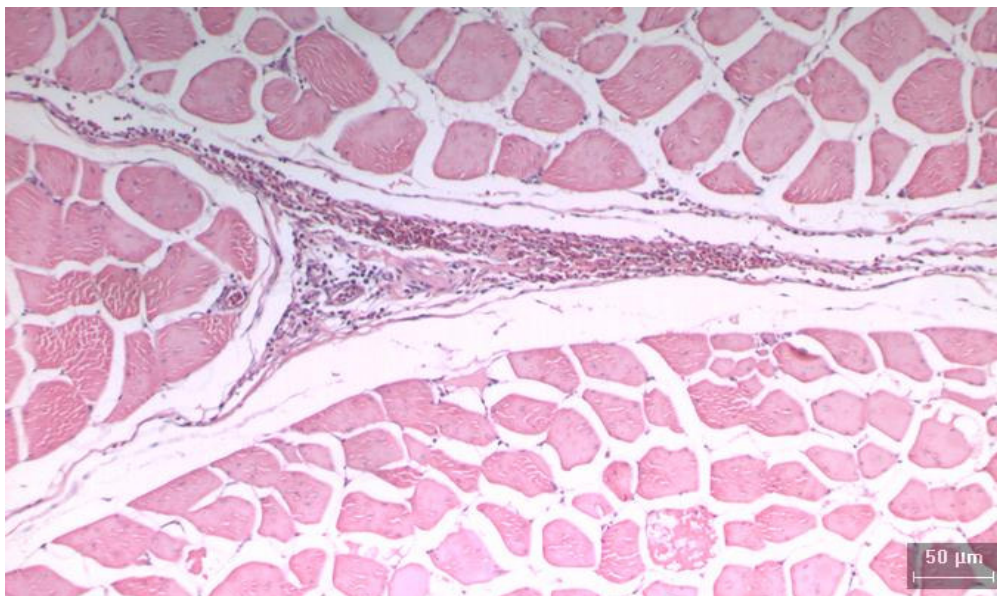


Figura 17 – Miosite heterofílica focal moderada após 24 horas da inoculação de β -glucano solúvel na forma sulfatada. (Aumento 10X)

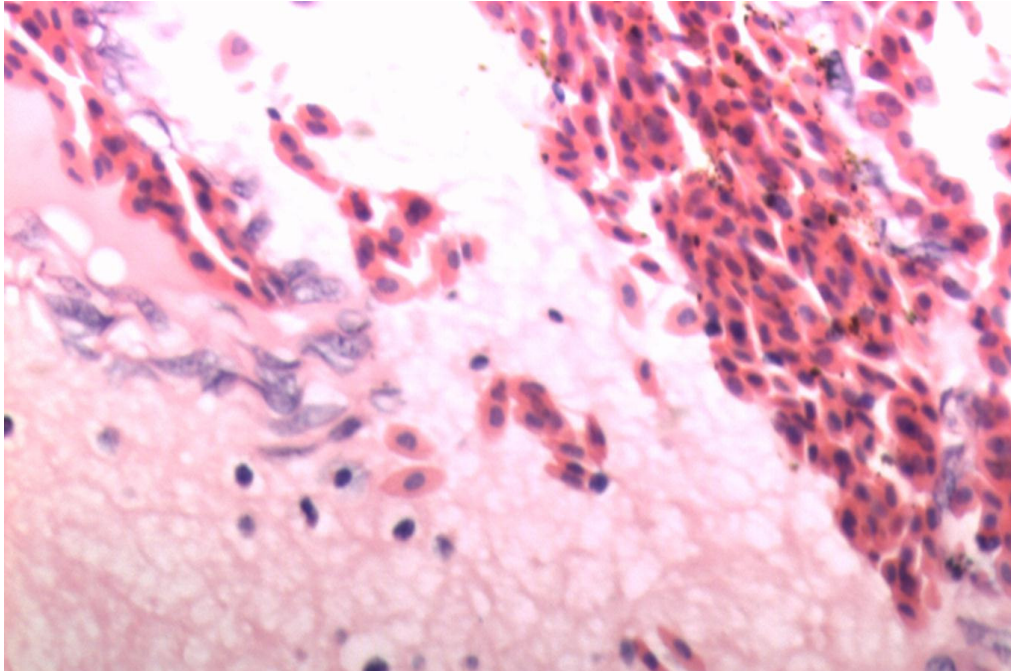


Figura 18 – Miosite heterofilica focal moderada após 24 horas da inoculação de β -glucano solúvel na forma sulfatada. (Aumento 40X)

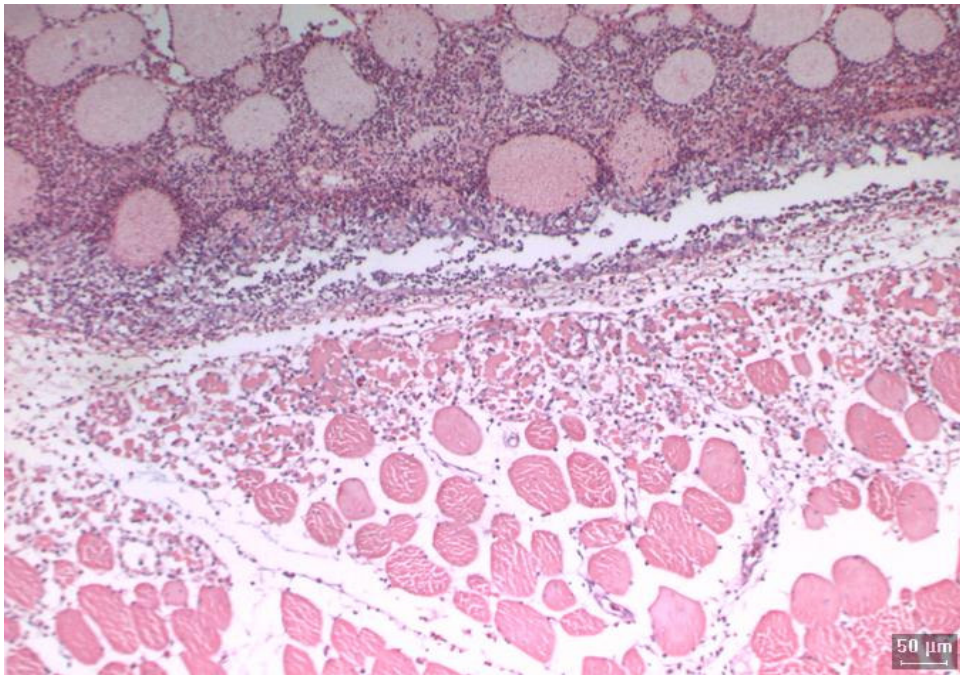


Figura 19 – Miosite heterofilica focal aguda após 24 horas da inoculação de β -glucano insolúvel. (Aumento 10X)

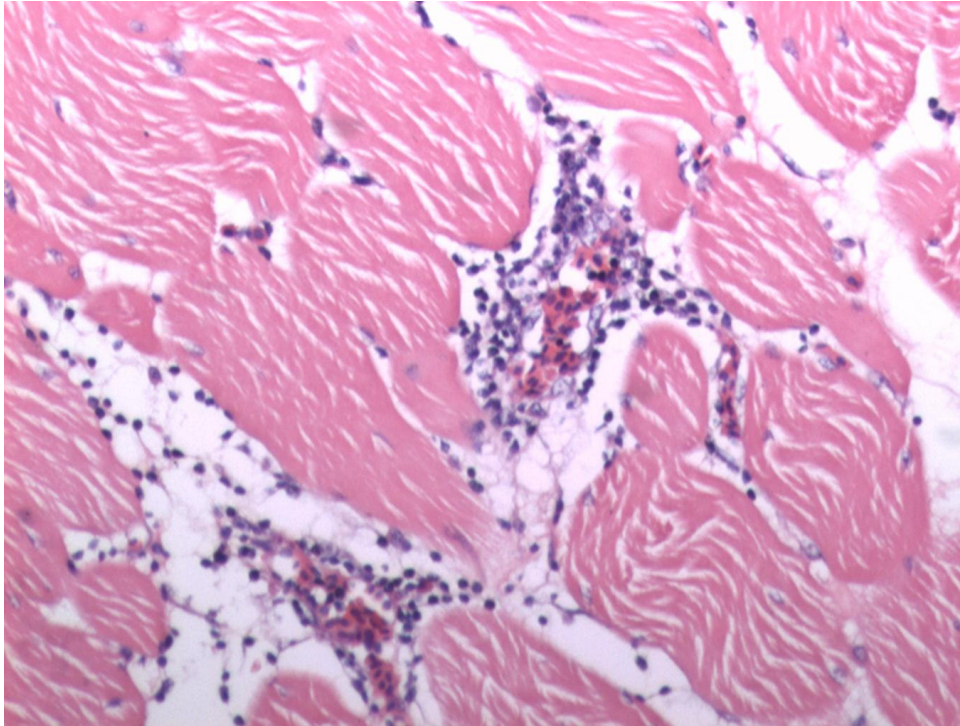


Figura 20 – Miosite heterofilica focal aguda após 24 horas da inoculação de β -glucano insolúvel. (Aumento 40X)

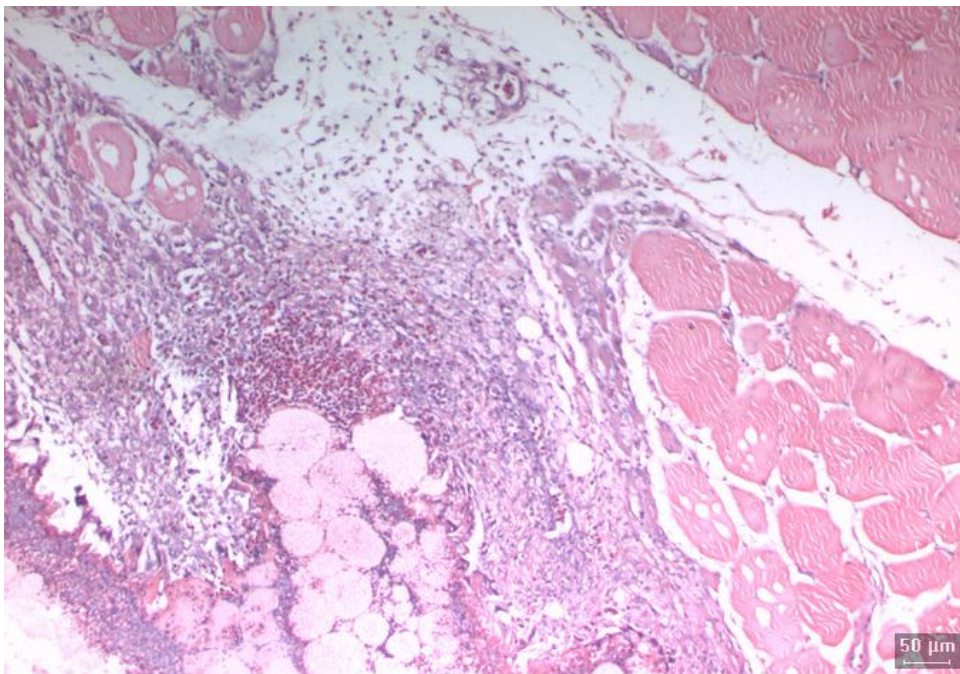


Figura 21 – Miosite linfocítica focal crônica após 72 horas da inoculação de β -glucano insolúvel. (Aumento 10X)

5.6 Primeiro experimento *in vivo*

5.6.1 ELISA para o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV)

Em pintinhos de um (01) dia, a média de concentração de IgG para o IBV entre os tratamentos foi de 14.794, portanto níveis circulantes capazes de conferir uma boa proteção pelos anticorpos maternos.

Os títulos de anticorpos para o IBV com todas as formas de solubilização não foi consistente, ou seja, a análise da cinética de produção de anticorpos mostra que em um determinado tratamento, em um tempo estudado o nível de IgG foi alto, mas no tempo seguinte este não foi mais detectado. A (Figura 18) mostra a cinética dos títulos e a inconsistência dos mesmos. É mostrado os títulos dos tratamentos que receberam a forma sulfatada, porque os títulos da forma fosfatada foram mais inconsistentes ainda.

5.6.2 ELISA para o vírus da doença de gumboro (IBDV)

Os pintinhos com um (01) dia de idade apresentaram uma média de título de IgG de 3.266, estes anticorpos eram de origem materna, uma vez que as aves receberam a vacina de Gumboro apenas no 14º dia de idade.

As aves receberam as vacinas de Boush aviária e Marek associadas ou não ao β -glucano, por via subcutânea, no primeiro dia de idade. Todos os tratamentos apresentaram ausência de anticorpos para IBDV, controle normal e vacinado até o último tempo estudado continuaram sem a presença de anticorpos contra IBDV circulantes.

Houve a síntese de anticorpos de uma forma linear nos tratamentos com β -glucano sulfatado, sugerindo uma relação direta entre dose e resposta, isto é percebido principalmente nos tratamentos com 30 e 120 μ g de glucano sulfatado. No entanto, os resultados encontrados não deixam claro qual a concentração de glucano que induziria a um limite de ativação do sistema imunológico, pois a cinética de produção de anticorpos entre os tratamentos 30 e 120 μ g foram semelhantes, com uma tendência do tratamento de 120 μ g/dose estimular melhor a síntese de IgG. Estes resultados encontram-se na (Figura 19). O ponto de corte estabelecido pelo *kit* para a doença de Gumboro foi com título de 554.

5.6.3 ELISA para o Vírus de Newcastle

A média de concentração de anticorpos, nos pintinhos de um (01) dia de idade foi de 4.424, portanto níveis de anticorpos maternos suficientes para conferir proteção.

As aves receberam o β -glucano sulfatado associado ou não a vacina de Marek, no 1º dia de idade e receberam a vacina de Newcastle com 7 dias de idade.

Aos 28 dias de idade os diferentes tratamentos apresentaram síntese de IgG para Newcastle, com a exceção do tratamento que recebeu 90 μ g de β -glucano. Com 35 dias de idade o controle vacinado e os tratamentos com glucano apresentaram níveis maiores de IgG, enquanto que com 42 dias de idade os tratamentos com glucano não se diferenciaram do controle vacinado, com a exceção do tratamento com 120 μ g que mostrou concentração maior de anticorpos.

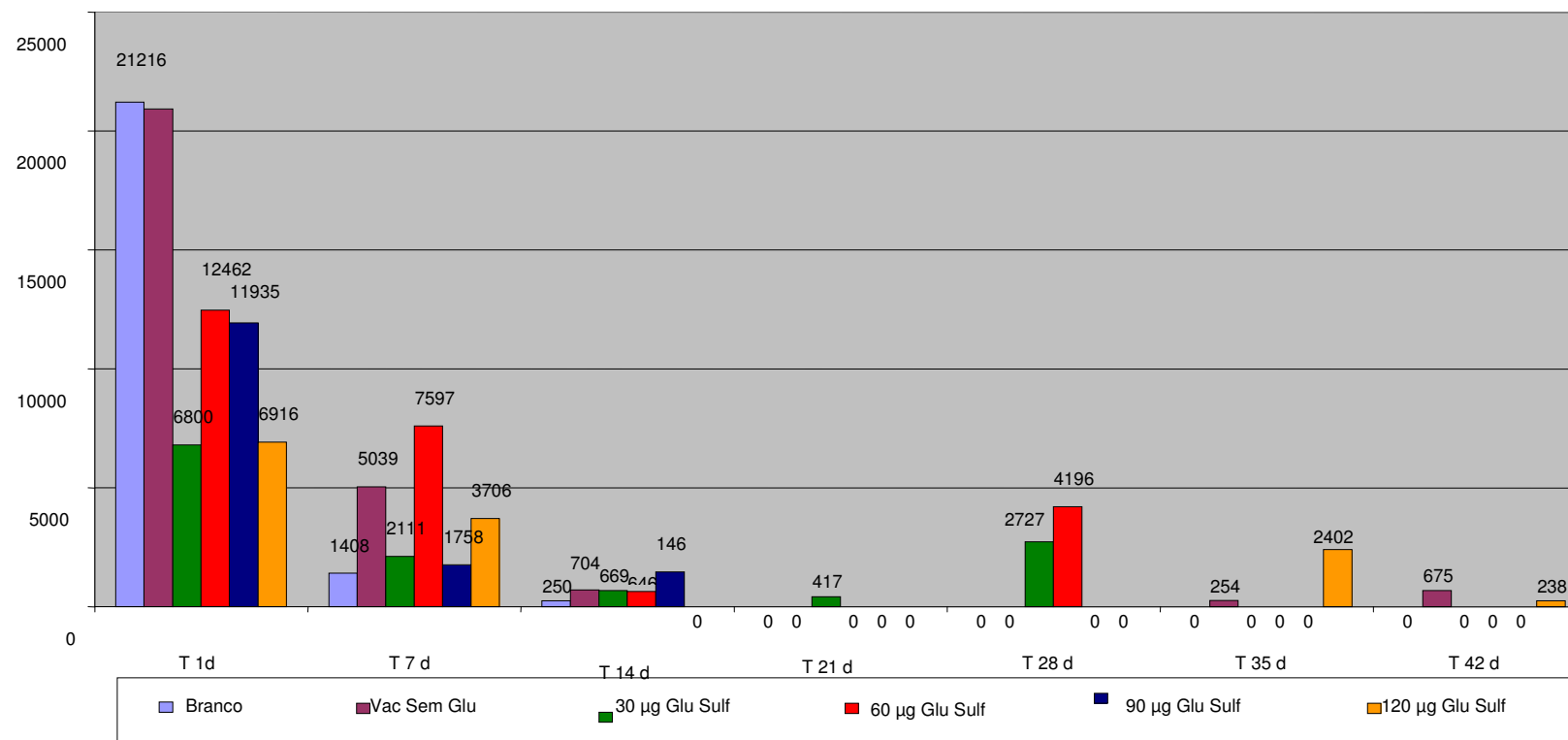


Figura 22 - Títulos de anticorpos para bronquite infecciosa das galinhas (IBV)

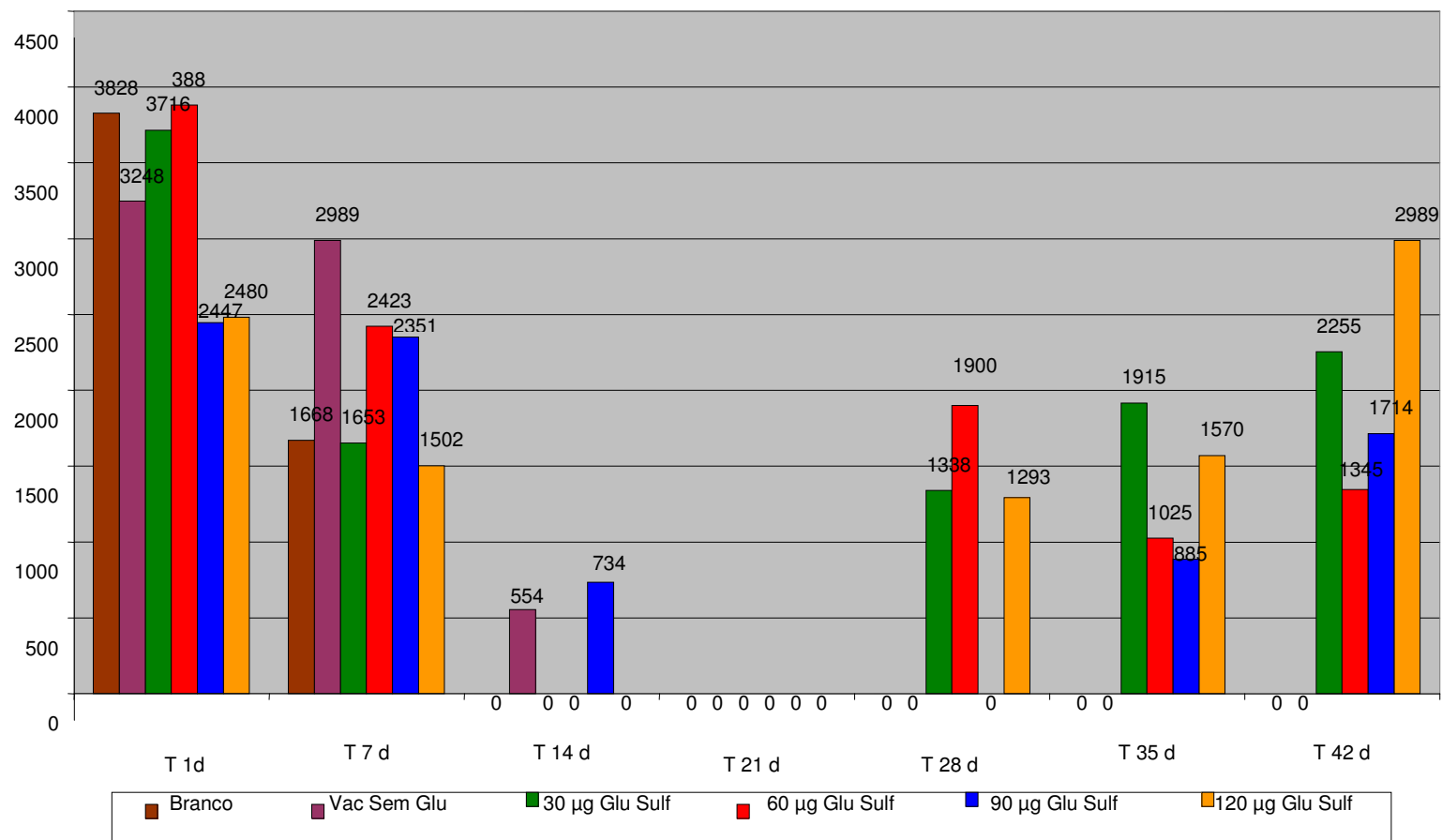


Figura 23 - Títulos de anticorpos para doença de Gumboro (IBDV)

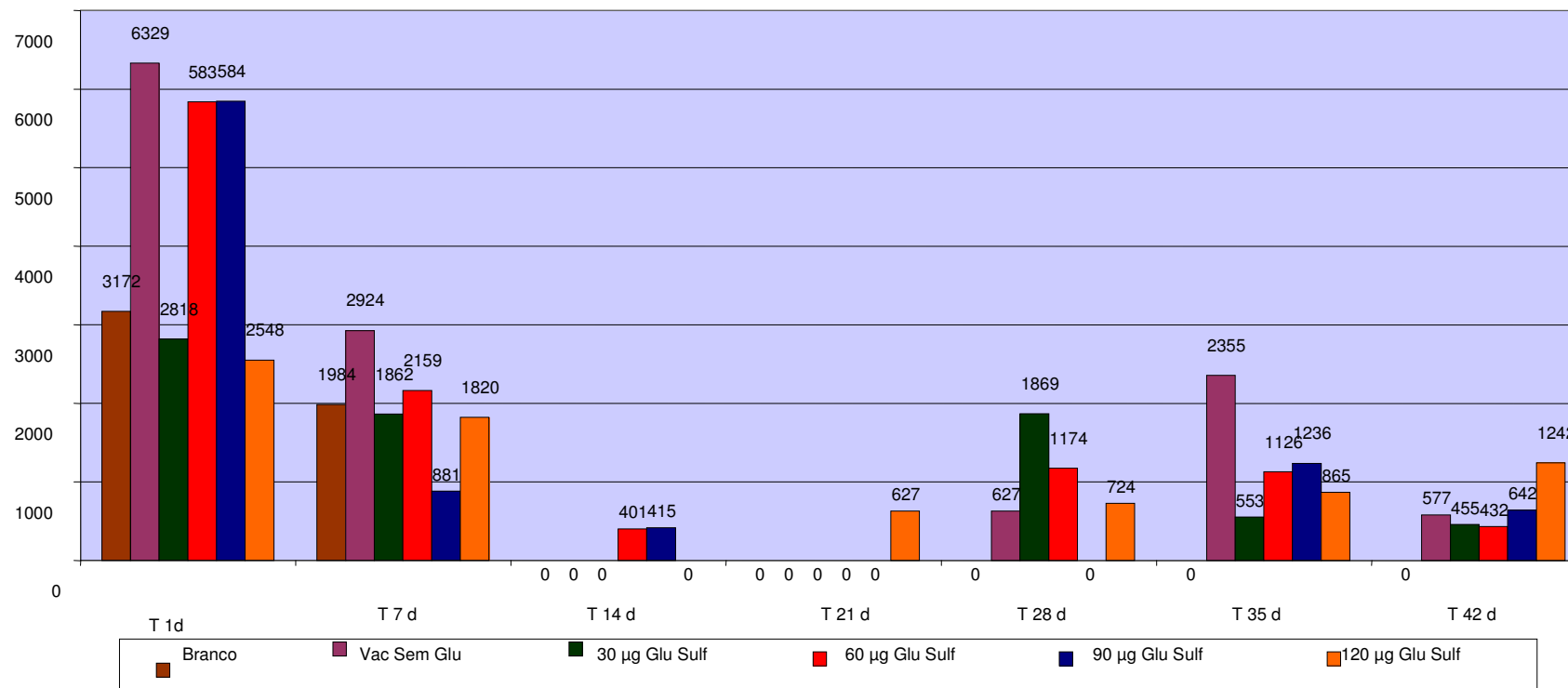


Figura 24 - Títulos de anticorpos para doença de Newcastle (NDV)

5.7 Segundo experimento *in vivo*

5.7.1 ELISA para o Vírus o Doença de Gumboro (IBDV)

Nesse experimento foram comparadas os títulos de duas vacinas para o vírus de Gumboro. Uma vacina viva, liofilizada, cepa R 706, (Figura 22) inoculada por via ocular e uma vacina recombinante (Figura 21), aplicada por via subcutânea. As aves receberam a vacina viva no primeiro e no 10º dia de idade, enquanto a vacina recombinante apenas no primeiro dia.

O título médio de anticorpos (1.417) para o IBDV em pintinhos de um (01) dia de idade mostra que existiu uma menor concentração de anticorpos maternos quando esta foi comparada aos pintinhos do primeiro experimento.

As concentrações de anticorpos detectadas em pintinhos que receberam a vacina viva convencional mostra que no 7º dia os títulos de IgG no grupo controle normal e no vacinado sem glucano foram muito semelhantes, respectivamente, com títulos de 219 e 226. Nas aves vacinadas com β -glucano, verificou-se a diminuição das concentrações de IgG circulantes, mas esta era dependente da concentração de β -glucano recebida, os títulos foram de 877, 874, 1.251 e 1.474 com as concentrações de 60, 120, 240 e 480 μ g/dose, respectivamente.

No 14º dia os títulos de IgG no grupo controle normal e no vacinado sem β -glucano diminuiu um pouco mais e os grupos vacinados com β -glucano não mais apresentaram anticorpos para o vírus de Gumboro. No 28º dia detectou-se a síntese de IgG no grupo vacinado sem glucano e naqueles vacinados com β -glucano, com a exceção do grupo que recebeu 480 μ g/dose. Nos demais tempos estudados observou-se que as concentrações de IgG, nas aves controle vacinadas diminuiu, enquanto entre os grupos com β -glucano o que recebeu 240 μ g/dose foi o que apresentou o maior título de IgG contra o vírus de Gumboro. Não houve detecção de anticorpos no grupo que recebeu 480 μ g de β -Glucano. Estes resultados encontram-se na (Figura 22).

Com a vacina recombinante observou-se que no 7º dia a concentração de anticorpos diminuiu em 50% no grupo vacinado sem glucano, os grupos vacinados com β -glucano apresentaram títulos menores do que o grupo controle vacinado, com a exceção do grupo que recebeu 120 μ g/dose que apresentou título um pouco maior do que o grupo controle vacinado.

No 7º e 14º dia de idade detectou-se pequenas concentrações de IgG em todos os grupos estudados, estes aumentaram no 28º dia em todos os grupos com a exceção do grupo controle normal. No 35º, o grupo controle vacinado apresentou título de 269, portanto houve

aumento na concentração de anticorpos circulantes. Entre os grupos vacinados com glucano os títulos foram de duas a três vezes maiores do que o título do grupo controle vacinado, sendo que aquele que recebeu 60 $\mu\text{g}/\text{dose}$ apresentou a maior concentração de IgG. No 40º dia o título do grupo controle vacinado aumentou para 414, entre os grupos vacinados com β -glucano os grupos que receberam 240 e 480 $\mu\text{g}/\text{dose}$ aumentaram seus títulos.

Os programas 2 e 3+4, respectivamente, vacina viva de Gumboro no 1 dia e no 10º dia não está sendo mostrado os seus resultados, porque apresentaram títulos inconsistentes.

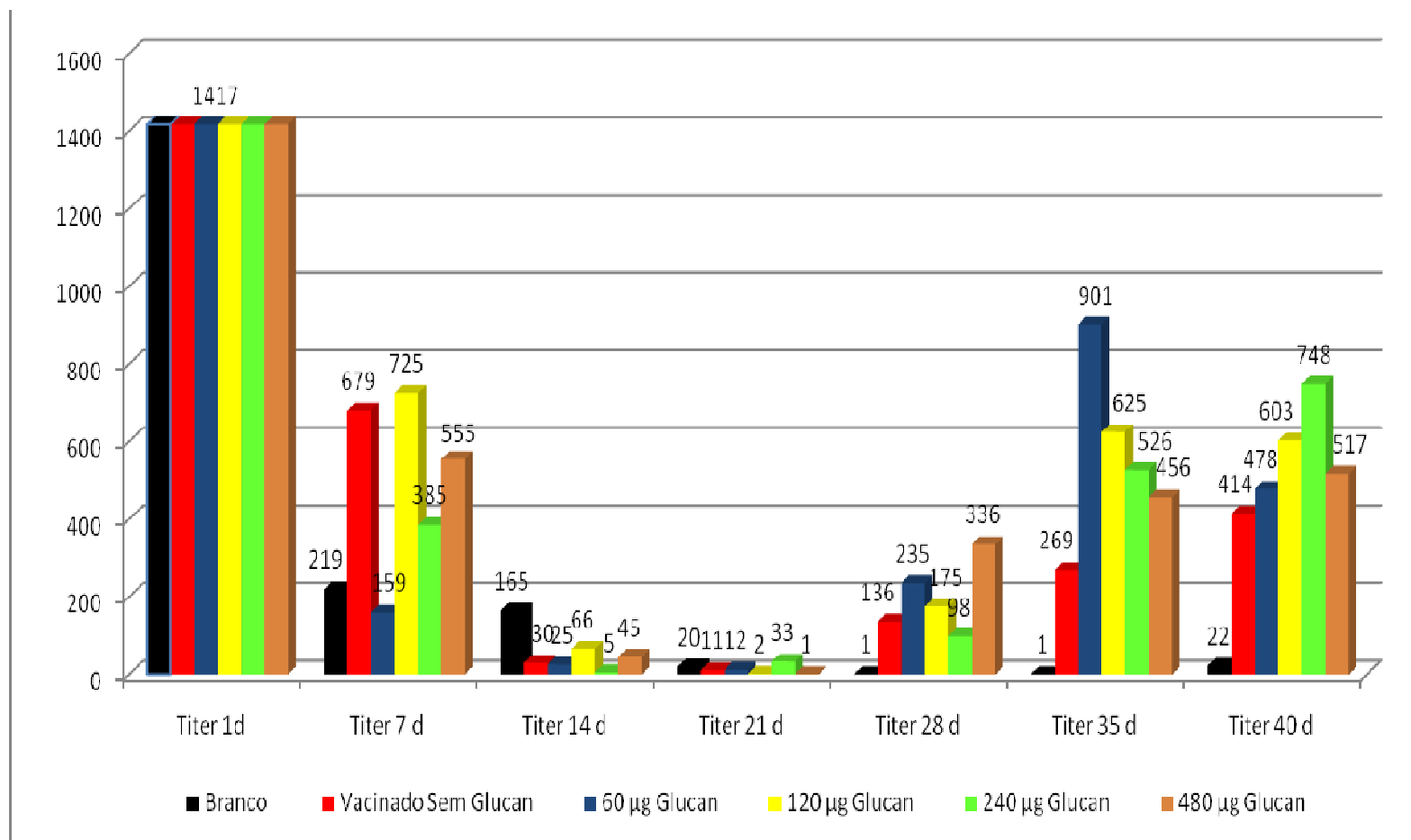


Figura 25 – Títulos de anticorpos para doença de Gumboro – Vacina Recombinante via SC

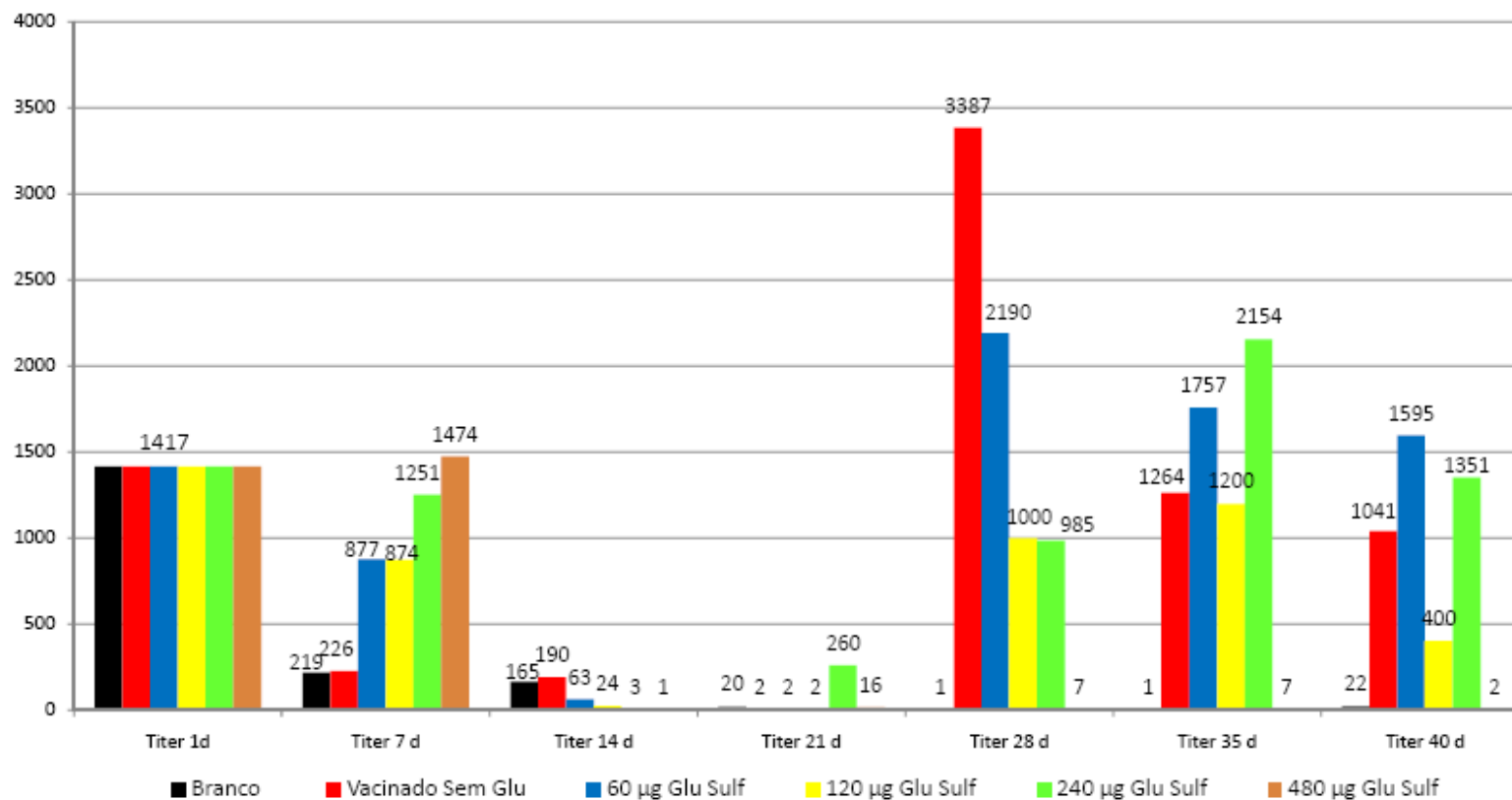


Figura 26 – Títulos de anticorpos para doença de Gumboro – Vacina Viva (via OC no 1° e 10° dia)

5.7.2 ELISA para o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV)

As aves receberam uma vacina viva, cepa H120 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas, por via ocular, no primeiro dia de idade. Neste dia, receberam também a vacina viva de Gumboro associada ao β -glucano, por via ocular, ou a vacina recombinante associada ao β -glucano, por via subcutânea.

Os pintinhos com um (01) dia de idade apresentaram título de 988, portanto muito menores do que aqueles encontrados nas aves do primeiro experimento.

As aves que receberam a vacina viva de Gumboro associada ao β -glucano apresentaram no 7º, 14º, 21º e 28º dia de idade pequenas concentrações de anticorpos. No 35º dia de idade as concentrações de IgG circulantes aumentaram, sendo que o título do grupo que recebeu 120 μ g de β -glucano apresentou o maior título, sendo este de 492. No 40º dia de idade o grupo controle vacinado apresentou título de 27, enquanto os títulos dos grupos vacinados com β -glucano apresentaram maiores concentrações de IgG circulantes, sendo que o grupo que recebeu 240 μ g/dose apresentou o maior título, sendo este 440. A (Figura 23) apresenta estes resultados.

As aves vacinadas com a vacina recombinante associada ao β -glucano apresentaram no 7º e 14º dia de idade pequenas concentrações de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. No 21º dia de idade os títulos aumentaram, sendo que o grupo que apresentou o maior título foi o vacinado com 60 μ g de β -glucano, sendo este 298. No 28º dia as concentrações de IgG não aumentaram. No 35º dia o grupo controle vacinado apresentou um baixo título de anticorpo, sendo este de 21. Os títulos dos grupos vacinados com β -glucano apresentaram-se maiores e o grupo que recebeu 60 μ g de β -glucano apresentou título 417. No 40º dia de idade os grupos vacinados com β -glucano mostraram títulos maiores do que o encontrado para o grupo controle vacinado. O grupo que recebeu 240 μ g/dose foi o que apresentou o maior título, sendo este de 524.

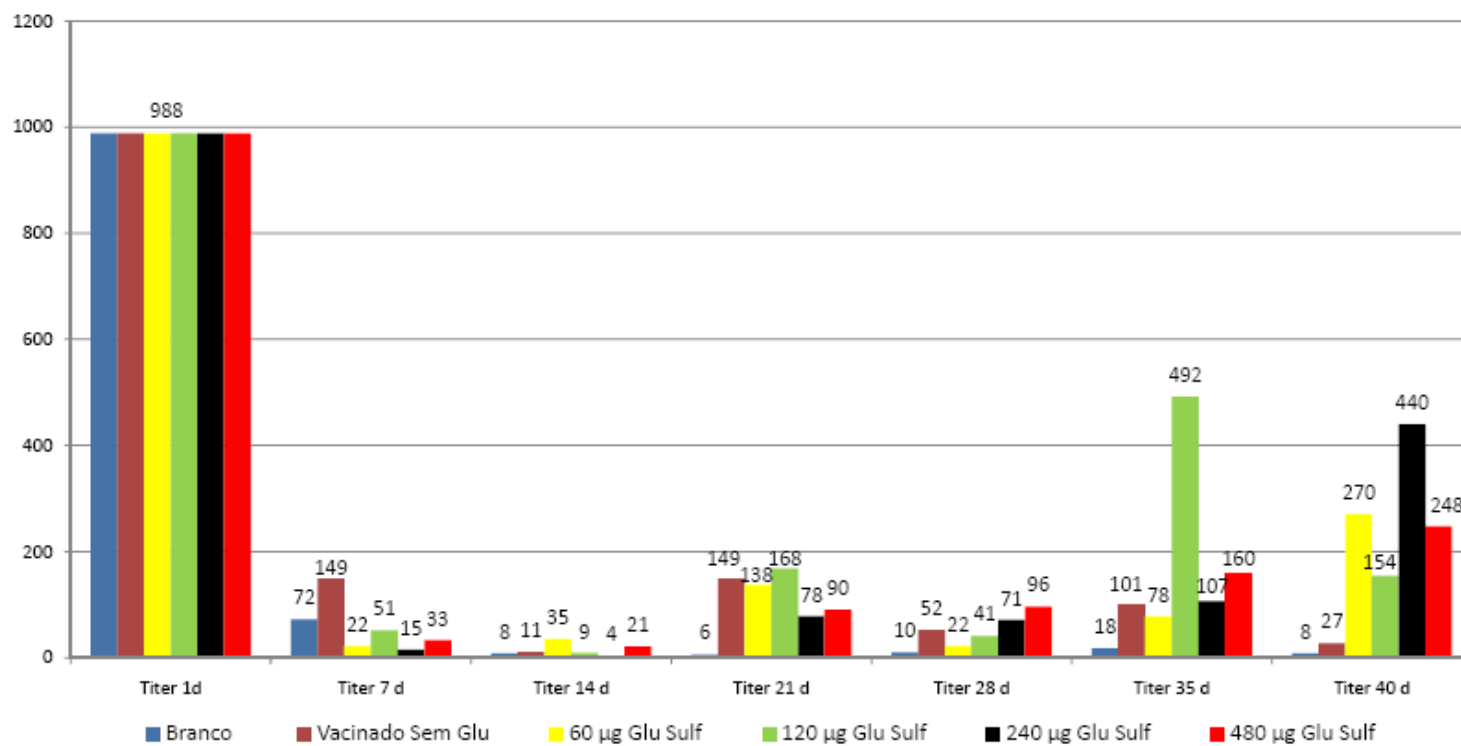


Figura 27 – Títulos de anticorpos para Bronquite Infecciosa das Galinhas dos tratamentos que receberam β -glucano no diluente da vacina de Marek e foi vacinado contra doença de Gumboro cepa viva via ocular

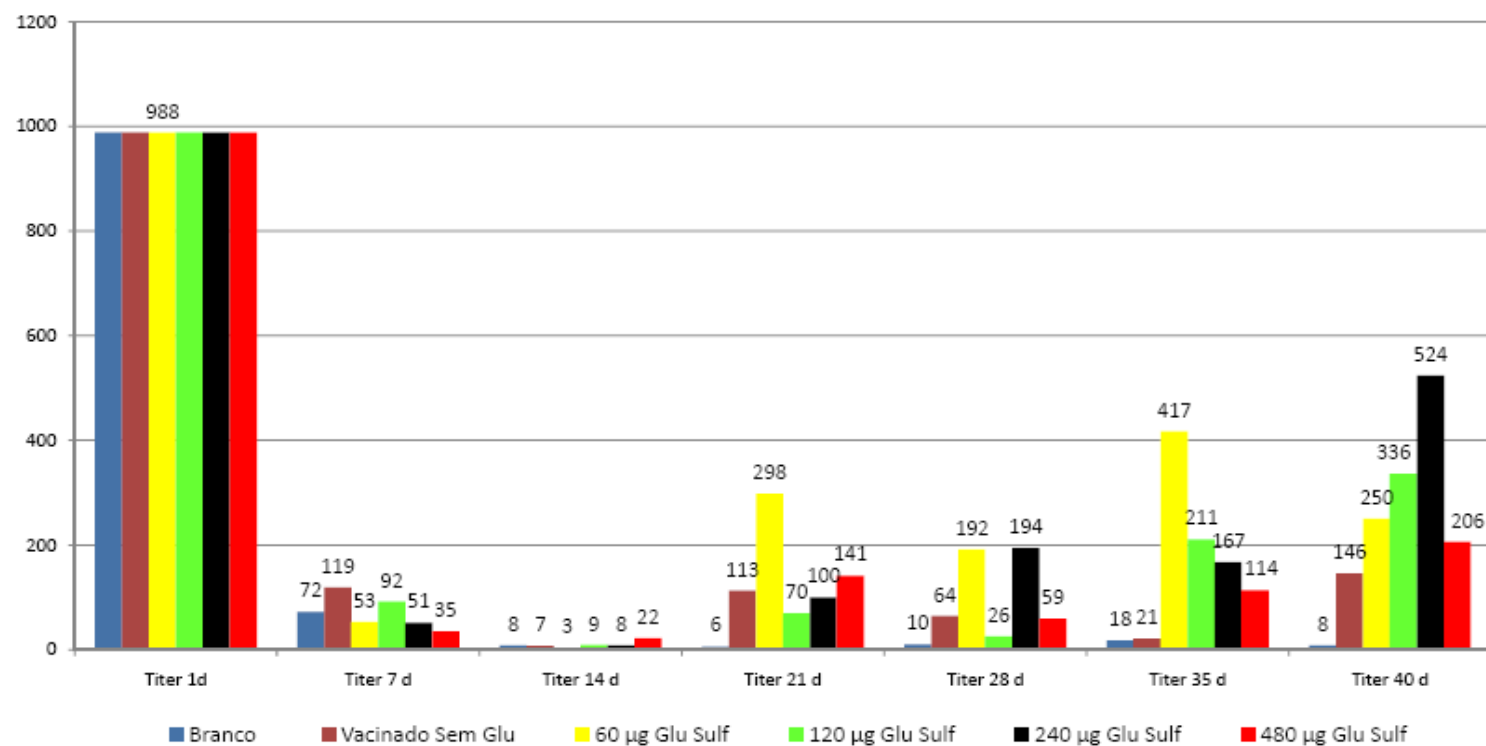


Figura 28 – Títulos de anticorpos para Bronquite Infecciosa das Galinhas dos tratamentos que receberam β -glucano no diluente da vacina de Marek e foi vacinado contra doença de Gumboro com a vacina recombinante – via SC

5.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

5.8.1 Expressão de Interleucina - 2 (IL-2)

A expressão de interleucina-2 foi comparada com o grupo controle normal.

No 7º dia de idade detectou-se nos grupos que receberam 120 µg/dose e 240 µg/dose de β-glucano associado vacina recombinante, uma expressão de IL-2 entre duas a três vezes àquela encontrada com o grupo controle normal. Nas aves que receberam a vacina viva contendo β-glucano verificou-se que em todos os grupos ocorreu ativação imunológica, sendo que os grupos que receberam 60 e 480 µg/dose apresentaram concentrações entre duas a três vezes àquela encontrada com o controle normal. Os grupos que receberam a vacina viva, a vacina recombinante e o grupo que recebeu a vacina recombinante associada a 480 µg/dose de β-glucano não apresentaram expressão de IL-2.

No 14º dia todos os grupos não apresentaram expressão de IL-2.

No 35º dia de idade apenas o grupo que recebeu a vacina recombinante apresentou expressão de IL-2 entre duas a três vezes àquela encontrada para o grupo controle normal.

No 40º dia de idade os grupos que receberam 120 e 240 µg/dose de β-glucano associado à vacina viva tiveram uma pequena expressão de IL-2, enquanto o grupo que recebeu 480 µg/dose de β-glucano associado à vacina viva expressou entre cinco a seis vezes a concentração encontrada no grupo controle normal. A (Figura 24) apresenta estes resultados.

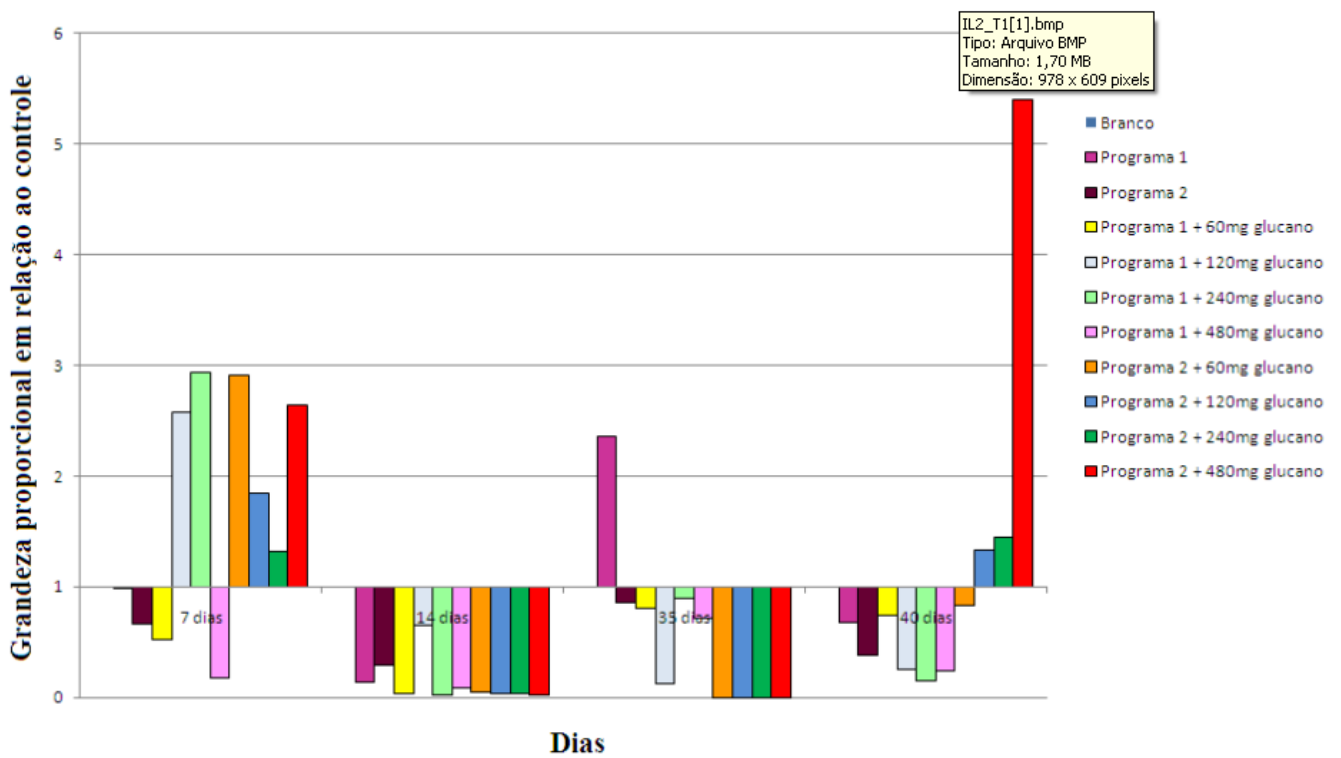


Figura 29 – Evolução da expressão do gene Interleucina-2 nos diferentes programas de vacinação.

Legenda: Branco: controle não vacinado

Programa 1: controle vacinado sem β -glucano (Vacina Gumboro Recombinante)

Programa 2: controle vacinado sem β -glucano (Vacina viva no 1^o e 10^o dia idade)

5.8.2 Expressão de Interferon – γ (INF- γ)

A expressão do interferon- γ foi comparada ao grupo controle normal.

No 7º dia de idade verificou-se que todos os grupos apresentavam a presença de RNA mensageiro nas células do baço para o interferon-gama, com a exceção do grupo que recebeu a vacina recombinante. Houve a expressão de INF- γ acima de 20 vezes àquela encontrada com o controle normal, no grupo que recebeu a vacina recombinante. Entre os grupos que receberam β -glucano associado a vacina recombinante verificou-se no grupo que recebeu 120 μ g/dose alta expressão de INF- γ , pois esta foi encontrada entre 80 a 100 vezes àquela do controle normal. Com o grupo que recebeu 240 μ g/dose determinou-se a expressão de INF- γ em cinco vezes a do controle normal.

A vacina viva estimulou pouco a expressão de INF- γ , no 7º dia de idade, pois esta foi apenas 1,5 vez a do controle normal. Os grupos que receberam 60 e 480 μ g/dose de β -glucano expressaram entre 40 a 60 vezes àquela encontrada com o controle normal.

No 14º dia a vacina recombinante apresentou expressão de INF- γ entre duas a três vezes àquela encontrada com o controle normal. Nos grupos que receberam β -glucano associado à vacina recombinante detectou-se ativação com expressão de INF- γ e os grupos que apresentaram maior expressão foram os que receberam 60 e 480 μ g/dose de β -glucano.

Não houve expressão de INF- γ no grupo que recebeu a vacina viva. Naqueles que receberam esta vacina associada ao β -glucano detectou-se expressão entre cinco a dez vezes a do controle normal nos grupos que receberam 60, 120 e 240 μ g/dose.

No 35º dia de idade apenas as vacinas sem a presença do β -glucano apresentaram ativação para o INF- γ , com a vacina recombinante detectou-se expressão entre cinco a dez vezes àquela encontrada com o controle normal e com a vacina viva ocorreu expressão entre uma a duas vezes a do controle normal.

No 40º dia de idade houve a expressão de cinco a dez vezes à encontrada com o controle normal nos grupos que receberam 120 e 480 μ g/dose de β -glucano, Naquele que recebeu 240 μ g/dose de β -glucano houve a expressão de três a quatro vezes a do controle normal. Os demais grupos apresentaram pequena ativação para o INF- γ , com a exceção do grupo que recebeu a vacina recombinante associada a 240 μ g/dose de β -glucano que não expressou esta citocina. A (Figura 25) mostra estes resultados.

Evolução da expressão do gene Interferon- γ nos diferentes programas de vacinação e doses de glucano administrado.

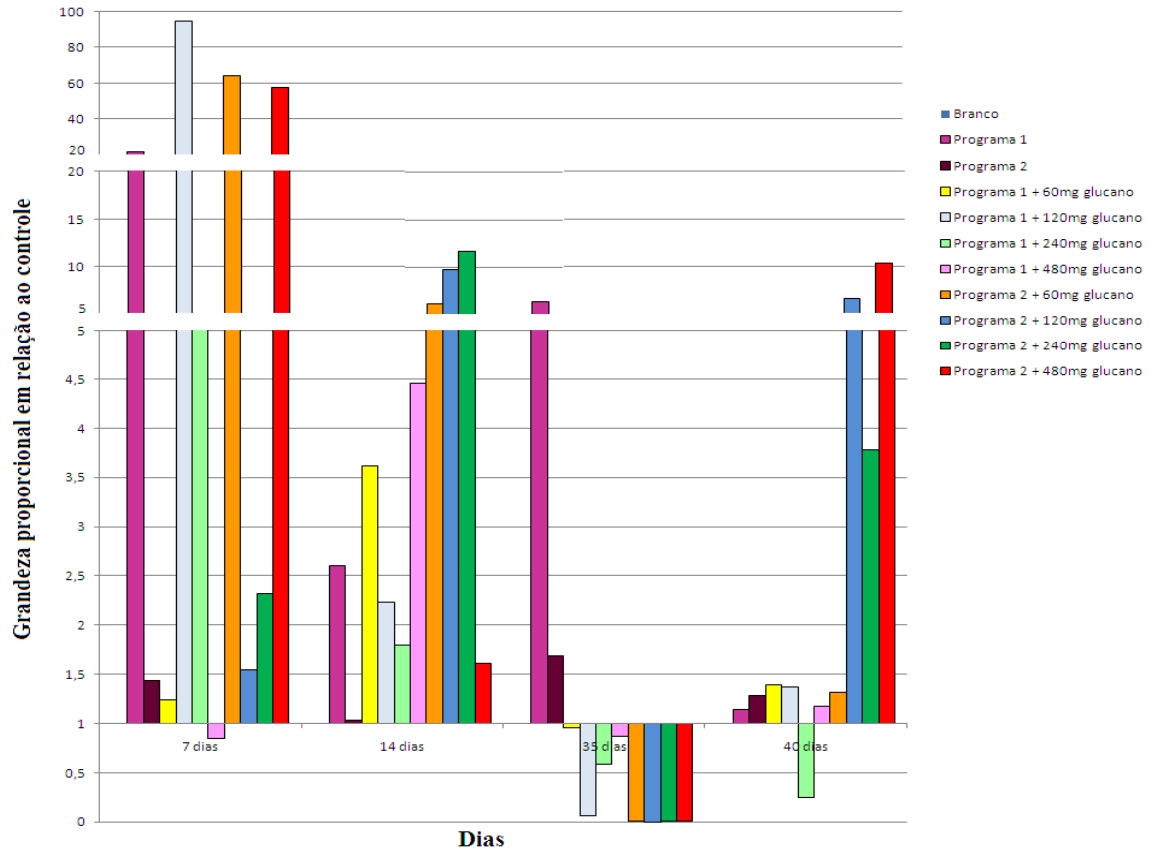


Figura 30 – Evolução da expressão do gene Interferon- γ nos diferentes programas de vacinação.

Legenda: Branco: controle não vacinado

Programa 1: controle vacinado sem β -glucano (Vacina Gumboro Recombinante)

Programa 2: controle vacinado sem β -glucano (Vacina viva no 1^o e 10^o dia idade)

5.8.3 Expressão de Interleucina - 6

A expressão da interleucina- 6 foi comparada com o grupo controle normal.

No 7º dia de idade houve a expressão desta citocina no grupo que recebeu a vacina viva, existindo mais de quatro vezes a expressão do controle normal. O grupo que recebeu a vacina recombinante associada a 120 µg/dose de β-glucano apresentou aproximadamente quatro vezes mais expressão de IL-6 do que o controle normal. O grupo que recebeu a vacina viva associada a 120 µg/dose de β-glucano expressou aproximadamente duas vezes mais esta citocina do que o controle normal.

No 14º dia de idade ocorreu a expressão de IL-6 apenas pelo grupo que recebeu a vacina viva associada a 120 µg/dose de β-glucano.

No 35º dia de idade o grupo que recebeu a vacina recombinante expressou três a quatro vezes mais IL-6 do que o controle normal. Houve uma pequena expressão de IL-6 pelo grupo que recebeu a vacina viva associada a 480 µg/dose de β-glucano. Os demais grupos não expressaram esta citocina.

No 40º dia de idade o grupo que recebeu a vacina recombinante apresentou uma pequena expressão de IL-6. O grupo que recebeu a vacina recombinante associada a 60 µg/dose de β-glucano expressou quatro vezes mais IL-6 do que o controle normal. A expressão de IL-6 no grupo que recebeu a vacina viva associada a 120 µg/dose de β-glucano foi duas vezes maior do que a do controle normal. Estes resultados encontram-se na (Figura 26).

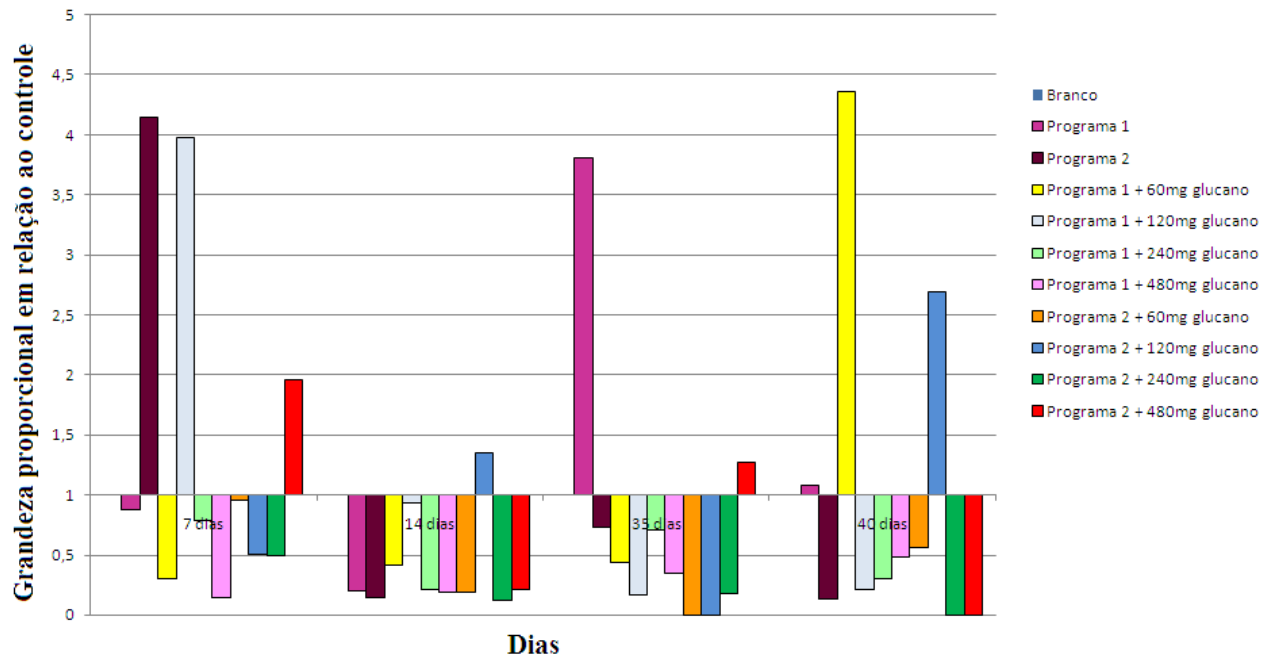


Figura 31 – Evolução da expressão do gene Interleucina-6 nos diferentes programas de vacinação.

Legenda: Branco: controle não vacinado

Programa 1: controle vacinado sem β -glucano (Vacina Gumboro Recombinante)

Programa 2: controle vacinado sem β -glucano (Vacina viva no 1^o e 10^o dia idade)

6 DISCUSSÃO

Beta-glucanos são polímeros de glicose produzidos por uma variedade de plantas, ocorrem como um componente primário da parede celular de bactérias, fungos e apresentam atividade imunoestimulante (AKRAMIENÉ et al, 2007). Através de modificações do método descrito por Williams (1991) foram obtidos três glucanos solúveis da parede de *Saccharomyces cerevisiae* denominados fosfatado, sulfatado e cloro hidratado. Estas foram encaminhadas para a análise de suas características e determinou-se a presença de 81, 58 e 80% de β -glucanos totais, respectivamente. Lee, et al., (2002) solubilizaram glucano de *Saccharomyces cerevisiae* com NaOH 2% e fizeram a purificação por cromatografia de afinidade com concanavalina A e encontraram 26,6% de β -glucano.

No ensaio com fibroblastos infectados com o vírus de Marek observou-se que não ocorreu a inativação do vírus pelos diferentes glucanos solubilizados, pois ocorreu efeito citopático similar àquele encontrado com o vírus de Marek sem a presença de glucano, ou seja, com o mesmo número de unidades formadoras de placa (UFP). Dessa forma, a associação de β -glucano à vacina de Marek parece ser uma estratégia viável como um imunomodulador no sistema imune das aves. Determinou-se também após 24 horas de incubação a presença de vacúolos citoplasmáticos nas concentrações de 1.200, 600 e 300 $\mu\text{g}/0,2\text{ mL}$ de β -glucano, tanto na forma de solubilização sulfatada como fosfatada (Figura 10). Não houve formação de vacúolos nos controles e na forma cloro hidratada. Müller et al. (1996) verificaram a presença de um receptor específico para o β -glucano solúvel em células U937 (linhagem monócito/macrófago humano), que a sua internalização levava a modificações na célula, como a presença de vacúolos citoplasmáticos. A microscopia eletrônica revelou serem vacúolos e lisossomos secundários, que poderiam representar vesículas endocíticas e que este fenômeno poderia refletir uma endocitose aumentada nestas células ativadas.

A presença de receptor para β -glucano em fibroblasto humano normal foi descrita, que ocorria a estimulação do fator transcricional NF- κ B e síntese de proteína (KOUGIAS et al., 2001). É possível que o fibroblasto de embrião de galinha também tenha receptor para o β -glucano, que este tenha sido internalizado e que possa ter ocorrido a síntese de proteína, por isso a observação de vacúolos nas células que foram tratadas com as maiores concentrações dos produtos na forma sulfatada e fosfatada.

Os testes de inocuidade do β -glucano solúvel tanto na forma sulfatada quanto fosfatada, em 24 horas, apresentaram uma leve lesão macroscópica. Após esse período não se observou mais lesões, pois possivelmente este tenha sido totalmente absorvido pelo organismo. Com o glucano insolúvel após seis (06) dias da injeção existiu um forte processo inflamatório. Assim, a utilização de β -glucano solúvel até 125 mg/ave não deixa nenhuma reação adversa no ponto de injeção, enquanto o insolúvel apresenta lesões macroscópicas que desqualificam a carcaça. Imunomoduladores polissacarídicos suficientemente purificados distinguem-se pela sua baixa toxicidade, como por exemplo, o lentinan que apresenta uma dose letal 50% em camundongo de 1600 mg/ Kg, (NOVAK e VETVICKA, 2008).

As análises histopatológicas revelaram que o β -glucano solúvel na forma sulfatada foi o que causou menor injúria no tecido muscular. O grupo que recebeu a concentração de glucano insolúvel apresentou miosite focal aguda em 24 horas que evoluiu para crônica em 72 horas.

O mecanismo de ação de β -glucanos parece estar relacionado ao peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização da β -glucana (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008)

Como não houve inativação do vírus de Marek com as diferentes formas de β -glucano solubilizadas obtidas, este foi associado à vacina de Buba aviária e Marek, em diferentes concentrações, no primeiro dia de idade. As aves receberam também vacina para a Bronquite infecciosa das galinhas e Doença de Newcastle no 7º dia de idade e para a Doença de Gumboro no 14º dia de idade. As aves foram mantidas por 42 dias e foram realizadas cinéticas de detecção de IgG para a Bronquite infecciosa das galinhas, Doença de Gumboro e Doença de Newcastle durante este período de criação.

Os resultados do ELISA indireto para a Doença de Gumboro, no primeiro experimento, revelaram que as aves a partir do 28º dia de idade sintetizaram anticorpos. No grupo controle vacinado não houve a detecção de IgG para Gumboro, apenas nos diferentes grupos que receberam β -glucano, embora as aves estivessem sob mesmas condições ambientais. Este resultado sugere que o título da vacina pudesse estar baixo. Como o vírus de Gumboro tem a característica de se manter no ambiente, pode ter ocorrido desafio viral, assim como, a ação da vacina, no entanto apenas nas aves que receberam β -glucano havia a presença de células de memória capazes de serem ativadas e produzirem IgG contra este vírus. Aos 42 dias de idade observou-se que os títulos séricos variaram de 1345 a 2989, existindo praticamente uma regressão linear nas doses de 90 e 120 ug/ave, sugerindo uma dose

dependência. A proteção imunológica duradoura depende da quantidade e qualidade de células T de memória formadas (CHABALGOITY et al., 2007).

A cinética de produção de anticorpos para o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, no primeiro experimento, mostrou resultados muito inconsistentes, pois em um determinado tempo observou-se títulos de anticorpo, mas no tempo seqüencial analisado este não era mais detectado, como por exemplo, no 28º dia de idade o grupo que recebeu 60 ug/ave de β -glucano associado à vacina apresentou título de 4196 e no 35º ou 40º dia de idade não houve a detecção de IgG específica para este vírus. Este resultado sugere que o antígeno do *kit* de ELISA usado pode ter perdido sua estabilidade, pois a meia vida de IgG é de aproximadamente três (03) dias (DAVISON et al., 2008), ou seja, deveria ter sido possível encontrar títulos de anticorpos no 35º dia de idade. Por outro lado, como a concentração de anticorpos maternos estava muita alta, pois os títulos variaram de 6800 a 21216, é possível que estes tenham inibido a ação do vírus e impedido a ativação do sistema imune da ave, pois as aves receberam a vacina para a bronquite infecciosa das galinhas no 7º dia de idade.

A síntese de IgG para o vírus de Newcastle, determinada pelo ELISA, mostra que a vacina induziu ativação imunológica, pois no 28º dia de idade foram detectados títulos de anticorpos no grupo controle vacinado e naqueles que receberam β -glucano, mas no 42º dia de idade não se observou diferenças em títulos entre os grupos, com a exceção do grupo que recebeu 480 ug/ave de β -glucano.

No segundo experimento foram estudados quatro programas de vacinação, sendo que os que estimularam uma cinética melhor de anticorpos foram os programas um (01) (no primeiro dia: vacina para Gumboro (recombinante), Bronquite infecciosa das galinhas, Boubá aviária e Marek) e o programa dois (02) associado ao quatro (04), ou seja, no primeiro dia: vacina de Boubá aviária, Doença de Marek, Doença de Gumboro (viva), Bronquite infecciosa das galinhas e no décimo dia novamente vacina viva para Gumboro.

Comparando a cinética de produção de IgG para o vírus da Bronquite infecciosa das galinhas, verificou-se que as duas cinéticas foram praticamente iguais, sendo que os maiores títulos ocorreram no 40º dia de idade, com as duas vacinas. Com relação à síntese de anticorpos para o vírus de Gumboro, no 7º dia de idade observou-se com a vacina viva associada ao β -glucano que o catabolismo da imunoglobulina foi menor do que com a vacina recombinante. Houve ativação imunológica para o vírus a partir do 28º dia da vacinação, com as duas vacinas, em todos os grupos analisado com a exceção do grupo controle normal, sendo que os títulos foram maiores com a vacina viva do que com a vacina recombinante. No

entanto, estes títulos maiores poderiam ser conseqüência da segunda dose de vacina recebida no décimo dia de idade. Analisando os resultados obtidos no primeiro e segundo experimento, verifica-se que ocorreu dose-dependência, e que a melhor concentração de β -glucano estimulando a produção de IgG foi de 240 ug/ave. Os efeitos hematopoiéticos de diferentes concentrações de β -glucano solúvel, intravenoso, foram estudados em camundongos C3H/HeN. Observaram que o número de células, assim como, o síntese de fatores de multiplicação celular eram dose dependente (PATCHEN e MacVITTIE, 1983). Cross et al., (2001) utilizaram β -glucano solúvel em ensaios de ativação imunológica e verificaram que ocorreu estimulação de linfócitos T citotóxicos, linfócitos B, macrófagos e células NK.

Linfócitos B são células produtoras de imunoglobulinas, dependendo das características do antígeno, embora se liguem ao antígeno, não consegue completar sua ativação e necessitam de citocinas produzidas por linfócito T auxiliar (Th) (CHAPLIN, 2003). Todas as subpopulações de Th (Th1, Th2 e Th17) cooperam com a célula B para a síntese de imunoglobulinas, sendo que a IL-5, IL-6 e o INF- γ estimulam a síntese de IgG pelo plasmócito (MEDZHITOV, 2007). Como houve a síntese de IgG nos dois experimentos realizados, estes resultados sugerem a ativação de linfócitos T auxiliares.

A eficácia de uma vacina depende de uma apropriada ativação do sistema imune inato, principalmente pela ação de células apresentadoras de antígeno no ambiente linfóide (MANOLOVA et al., 2008). A pele é a primeira barreira contra patógenos e possui células apresentadoras de antígeno, como as células de Langerhans e células dendríticas da epiderme (CUNNINGHAN et al, 2008). Estas se encontram na pele em estágio imaturo, que se caracteriza pela extraordinária capacidade de capturar antígenos e alta capacidade endocítica (GUERMONPREZ et al., 2002). O tamanho de partículas é importante para ocorrer fagocitose, partículas de 1 a 2 μ m de diâmetro são facilmente fagocitadas pelos macrófagos (TABATA e IKADA, 1988). A ação de células apresentadoras de antígeno depende do tamanho da partícula envolvida na ativação imunológica. Verificou-se que partículas pequenas (20 a 200 nm) eram facilmente drenadas para os órgãos linfóides secundários, mas que partículas maiores (500 a 2000 nm) eram transportadas por células dendríticas (MANOLOVA et al., 2008). A microscopia eletrônica revelou que as moléculas de β -glucano sulfatado, solúvel obtido neste estudo eram irregulares, se agregavam e tinham tamanho superior a 2 μ m. Hunter et al., (2002) analisaram um glucano insolúvel por microscopia eletrônica e observaram moléculas globulares e que se agrupavam em tamanho que variava entre 5 a 100 μ m de diâmetro.

Como o β -glucano foi administrado por via subcutânea, é possível que células dendríticas tenham capturado estes antígenos, pois estas células possuem o receptor Dectina-1 (ARIIZUMI et al., 2000), que se ligam ao β -glucano (BROWN et al., 2002; ADAMS et al., 2008). As células dendríticas de aves talvez apresentem o receptor para Dectina-1 em sua superfície, pois os receptores *toll-like* (TLR) 2 e 4 já foram descritos em células fagocíticas (FARNELL et al., 2003; KOGUT et al., 2005) e em células dendríticas humanas (RE e STROMINGER, 2001).

A população de células dendríticas é heterogênea e a única capaz de ativar linfócito T. Embora presente em baixo número e se distribua em todos os tecidos periféricos (HANSELL et al., 2007). Possuem em sua superfície celular receptores que reconhecem um padrão de reconhecimento (PRR), através destes, ligam-se a microrganismos ou seus produtos e esta interação estimula estas células a produzir citocinas. Receptores *toll-like*, receptor do tipo lectina C e proteínas NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*) são PRR (ROBINSON et al., 2006; MEDZHITOV, 2007).

Receptores TLR atuam como um adjuvante imune que ativa a célula dendrítica e imediatamente induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, Interleucina-6 e fator de necrose tumoral α , que contribuem para a indução de respostas imunes inata local (FAJARDO-MOSER et al., 2008). Células dendríticas em órgãos linfóides secundários estimulam a resposta de linfócitos T, após apresentarem em sua superfície moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e/ou classe II ligadas a peptídeos. Antígenos que interagem com a célula dendrítica através de receptores *toll like*, apresentam em sua superfície peptídeos ligados a MHC classe II que ativam linfócitos T auxiliares ou *helper* (Th). A ativação de linfócitos Th se caracteriza pela multiplicação celular e diferenciação nas subpopulações Th1, Th2 e Th17, que se distinguem pelo perfil de citocina produzido (HARRINGTON e MANGAN, 2006; MEDZHITOV, 2007). A diferenciação de linfócitos em um tipo de célula efetora e seu sítio de localização é regulada pelo sistema imune inato, através da síntese de citocinas e quimiocinas, respectivamente (MEDZHITOV, 2007).

A diferenciação de linfócitos Th1 se inicia com as citocinas IFN- γ e IL-12 que se caracterizam pela alta produção IFN- γ e são indispensáveis para a eliminação de patógenos intracelulares (KORN et al., 2009). Além disso, estas células induzem a multiplicação de linfócitos B que sintetizam anticorpos responsáveis pela fagocitose e pela citotoxicidade dependente de anticorpos (FAJARDO-MOSER et al., 2008). Citocinas são proteínas reguladoras do sistema imune, essenciais para modular tanto a resposta inata como a

adaptativa, assim como, o estabelecimento e a manutenção da memória imunológica. O perfil e a ação de citocinas produzidas em resposta à invasão de organismos estranhos ou a outros sinais definem os efeitos benéficos ou deletérios no hospedeiro. Citocinas e quimiocinas produzidas no sítio de entrada de um patógeno determinam os sinais inflamatórios que regulam a capacidade de células fagocíticas residentes e células fagocíticas atraídas destruir o invasor (CHABALGOITY, 2007).

Os linfócitos helper 2 (Th2) atuam contra parasitas e produzem IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas controlam a função de eosinófilos, basófilos e o epitélio de mucosas. IL-4 também ativam linfócitos B para produzir anticorpos da classe IgE, que são importantes na defesa contra parasitas através de seus efeitos em mastócitos e ativação de basófilos (MEDZHITOV, 2007). A ativação de Th2 desativa a produção de INF- γ (BASSO et al., 2009)

O linfócito Th17 foi caracterizado no ano de 2005, como uma subpopulação de linfócito T auxiliar. O principal sinal para a sua diferenciação é a presença de Interleucina-17, estas células agem recrutando neutrófilos e produzindo mediadores pró-inflamatórios (CHABALGOITY, et al., 2007). Células de memória diferenciam-se principalmente em Th17.

Após a estimulação com vários agentes microbianos que interagem (padrão molecular associado ao patógeno) e ativam os receptores específicos *toll-like* ou Dectina-1, células dendríticas secretam IL-12, IL-23 ou IL-27. Quando uma destas citocinas torna-se dominante, este fenômeno determina o tipo de imunidade que se desenvolverá, isto é, se o linfócito se diferenciará em Th1 ou Th17 (KORN et al, 2009).

Dentre os resultados obtidos pela técnica de PCR em tempo real (PCR-RT), verificou-se que as aves que receberam a vacina viva para Gumboro apresentaram no 7º dia de idade, presença de RNA mensageiro para IL-6, uma pequena ativação de INF- γ e não houve expressão IL-2. Por outro lado, ocorreu uma alta expressão de IFN- γ nas aves que receberam a vacina de Gumboro recombinante e estas não expressaram IL-2 ou IL-6. Como a via de aplicação destas vacinas não foi a mesma, é possível que populações diferentes de células dendríticas tenham sido estimuladas, induzindo a diferenciação de diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares. A vacina recombinante foi aplicada no subcutâneo, assim as células de Langerhans ou as células dendríticas da epiderme devem ter se ativado por este antígeno, e estimulado linfócitos Th1 no baço, pois esta subpopulação de linfócio T auxiliar quando estimulada por IL-12 produz altas concentrações de IFN- γ . A vacina de Gumboro viva foi aplicada por via ocular, assim, as células dendríticas CD83⁺ presentes nas glândulas de Harder

(HANSELL et al., 2007) devem ter se ativado e estimulado a diferenciação de Th17 pela ação de IL-17, que produz Interleucina-6. Embora nas aves, os linfócitos Th17 não tenham sido caracterizados, existe a possibilidade da sua presença, pois já foram descritas a IL-17 e a IL-23 nesta espécie animal (DAVISON et al., 2008).

Como ocorreu uma alta expressão de IFN- γ , nos diferentes grupos estudados, com a exceção das análises realizadas no 35º dia de idade, este resultado sugere que ocorreu uma ativação imunológica por antígeno intracelular, capaz de estimular a produção de citocinas características de ativação de Th1. Este era um resultado esperado, pois os agentes estimuladores de sistema imune utilizados neste estudo eram vírus, ou seja, microrganismos intracelulares. É possível também que outras populações celulares possam ter se ativado, como as células NK (AKRAMIENÉ et al., 2007), fibroblastos ativados por vírus (AKIRA et al., 2006) ou linfócitos T citotóxicos, células altamente eficientes na eliminação de vírus e que são produtoras desta citocina (DAVISON et al., 2008).

Inesperadamente, a IL-2, uma citocina que estimula a ativação e multiplicação de Th1, se expressou somente nos grupos que receberam β -glucano, no 7º dia e no 40º dia de idade. Assim, é possível que outros mecanismos de ativação tenham sido estimulados, ativando Th1, pois se verificou uma expressão aumentada de IFN- γ e de IgG, ou seja, um isótipo que é produzido pela cooperação do linfócito B com esta célula.

A ativação imunológica, nas aves com 40 dias de idade, demonstra a ação prolongada do β -glucano solúvel, pois este foi injetado no 1º dia de idade. Esta ação é consequência da baixa degradabilidade do β -glucano por células de Kupffer (SUDA et al., 1996), assim, β -glucano uma vez depositado no corpo, permanece por longos períodos de tempo sem alterações estruturais (MIURA et al., 1999).

Os resultados obtidos demonstraram que o β -glucano na forma sulfatada foi capaz de estimular o sistema imunológico. Atuou como um imunoadjuvante, pois as aves receberam o β -glucano no primeiro dia, diluído no veículo da vacina de Marek e Boush aviária, e ocorreu síntese aumentada de IgG para antígenos não relacionados como o vírus da Bronquite infecciosa das galinhas, Doença de Newcastle e Doença de Gumboro, sendo que estes estiveram aumentados durante o período de criação, ou seja, até o 40º dia de idade. Ocorreu também uma alta expressão de Interferon-gama nos grupos que receberam a vacina associada ao β -glucano.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições realizadas nesses experimentos pode-se concluir:

- a) A dose resposta detectada para estimular o sistema imune é de 240 $\mu\text{g/ave}$.
- b) O β -glucano solúvel na forma sulfatada foi capaz de estimular o sistema imunológico de *Gallus gallus*, atuando como um potente imunoadjuvante, pois intensificou a síntese de IgG e a expressão de IFN- γ , IL-2 e IL-6.
- c) Não se observou efeito citopático do β -glucano solubilizado sobre fibroblastos de embriões de galinhas SPF.
- d) O β -glucano solúvel, na forma sulfatada ou fosfatada, não inativou o vírus de Marek e ocorreu a formação de vacúolos em fibroblastos de embrião de galinha SPF.
- e) A inocuidade do β -glucano solubilizado, na forma sulfatada ou fosfatada, foi determinada pela injeção desses produtos no músculo peitoral de frangos. Estes produtos não causaram lesões macroscópicas.
- f) A análise histopatológica revelou que a forma sulfatada não provocou alterações teciduais quando estes resultados foram comparados àqueles encontrados com a forma fosfatada ou com o glucano insolúvel.
- g) O β -glucano solubilizado, na forma sulfatada, associado a vacinas aviárias, aumentou a síntese de IgG e diminuiu o catabolismo destas imunoglobulinas, sendo um imunomodulador ou imunoadjuvante.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, A. M.; PEDROSO, M. Respuesta humoral en ratones ante la administración oral del β 1-3 glucano particulado. **Revista de Salud Animal**, v. 2, n. 21, p. 91-96, 1999.

ADACHI, Y.; OKAZAKI, M.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 12, p.1554–1560, 1994.

ADAMS, E. L; RICE, P. J; GRAVES, B.; ENSLEY, H. E; YU, H; BROWN, G. D; GORDON, S; MONTEIRO, M. A; PAPP-SZABO, E; LOWMAN, D. W; POWER, T. D; WEMPE, M. F; WILLIAMS, D. L. Differential high affinity interaction of Dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side chain branching. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, p. 115-123, 2008.

ALFONSO, P.; VARELA, N.; PERERA, C. L.; NODA, J.; CUELLO, S.; NÚÑEZ, A.; PEDROSO, M. Actividad adyuvante comparada con el Gel de aluminio y el b 1-3 glucano con el virus de Newcastle inactivado. **Revista de Salud Animal**, v. 17, n. 2, p. 137-140, 1995.

AKIRA, S; UEMATSU, S; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 2666-2672, 2001.

ARIIZUMI, K.; SHEN, G. L.; SHIKANO, S., RITTER, R.; ZUKAS, P.; EDEELBAUM, B.; MORITA, A.; TAKASHIMA, A. Cloning of a second dendritic cell- associated C- type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. **Journal Biology Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11957-11963, 2000.

BATTLE, J.; HA, T.; LI, C.; DELLA BEFFA, V.; RICE, P.; KALBFLEISCH, J.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D. Ligand binding to the (1-3)- β -D-glucan receptor stimulates NF κ B activation, but not apoptosis in U937 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 2, p. 499-504, 1998.

BEHALL, K. M.; SCHOLFIELD, D. J.; HALLFRISCH, J. G.; LILJEBERG-ELMSTÅHL, H. G. M. Consumption of both resistant starch and β -glucan improves postprandial-plasma glucose and insulin in women. **Diabetes Care**, v. 29, n. 5, p. 976-981, 2006.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1-3)- β -Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relation-ships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3-14, 1995.

BOTTINO, J. A. Emprego de *adjuvantes* imunoestimulantes em vacinas aviárias. Fortaleza, **Seminário Técnico sobre Manejo, Nutrição e Doenças das Aves**, n. 4, p. 23-37, 1989.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n.30, p. 5467-5484, 2007.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-37, 2001.

BROWN, G. D.; TAYLOR, P. R.; REID, D. M.; WILLMENT, J. A.; WILLIAMS, D. L.; MARTINEZ-POMARES, L.; WONG, S.; GORDON, S. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. *Journal Experimental Medicine*;196:407-412, 2002.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 311-315, 2003.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 471-479, 2005.

BUCKERIDGE, M. S.; VERGARA, C. E.; CARPITA, N. C. The mechanism of synthesis of a cereal mixed-linkage (1,3)(1,4) β -D-glucan in maize: Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. **Plant Physiology**, v. 120, n. 4, p. 1105-1116, 1999.

BUCKERIDGE, M. S.; VERGARA, C. E.; CARPITA, N. C. The mechanism of synthesis of (1,4)-D-Glycans: insight into multi-site mechanisms of glycosyl transfer provided by the cereal mixed-linkage b(1,3)(1,4)-D-glucan synthase. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1045-1053, 2001.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological avaliation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 3, p. 431-351, 2000.

CAIN, K. D.; GRABOWSKI, L.; REILLY, J.; LYTWYN, M. Immunomodulatory effects of a bacterial-derived *b*-1,3 glucan administered to tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in a Spirulina-based diet. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1241- 1244, 2003.

CALNECK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. 1080p.

CHABALGOITY, J. A; BAZ, A.; RIAL, A.; GRILLE, S. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 195–207, 2007.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.111, n. 2, p. s442-s459, 2003

CHEN, K. L.; WENG, B. C.; CHANG, M. T.; LIAO, Y. H.; CHEN, T. T.; CHU, C. Direct Enhancement of the Phagocytic and Bactericidal Capability of Abdominal Macrophage of Chicks by β -1,3 – 1,6-Glucan. **Poultry Science**, v. 87, p. 2242-2249, 2008.

CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutation Research**, v. 371, n. 1-2, p. 115-120, 1996.

COUSO, N.; CASTRO, R.; NOYA, M.; OBACH, A.; LAMAS, J. Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 607-618, 2001.

CROSS, G. G.; JENNINGS, H. J.; WHITFIELD, D. M.; PENNEY, C. L.; ZACHARIE, B.; GAGNON, L. Immunostimulant oxidized β -glucan conjugates. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 539–550, 2001.

CUTLER, J. L. The Enhancement of Hemolysin Production in the Rat by Zymosan. **The Journal of Immunology**, v. 84, p. 416-419, 1960.

CZOP, J. K. The Role of β -Glucan Receptors on Blood and Tissue Leukocytes in Phagocytosis and Metabolic Activation. **Pathology and Immunopathology Research**, v. 5, n. 3-5, p. 286-296, 1986.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; BROWN, A. S.; CARMICHAEL, M. D.; GHAFFAR, A.; MAYER, E. Effects of moderate exercise and oat β -glucan on innate immune function and susceptibility to respiratory infection. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 286, p. 366-372, 2004.

DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, November, 2008. 482p.

DORE, C. M. P. G.; AZEVEDO, T. C.G.; SOUZA, M. C. R.; REGO, L. A.; DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 9, p. 1160-1169, 2007.

DAWSON, K. A. Some milestones in our understanding of yeast culture supplementation in ruminants and their implications in animal production systems. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. (Eds.). **PROCEEDINGS OF ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM**, 16, Nottingham, U.K. **Proceedings...** Nottingham, U.K.: Nottingham University, 2000. p. 473-486, 2000.

De PAULA, A. C. C. F. F.; SOUZA, R. V.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. BUCKERIDGE, M. S. Hipoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 885-893, 2005.

DILUZIO, N. R. Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. **Trends in Pharmacological Science**, v. 4, p. 344-347, 1983.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by atlantic salmon (*Salmon salar* L.) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 17, n. 4, p. 319-330, 1993.

ESTRADA, A.; YUN, C. H.; VAN KESSEL, A.; LI, B.; HAUTA, S.; LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. **Microbiology and Immunology**, v. 41, n. 12, p. 991-998, 1997.

FRANCO, S.G.; PEDROSO, A.C.; GRIGOLETTI, C. Efeitos da inclusão de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) associados ou não a antibióticos na alimentação de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 2, p. 79-85, 2005.

GANDRA, E. L.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GAIOTTO, J. R. **Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*)**. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GUO, Y. M.; ALI, R. A.; QURESHI, M. A. The influence of beta-glucan on immune responses in broiler chicks. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 461-472, 2003.

HANSELL, C.; ZHU, X. W.; BROOKS, H.; SHEPPARD, M.; WITHANAGE, S.; MASKELL, D.; McCONNELL, I. Unique features and distribution of the chicken CD83⁺ cell. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 5117-5125, 2007.

HASSID, W. Z.; JOSLYN, M. A.; McCREADY, R. M. The molecular constitution of insoluble polysaccharide from yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 63, n. 1, p. 295-298, 1941.

HERRE, J.; MARSHALL, A. J.; CARON, E.; EDWARDS, A. D.; WILLIAMS, D. L.; SCHWEIGHOFFER, E.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; SOUSA, C. R.; HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 869-876, 2004.

HETLAND, G; SANDREN, P. Beta 1-3 glucan SSG given with of *Mycobacterium Tuberculosis* in macrophage cultures. **Immunology and Medical Microbiology**. v. 33, n. 1, p. 41-45, 2002.

HIDA, S.; NAGI-MIURA, N.; ADACHI, Y.; ONHO, N. β -glucan derived from zymosan acts as an adjuvant for collagen-induced arthritis. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 6, p. 453-461, 2006.

HUNTER Jr, K.W; GAULT, R.A; BERNER, M.D. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**. v.35, p.267–271, 2002.

HUNTER, Jr. K. W.; DUPRE, R. D.; REDELMAN, D. Microparticulate beta-glucan upregulates the expression of B7.1, B7.2-H1, but not B7-DC on cultured murine peritoneal macrophages. **Immunology Letters**, v. 93, n. 1, p. 71-78, 2004.

IBGE. Pesquisas trimestrais do abate de animais, do leite, do couro e da produção de ovos de galinha.

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1114&id_pagina=1> Acesso em: 26 set. 2008.

JENEY, G.; JENEY, Z. Application of immunostimulants for modulation of the nonspecific defense mechanisms in sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus* x *A. baerii*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 18, p. 416–419, 2002.

JUNG, K.; HA, Y.; HA., S. K.; HAN, D. U.; KIM, D.W.; MOON, W. K.; CHAE, C. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon- γ and nitric oxide. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 72-76, 2004.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiology**, v. 146, p. 3217-3226, 2000.

KELLY, L. S.; DOBSON, E. L.; FINNEY, C. R.; HIRSCH, J. D. Proliferation of the reticuloendothelial system in the liver . **American Journal of Physiology**, v. 198, p. 1134-1138, 1960.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.

KOKOSHIS, P. L.; WILHIAMS, D. L.; COOK, J. A.; DI LUZIO, N. R. Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan. **Science**, v. 199, n. 4335, p. 1340-1342, 1978.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 485–517, 2009.

KRAKOWSKI, L.; KRZYŻCZANOWSKI, J.; WRONA, Z.; SIWICKI, A. K. The effect of nonspecific immunostimulation of pregnant mares with 1,3/1,6 glucan and levamisole on the immunoglobulins levels in colostrum, selected indices of nonspecific cellular and humoral immunity in foals in neonatal and postnatal period. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 1-11, 1999.

LAVIELLE, J.; SOLER, D. M.; MIRANDA, I.; PEDROSO, M. Aceptabilidad de la formulación oral de β 1-3 glucano particulado lineal (β 1-3 GPL) e influencia sobre la respuesta a la vacuna de Newcastle. **Revista de Salud Animal**, v. 3, p. 183-187, 2004.

LEE, D. Y.; JI, I. H.; CHANG, H. I.; KIM, C. H. High-level TNF- α on secretion and macrophage activity with soluble β -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 233-238, 2002.

LI, BING.; ALLENDORF, D. J.; HANSEN, R.; MARROQUIN, J.; CRAMER, D. E.; HARRIS, C. L.; YAN, J. Combined Yest β -Glucan and Antitumor Monoclonal Antibody Therapy Requires C5a-Mediated Neutrophil Chemotaxis via Regulation of Decay-Accelerating Factor CD55. **Cancer Research**, v. 67, n. 15, p. 7421-7430, 2007.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New

Challenges. **Journal of Bacteriology**, v.180, n. 15, p. 3735-3740. 1998.

LOWRY, V.; FARNELL, M. B.; FERRO, P. J.; SWAGGERTY, C. L.; BAHL, A.; KOGUT, M. H. Purified h-glucan as an abiotic feed additive up-regulates the innate immune response in immature chickens against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 309-318, 2005.

MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. β -glucana de *Saccharomyces*: constiuição, bioatividade e obtenção. *Ciencias Agrárias*, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, p. 819-826, 2007.

MEIRA, D. A.; PEREIRA, P. C. M.; MARCONDES-MACHADO, J.; MENDES, R. P.; BARRAVIERA, B.; PELLEGRINO, J. R. J.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T. S.; CASTILHO, L. M.; THOMZAINI, I.; SILVA, C. L.; FOSS, N. T.; CURRI, P. R. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 5, p. 496-503, 1996.

MESTECKY, J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. **Journal Clinical Immunology**, v. 7, p. 265-276, 1987.

MESTECKY, J.; ELSON, C. O. Peyer's Patches as the Inductive Site for IgA Responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 1293-1294, 2008.

MISRA, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; XAVIER, B.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S. C. Pre- and pos-challenge immuno-haematological changes in *Labeo rohita* juveniles fed gelatinized or nongelatinised carbohydrate with n-3 PUFA. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, p. 346-356, 2006.

MIURA, N. N.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; WATANABE, M.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; YADOMAE, T. Gradual solubilization of *Candida* cell wall β -glucan by oxidative degradation in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-129, 1998.

MONTES DE OCA, N.; TALAVERA, A.; PEREZ, M. Uso del Beta 1-3 glucano como adyuvante de una vacuna de *E. coli* K 88⁺ em cerdas gestantes. **Revista Salud Animal**, v. 16, n. 1-3, p. 27-32, 1994.

MULCANY, G.; QUINN, P. J. A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 119-139, 1986.

MÜLLER, A.; RICE P. J.; ENSLEY, H. E.; COOGAN, P. S.; KALBFLEISH, J. H.; KELLEY, J. L.; LOVE, E. J.; PORTERA, C. A.; BROWDER, I. W.; WILLIAMS, D. L. Receptor binding and internalization of a water-soluble (1-3)-beta-D-glucan biologic response modifier in two monocyte/macrophage cell lines. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 9, p. 3418-3425, 1996.

NORTH, M. O.; BELL, D. D. **Commercial chicken production manual**. 4. ed. New York: Chapman and Hall Press, 1990. 913p.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of immunotoxicology*, v. 5, p. 47-57, 2008.

OHNO, N.; UCHIYAMA, M.; TSUZUKI, A.; TOKUNAKA, K.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; AIZAWA, M. W.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; YADOMAE, T. Solubilization of yeast cell-wall β -(1-3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction. *Carbohydrate Research*, v. 316, n. 1, p. 161-172, 1999.

OLIVEIRA, M. B. C. **Novo adjuvante em vacina contra a doença de Newcastle: avaliação do perfil imunológico humoral através dos testes de inibição da hemaglutinação e ELISA e resistência ao desafio**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

OLSON, E. J.; STANDING, J. E.; GRIEGO-HARPER, N.; HOFFMAN, O. A.; LIMPER, A. H. Fungal β -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 9, p. 3548–3554, 1996.

ORLEAN, P. Biogenesis of yeast wall and surface components. In: MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF THE YEAST *SACCHAROMYCES*, 97., 1997, New York. **Abstracts...** New York: Spring Harbor Laboratory, 1997. p. 229-362.

PALIC, D.; ANDREASEN, C. B.; HEROLT, D. M.; MENZEL, B. W.; ROTH, J. A. Immunomodulatory effects of β -glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Developmental and Comparative Immunology*, v. 30, p. 817–830, 2006.

PATCHEN, M. L.; MacVITTIED, T. J. Dose-dependent response of murine pluripotent stem cell and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of the immunomodulating agent glucan. *Immunopharmacology*, v. 5, p. 303-313, 1983.

PEDROSO, M.; LAVIELLE, J.; SOLER, D. M. **Efecto de la suspensión de β 1-3 glucano particulado lineal (β 1-3 gpl) sobre la respuesta inmune a vacunas en pollos**. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106/110613.pdf> . Acesso em: 24 abr. 2008.

PILLEMER, L.; ECKER, E. E. Anticomplementary factor in fresh yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 137, p. 139-142, 1941.

PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I. H.; WURZ, L.; TODD, E. W. The properdin system and immunity. III. The zymosan assay of properdin. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 103, n. 1, p. 1-13, 1956.

PRZEMYSŁAW, J. T.; PIOTR, T. Probiotics and Prebiotics. *Cereal Chemistry*, v. 80, n. 2, p. 113-117, 2003.

RAMON, G. Procedres pour acroitre la production des antitoxins. *Annales de Institut Pasteur*, v. 40, p. 1-10, 1926.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P. Prevention of Salmonella Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 88, p. 734-743, 2009.

RIGGI, S. J.; DiLUZIO, N. R. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. **The American Journal of Physiology**, v. 200, p. 297-300, 1961.

ROBINSON, M. J.; SANCHO, D.; SLACK, E. C.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; SOUSA, C. R. E. Myeloid C-type lectins in innate immunity. **Nature Immunology**, v. 7, p. 1258-1265, 2006.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Performance and intestinal mucosa development of broilers chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal Applied Poultry Research**, v. 10, p. 236-244, 2001.

SANTINI, G. **Relatorio Setorial Final**. Disponível em: http://www.finep.gov.br/PortalDPP/relatorio_setorial_final_impressao.asp?lst_setor=27. Acesso em: 20 dez. 2008.

SAWATA, A.; KUME, K.; NAKASE, Y. Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 2 organisms: Occurrence and immunologic properties of hemagglutinin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 1311-1314, 1982.

SELVARAJAV, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 57, n. 1, p. 39-48, 2005.

SHAMHINIAN, S.; BUSSEY, H. β 1 \rightarrow 6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 477-489, 2000.

SOARES, S. G.; MATTA, M. R. F.; MATTA, C. G. F.; CRUZ, G. M.; TILBURG, M. F.; SOUZA, V. R. Identificação de Aves Produtoras de Altos e Baixos Títulos de Anticorpos para Diferentes Antígenos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2231-2236, 2000.

STONE, B. A.; CLARKE, A. E. **Chemistry and biology of (1-3)- β -glucans**. Australia: La trobe University Press, 1992.

STRATFORD, M. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. **Yeast Chichester**, v. 10, n. 13, p. 1741-1752, 1994.

STUYVEN, E.; COX, E.; VANCAENEGHEM, S.; ARNOUITS, S.; DEPREZ, P.; GODDEERIS, B. M. Effect of β -glucans on an ETEC infection in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 60-66, 2009.

SUDA, M.; OHNO, N.; HASHIMOTO, T.; KOIZUMI, K.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Kupffer cells play important roles in the metabolic degradation of a soluble anti-tumor (1-3)-

β -D-glucan, SSG, in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 15, n. 2-3, p. 93-100, 1996.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophages. **Biomaterials**, v. 9, p. 356-362, 1988.

TAKEICHI, O.; SAITO, I.; HAYASHI, M.; TSURUMACHI, T.; SAITO, T. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. **Journal of Endodontics**, v. 24; n. 3, p. 157-160, 1998.

TEKES, L.; HORVATH, E.; NAGI, E. Checking of immunity against Newcastle disease by ELISA. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 40, p. 323-328, 1992.

TIMMS, L. M.; BRACEWELL, C. D. Cell mediated and humoral immune response of chickens to inactivated oil-emulsion infectious bronchitis vaccines. **Research Veterinarian Science**, v. 34, p. 224-230, 1983.

TINO, M. S.; CARRIERI, M. L.; ZANETTI, C. R.; MENDES, N. F.; PEREIRA, O. A. C. Immunomodulatory effect of glucan on the response to experimental antirabies vaccination. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, n. 35, p. 431-435, 1993.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology: an introduction**. 6 ed. Saunders, 2000.

TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; MIURA, N. N.; YADOMAE, T. Application of Candida solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 1, p. 59-67, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TUCKER, S. A.; WALKER, A. W. Hock burn in broilers. In: GARNSWORTHY, P. C.; HARESIGN, W.; COLE, D. J. **Recent advances in animal nutrition**. Oxford: Butterworth Heinemann Press, 1992. P. 33-50.

VETVICKA, V.; THORNTON, B. P.; WIEMAN, T. J.; ROSS, G. D. Targeting of natural killer cells to mammary carcinoma via naturally occurring tumor cell-bound iC3b and beta-glucan-primed CR3 (CD11b/CD18). **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 2, p. 599-605, 1997.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. An Evaluation of the Immunological Activities of Commercially Available β 1,3-Glucans. **The American Nutraceutical Association**, v. 10, n. 1, p. 25-31, 2007.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behavior**, v. 94, p. 276-284, 2008.

VOLPATTI, L. D.; ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P.; GALEOTTI, M. Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 14, p. 201-206, 1998.

WHITEHEAD, H. R.; GORDON, J.; WORMALL, A. The third component or heat stable factor of complement. **The Journal of Biochemistry**, v. 10, p. 618-625, 1925.

WILLIAMS, D. L.; McNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; PRETUS, H. A.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W.; Di LUZIO, N. R. A method for the solubilization of a (1-3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 203-213, 1991.

WILLIAMS, D. L.; PRETUS, H. A.; McNAMEE R. B.; JONES, E. L.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W. Development of a water-soluble, sulfated (1- \rightarrow 3)- β -D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, v. 235, p. 247-257, 1992.

WILLIAMSON, G.; DAMANI, K.; DEVENNEY, P.; FAULDS, C. B.; MORRIS, V. J.; STEVENS, B. J. Mechanism of action of cyclic beta-1,2-glucan synthetase from *Agrobacterium tumefaciens*: competition between cyclization and elongation reactions. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 24, p. 7941-7947, 1992.

WILLMENT, J. A.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Characterization of the Human b-glucan Receptor and its Alternatively Spliced Isoforms. **The Journal Biological Chemistry**, v. 276, p. 43818-43823, 2001.

ZEKOVIC, D. B.; KWIATKOWSKI, S.; VRVIC, M. M.; JAKOVLJEVIC, D.; MORAN, C. A. Natural and modified (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 205-230, 2005.