

José Giometti

**Resposta imune humoral em bovinos da raça nelore
vacinados contra a raiva e suplementados
com crômio orgânico**

BOTUCATU – SP

2004

José Giometti

**Resposta imune humoral em bovinos da raça nelore
vacinados contra a raiva e suplementados
com crômio orgânico**

Tese apresentada á Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária.

Orientador: **Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio**

BOTUCATU – SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Giometti, José.

Resposta imune humoral em bovinos da raça nelore vacinados contra a raiva e suplementados com crômio orgânico / José Giometti . – Botucatu : [s.n.], 2004.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2004.

Orientador: Prof. Dr. Simone Biagio Chiachio

Assunto CAPES: 50501062

1. Clínica veterinária. 2. Nelore (Bovino)

CDD 636.089

Palavras chave: Bovinos; Cortisol; Crômio; Raiva; Resposta imune humoral.

À minha querida esposa Lina Maria,

**presença constante e definitiva em todos
os momentos de minha vida, pelo
carinho e compreensão.**

***Às minhas filhas Lina Maura, Ines
Cristina, Daniela Elisa, meu genro
André Eduardo e meu neto Andrezinho,***

**pelos momentos que me ausentei
de suas companhias.**

Ao meu orientador e amigo, *Prof. Ass. Dr. Simone
Biagio Chiacchio*, pela dedicação, disponibilidade e confiança
demonstradas desde o início, fatores decisivos para a
conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, que me concedeu a suprema graça da vida e aos meus pais (*in memoriam*) que souberam como materializá-la;

Aos meus queridos colegas e amigos, prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo, Prof. Dr. Hermann Bremmer Neto, Prof. Dr. Izidoro Francisco Sartor, Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves, Prof. Dr. Pedro Padilha, Prof. Dr. Marcio R. G. Kuchembuck, Prof. Dr. Enio Pedone Bandarra, Profa. Dra. Michiko Sakate, Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes, Prof. Dr. Luís Carlos Vianna, Prof. Colombo Guerra Carvalho e Prof. Dr. Laurenil Gaste, pelo grande apoio recebido;

Ao caríssimo amigo, Dr. Avelino Albas, pela execução dos trabalhos de soroneutralização, juntamente com o Dr. Otávio Luiz Fontolan;

À direção da UNOESTE na pessoa da Profa. Ana Cardoso Maia de Oliveira Lima, pela compreensão e amizade;

À seção de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, na pessoa da Funcionária Denise A. Fioravante Garcia pela presteza no atendimento acadêmico;

Aos prezados colegas da pós-graduação, que compartilharam comigo dos momentos de busca, de apreensão e de esperança;

Ao amigo Dr. Andrei Borges Teixeira, que juntamente com minha filha Dra. Ines Cristina, me auxiliaram nas análises de radioimunoensaio;

À minha filha Dra. Daniela Elisa, pelo relevante auxílio na digitação;

Aos funcionários dos laboratórios pela dedicação e paciência.

Agradeço à *Fort-sal Suplementos Minerais Ltda®* e à

Alltech do Brasil®

pela doação do sal mineral e levedura de crômio, respectivamente, utilizados na suplementação dos animais durante todo o experimento.

“Todo o saber e todo aumento de saber, em vez de terminar em uma solução, dá antes início a uma nova dúvida. Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas. E a cada resposta, nova pergunta se segue.”

Hermann Hesse

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

Resumo

Abstract.

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Resposta imune.....	16
2.2 Crômio como microelemento essencial.....	18
2.3 Crômio orgânico <i>versus</i> crômio inorgânico.....	23
2.4 Deficiência de crômio.....	28
2.5 Crômio nos alimentos.....	30
2.6 Levedura de crômio.....	32
2.7 Imunização contra a raiva.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Formação dos grupos de animais.....	39
3.2 Suplementação de crômio.....	40
3.3 Coleta de amostra.....	43
3.4 Determinação do crômio no soro.....	43
3.5 Determinação do cortisol.....	45
3.6 Determinação da resposta imune humoral.....	46
3.7 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Comparação entre os títulos de SN dentro dos grupos.....	50
4.2 Determinação das concentrações de crômio no soro.....	53
4.3 Determinação das concentrações de cortisol no soro.....	56
5 CONCLUSÕES.....	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

GIOMETTI, J. Resposta imune humoral em bovinos vacinados contra a raiva e suplementados com crômio orgânico. Botucatu. 2004, 79p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, 2004. Universidade Estadual Paulista

Resumo

Com o objetivo de se avaliar o efeito da adição de crômio orgânico na resposta imune humoral de bovinos, cinco grupos de bovinos da raça nelore, contendo 15 animais cada, foram suplementados com levedura de crômio, ficando os grupos assim distribuídos: GC (controle), GV (vacinado e sem crômio), GV+8,5 (vacinado + 8,5 ppm de crômio), GV+17 (vacinado + 17,0 ppm de crômio) e GV +34 (vacinado + 34,0 ppm de crômio). Amostras de soros destes animais foram avaliadas por meio do teste de soroneutralização (SN) em camundongos albinos durante os dias 30, 60 e 90 após a primovacinação contra a raiva. Foram realizadas, simultaneamente, análises das concentrações séricas de crômio e de cortisol, pelos métodos de espectrofotometria por absorção atômica em forno de grafite e radioimunoensaio, respectivamente. Os resultados obtidos permitem concluir que os animais do grupo E (vacinados + 34 ppm de crômio) apresentaram títulos protetores de anticorpos contra a raiva ainda aos 90 dias após a primovacinação. Essa resposta ocorreu independentemente das concentrações séricas de cortisol, pois o crômio não se mostrou efetivo na queda dos valores séricos do mesmo.

Palavras – chave: *Bovinos; crômio; raiva; resposta imune humoral; cortisol.*

GIOMETTI, J. Humoral immune response in bovines of the nelore race immunized against rabies and supplemented with organic chromium. Botucatu, 2004, 79p. Thesis Doctorate in Veterinary Medicine, area of Veterinary Clinic Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, 2004. Universidade Estadual Paulista

Abstract

With the objective of to evaluate the effect of the addition of organic chromium in the humoral immune response against rabies, five Nelore's bovine breed groups with 15 animals each, were supplemented with chromium yeast being the group GC (control), GV (vaccinated and without chromium), GV+8,5 (vaccinated + 8,5 ppm of chromium), GV+17 (vaccinated + 17 ppm of chromium) and GV+34 (vaccinated +34 ppm of chromium). Serum samples of this animals were analysed with serum neutralization test (SN) in albino mice in the days 30,60 and 90 post-vaccination. Simultaneously, serum concentrations of the chromium were determined for analysis with spectrophotometer of atomic absorption in graphite oven and analysis of the cortisol was achieved through of the radioimmunoassay. These results allow to conclude that the animals of the group GV+34 have persistence of the protector's antibody titration anti rabies until 90 days post- vaccination. This response does not depend of the cortisol levels, since the chromium don't show to be effective to decrease its levels.

Key words: Bovine; chromium; rabies; immune humoral response; cortisol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estância Viera de Leiria – Mirante do Paranapanema.....	38
Figura 2	– Divisão dos grupos de animais.....	39
Figura 3	– Grupo de animais do ensaio.....	40
Figura 4	– Distribuição nos cochos do suplemento mineral.....	41
Figura 5	– Colheita de sangue para análises.....	43
Figura 6	– Aparelho de espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite.....	45
Figura 7	– Separação de soros para análise.....	45
Figura 8	– Dosagem de cortisol.....	46
Figura 9	– Inoculação intracerebral de camundongos albinos.....	48
Figura 10	– Camundongos albinos.....	48
Figura 11	Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes transformados pela equação $\log_{10}(SN+1)$ após primovacinação.....	51
Figura 12	– Médias das concentrações de crômio nos soros (ppb) nos animais dos grupos A, B, C, D e E nos diferentes momentos.....	54
Figura 13	– Médias das concentrações de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) nas amostras de soros dos diversos tratamentos em diferentes momentos.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Comparação entre as médias dos títulos dos anticorpos neutralizantes transformados pela equação $\log_{10}=(SN+1)$ obtidos nos diferentes tratamentos em diferentes momentos.....	51
Tabela 2	– Parâmetros das regressões estabelecidas dos títulos de soro neutralização (SN) transformados logaritmicamente pela equação $\log_{10} (SN+1)$. Grupo A (sem vacinação e sem crômio), Grupo B (sem vacinação e com crômio), Grupo C (com vacinação e com 0,595 mg de crômio), Grupo D (com vacinação e com 1,19 mg de crômio) e Grupo E (com vacinação e 2,38 mg de crômio).....	52
Tabela 3	– Médias das concentrações de crômio nos soros (ppb) nos diferentes tratamentos em diferentes momentos.....	54
Tabela 4	– Parâmetros das regressões estabelecidas dos títulos das concentrações de crômio nos soros de bovinos dos diferentes grupos. Grupo A (sem vacinação e sem crômio), Grupo B (sem vacinação e com crômio), Grupo C (com vacinação e com 0,595 mg de crômio), Grupo D (com vacinação e com 1,19 mg de crômio) e Grupo E (com vacinação e 2,38 mg de crômio).....	55
Tabela 5	– Médias das concentrações de cortisol ($\mu\text{g/ dl}$) nas amostras de soros dos diversos tratamentos em diferentes momentos.....	56
Tabela 6	– Cálculos das Regressões das Concentrações de Cortisol nos Soros de Bovinos dos Diferentes Grupos. Grupo GC (sem vacinação e sem crômio), Grupo GV (com vacinação e sem crômio), Grupo GV+8,5 (com vacinação e com 8,5 ppm de crômio), Grupo GV+17 (com vacinação e com 17 ppm de crômio), Grupo GV+34 (com vacinação e com 34 ppm de crômio).....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	– Mistura mineral fornecida: níveis de garantia.....	42
Quadro 2	– Composição do sal mineral suplementado com levedura de crômio.....	42
Quadro 3	– Programa de aquecimento para determinação de crômio. Volume injetado 10ml de amostra + 10ml de modificador de <i>paladium</i>	44

1. INTRODUÇÃO:

O papel de elementos minerais na indução de resposta imune e na prevenção de doenças tem sido relatado há décadas. Todavia, alguns elementos minerais presentes nos tecidos vivos tinham a denominação de *elementos traços* e suas funções e metabolismo foram pouco estudados, por falta de técnicas analíticas mais apropriadas (TEDESCHI, 2001).

Animais com bom funcionamento do sistema imune são mais resistentes às doenças e produzem melhor desempenho. A imunização ativa envolve a administração de antígenos em um animal de maneira que ele responda por meio da montagem de resposta imune protetora (ADA, 1990). Quando um antígeno entra no organismo deve, primeiramente, ser capturado e processado, de forma que possa ser reconhecido como estranho, sendo esta informação enviada para o sistema imune, o qual responderá com a produção de anticorpos específicos e/ou células capazes de eliminar o antígeno em questão (BURTON, 1995).

O manejo de bovinos pode se tornar estressante para os animais, uma vez que eles são conduzidos dos pastos onde se encontram para o brete, permanecendo algumas horas em jejum, além da punção jugular para colheita de sangue. Alguns experimentos demonstraram que os efeitos provocados pela punção jugular repetida, sobre os níveis de concentração plasmática de cortisol, em bovinos de leite, resultaram em um aumento significativo dos mesmos (HOPSTER et al., 1999).

Segundo Burton (1995), o estresse elevado provoca diminuição no metabolismo da glicose, aumento na secreção de cortisol sérico, o qual reage antagonicamente com a insulina, prevenindo a entrada de glicose no tecido periférico (muscular e adiposo), resultando em intensa mobilização de crômio de estoques corporais, o qual será excretado pela urina de maneira irreversível.

Descobertas sucessivas sobre a importância de alguns minerais presentes em pequenas concentrações no organismo, levaram ao diagnóstico de deficiências desses elementos em várias regiões do mundo, revelando que eles tinham importância nutricional e econômica consideráveis.

Um dos últimos microminerais a ser descoberto foi exatamente o crômio, existindo um evidente aumento no interesse de se estudar o verdadeiro

papel do crômio na suplementação dos ruminantes (TEDESCHI, 2001). Já na nutrição humana, o crômio é considerado um nutriente essencial e seus efeitos na tolerância à glicose têm sido amplamente revisados (ANDERSON, 1994), sendo os sintomas de sua deficiência também associados ao envelhecimento (EVANS & MEYER, 1994).

Informações sobre os benefícios da suplementação com crômio para animais de criação são escassos e testes mais recentes mostraram que essa suplementação aumentou a velocidade do ganho de peso, eficiência alimentar e resposta imune de novilhos estressados em crescimento (BURTON et al., 1993).

Estimativas sobre a prevalência da raiva no Brasil, apontam para aproximadamente 30 mil óbitos/ano, constituindo-se em sério problema de saúde pública. A transmissão da doença ocorre pela mordedura do animal infectado, geralmente morcegos. Em razão do surgimento de focos da doença na região de Presidente Prudente–SP e, da constatação laboratorial do envolvimento de morcegos não–hematófagos na transmissão da raiva (UIEDA et al.,1996), a busca de um programa de vacinação anti–rábica eficiente e seguro vem mobilizando os setores responsáveis.

Trabalho realizado por Albas et al., (1995), na região de Presidente Prudente-SP, mostrou que nem todos os animais vacinados contra a raiva (52,95 %) expressavam título mínimo de anticorpos para a sua proteção, quando se comparou vacinas de diferentes laboratórios. O problema, ao que tudo indica, não está na vacina ou no esquema de vacinação, mas sim, na incompetência imunológica de alguns animais em responder adequadamente à vacinação (MONTAÑO et al., 1987; ALBAS et al., 1995).

Com o crescente aumento na demanda de alimento de origem animal, a biotecnologia tem procurado melhorar de maneira substancial a produtividade animal e transferir conhecimentos e novas tecnologias ao produtor, buscando atender a este objetivo. Este estudo, tem a finalidade de avaliar a resposta imune em bovinos imunizados contra raiva e suplementados com crômio orgânico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta Imune

Depois que Pasteur descobriu ser possível produzir imunidade contra agentes infecciosos mediante vacinação, logo se reconheceu que as substâncias que proporcionavam essa imunidade podiam ser encontradas no soro sangüíneo (ABBAS, 1998). Os fatores de proteção encontrados no soro de um animal imunizado, são as proteínas conhecidas como anticorpos, termo utilizado pela primeira vez em 1890 por Behring e Kitasato (BIER, 1963).

O aumento na concentração sérica de cortisol, como resultado de estresse, está associado com a redução da resposta de linfócitos ao estímulo por mitógenos (BLECHA & MINOCHA, 1983). Estudo realizado com bovinos suplementados com crômio, verificou um aumento na resposta blastogênica de linfócitos induzida por fitohemaglutinina, em relação ao grupo controle, mesmo com o aumento da concentração de cortisol, sugerindo que os efeitos da dietas com crômio sobre as respostas imunológicas ao estresse, são dependentes de inúmeras variáveis, incluindo o tipo de estresse, a sua duração e o temperamento dos animais submetidos a ele (KEGLEY & SPEARS, 1995). A possibilidade de se obter melhoria na competência imunológica de bovinos estressados por meio de suplementação nutricional, pode ser alternativa desejável afim de melhorar a produtividade animal e prevenir doenças (ARTHINGTON et al., 1997). Para resistir às doenças infecciosas, os animais de produção devem ter um forte e eficiente sistema imune (BURTON, 1995). A imunização ativa (vacinação) possui várias vantagens importantes comparadas com a imunização passiva, dentre as quais se incluem o período de proteção prolongado, a recuperação e o reforço da resposta protetora por meio de injeções repetidas de antígeno (ADA, 1990). A imunização ativa ideal deve conferir uma imunidade forte e prolongada e não apresentar efeitos colaterais adversos (ABBAS, 1998).

Evidências acumuladas indicam que as várias formas de estresse induzem a alterações neuroendócrinas, as quais perturbam o sistema imune, levando à imunossupressão e aumentando a suscetibilidade às doenças

(GRIFFIN, 1989). A incidência de doenças em bovinos de leite e de corte, é muito mais alta durante os períodos de máximo estresse, incluindo o desmame, restrição de água, aumento da densidade animal, pico de lactação e transporte (CHANG & MOWAT, 1992).

Um dos primeiros pesquisadores a demonstrar experimentalmente a ligação entre estresse e o enfraquecimento do sistema imunológico foi Pasteur (1822-1895), ao registrar que aves expostas a condições estressantes tornavam-se mais suscetíveis à infecção por antraz (BAUER, 2002).

Tem sido postulado que a resistência a doenças, como pneumonia e mastite, está relacionada com a capacidade do animal de produzir e manter uma resposta imune adequada durante os períodos de alto estresse (BURTON, 1995). Fatores estressantes como mudanças na alimentação, temperatura, umidade, ventilação, reunião de animais de diferentes origens, são responsáveis por doença respiratória (LOFGREEN, 1983).

O estresse está relacionado à liberação de hormônios que, além de alterar vários aspectos da fisiologia, têm ainda um efeito modulador das defesas do organismo. Em humanos, o principal hormônio com essas funções é um glicocorticóide, o cortisol (BAUER, 2002). Os glicocorticóides são conhecidos inibidores da produção de anticorpos, da fagocitose, de fatores ativadores de linfócitos e maturação de células T (MUNK et al., 1984 ; KHANSARI et al., 1990), interferindo na resposta imune. Em condições de estresse, pode ocorrer o aumento na concentração plasmática de glicocorticóides, em especial o cortisol (HOPSTER et al., 1999).

Alguns estudos demonstraram a possibilidade de se melhorar a competência imunológica de bovinos submetidos a situações de estresse, por meio da suplementação nutricional (ARTHINGTON et al., 1997). O crômio tem sido um dos minerais mais estudados na última década, visando conferir um melhor perfil imunológico a ruminantes submetidos ao estresse (CHANG & MOWAT, 1992). Indivíduos vacinados durante períodos de estresse, falham em desenvolver uma completa produção de anticorpos (BAUER, 2002).

2.2 Crômio como microelemento essencial

Para se considerar um elemento mineral essencial para a nutrição humana ou animal se faz necessário demonstrar que dietas purificadas, totalmente livres ou deficientes daquele elemento particular, sejam capazes de induzir uma síndrome de deficiência e que a regressão dos sintomas, seja observada tão logo a dieta seja apropriadamente suplementada com o elemento ausente ou deficiente (MORDENTI et al., 1997). A importância do crômio como nutriente essencial, foi primeiramente demonstrada em ratos em 1959, após outros microelementos como o ferro, cobre, iodo, manganês, cobalto, molibdênio e selênio (ANDERSON et al., 1992). Schwartz & Mertz (1957), identificaram uma substância nas leveduras que facilitava a utilização da glicose, estimulando a ação da insulina quando esta estava comprometida. Tal substância foi denominada *fator de tolerância à glicose* (GTF). O ingrediente ativo deste GTF descobriu-se, posteriormente, tratar-se do crômio (SCHWARTZ & MERTZ, 1959). Além do crômio, o complexo GTF também inclui o ácido nicotínico, glicina, ácido glutâmico e cisteína. A função mais conhecida da GTF é a estimulação da insulina no tecido deficiente em crômio e os sintomas da deficiência em crômio, nos ratos, são: incapacidade de metabolizar normalmente os carboidratos, metabolismo protéico reduzido, redução da longevidade, colesterol elevado, lesões na córnea, diminuição na fertilidade e redução da sensibilidade do tecido periférico à insulina (ANDERSON, 1994).

A longevidade em ratos pode ser aumentada em até 25% com a suplementação de crômio na dieta (EVANS & MEYER, 1994).

A intolerância à glicose é um sintoma de resistência à insulina, estando relacionada com a incapacidade da insulina de se ligar aos seus receptores. A resistência à insulina é um termo genérico que pode ser explicado pela ausência de resposta à insulina (HAYIRLI et al., 2001).

O papel do crômio parece ser o de melhorar a internalização da insulina nas células musculares, seguida pela entrada da glicose e aminoácidos (MERTZ & ROGINSKI, 1971 ; KEGLEY et al., 2000), de modo que a deficiência de crômio resulta na redução da sensibilidade dos tecidos periféricos à

insulina, proveniente de uma possível diminuição no número de receptores, de sua afinidade pela insulina ou de ambos (ANDERSON, 1986).

Efeitos positivos sobre a insulina, assim como sobre a utilização da glicose e aminoácidos, podem ser esperados com a suplementação de crômio, uma vez que será afetada uma grande variedade de órgãos e sistemas. Lindemann (1996), sugere que tais efeitos apareçam na taxa de crescimento, nos processos reprodutivos de fêmeas e machos, na saúde cardiovascular e ocular, e até na longevidade.

Mertz (1993), relatou que a deficiência de crômio não é um fato muito comum e a sua ocorrência em humanos, leva a um quadro de intolerância à glicose, glicosúria, hiperinsulinemia, hipercolisteremia e hipergliceridemia, num padrão semelhante ao observado nos pacientes com *Diabetes mellitus*.

A deficiência de crômio em humanos, foi relatada pela primeira vez em 1977 (JEEJEEBHOY et al., 1977). Quando associado ao GTF, o crômio facilitaria a interação entre a insulina e seus receptores nas células (MOORADIAN & MORLEY, 1987), mantendo um nível adequado de glicose em indivíduos diabéticos não dependentes de insulina (FREUND et al., 1979; BROWN et al., 1986). Junt & Stoecker (1996), reconheceram a essencialidade do crômio como nutriente, sugerindo que o requerimento deste mineral na dieta para humanos varia entre 33 a 200 ppb, com um fornecimento diário de 75 ppb.

A suplementação de crômio em seres humanos, contribui para a redução do colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em curto espaço de tempo (EVANS, 1989; PRESS et al., 1990) e interage com o metabolismo da glicose e/ou lipídeo em gatos, macacos, cobaias, coelhos, esquilos, aves, suínos, bovinos e humanos (ANDERSON, 1988).

Os estudos sobre as necessidades do crômio em animais de exploração zootécnica, só se iniciaram no final da última década, ao contrário do que ocorreu com os seres humanos e animais de laboratório. Estudos realizados com aves, verificaram que perus jovens apresentaram melhores taxas de crescimento e conversão alimentar quando suplementados com crômio na ração (STEELE & ROSEBROUGH, 1979), aumento no percentual de proteína na carcaça e diminuição da gordura (WARD et al., 1993).

Cavalos submetidos a exercício em tapetes rolantes e recebendo suplementação de crômio, apresentaram redução da glicose no plasma, redução do lactato no plasma e redução do cortisol, sugerindo maior eficiência na utilização da energia em condições de estresse (PAGAN et al.,1995).

Pesquisas efetuadas (PAGE et al.,1993 ; LINDEMANN et al., 1995a) com suínos, nas Universidades da Louisiana e Virginia (EUA), registraram um aumento na área de lombo e uma redução na gordura dorsal das carcaças, quando se adicionou crômio na alimentação dos porcos em fase de acabamento. A suplementação de suínos com crômio, por longo período de tempo, acarreta um aumento da área de músculos longuíssimos (LINDEMANN, 1995; KORNEGAY et al., 1997). Mooney & Cromwell (1997), além desse aumento, ainda obtiveram melhora na taxa de depósito de proteína e diminuição da percentagem de gordura na carcaça.

Porcas suplementadas com crômio durante a gestação, obtiveram maior ganho de peso da ninhada ao nascimento e maior eficiência reprodutiva (LINDEMANN et al., 1995b).

Devido a conhecida relação da resposta imune com o crômio, nas situações de estresse, os primeiros trabalhos com ruminantes foram realizados com os animais submetidos a fatores estressantes, os quais, teoricamente, aumentariam as necessidades de crômio, ou aumentariam as perdas do mesmo. Uma série de ensaios avaliando esta possibilidade foi efetuada na Universidade de Guelph (CHANG & MOWAT,1992 ; MOONSIE-SHAGEER & MOWAT,1993 ; BURTON et al., 1994).

Burton et al.(1993), destacaram os efeitos da suplementação do crômio em bovinos e a sua relação com a resposta imune deste animais, nos períodos de alta lactação e próximo ao parto. Estudo realizado na Universidade Estadual da Carolina do Norte (EUA), concluiu que a suplementação com crômio em vitelos, pode afetar a resposta imunológica dos animais (KEGLEY & SPEARS, 1995). Um outro estudo na Universidade Estadual do Arkansas (EUA), avaliou a suplementação de crômio em vitelos desmamados e constatou não haver alteração no rendimento de carcaça, mas houve redução na morbidez (LINDELL et al., 1994).

Clark et al. (1996) avaliando os efeitos do cobre, zinco, cobalto e crômio no sistema imune de novilhas em final de gestação, relataram que os animais suplementados apresentavam maior número de linfócitos e neutrófilos. Os efeitos da suplementação do crômio sobre a eficiência reprodutiva e produtiva de bovinos de leite, foi informada por diversos estudos (BURTON et al., 1993; BONOMI et al., 1997; HAYIRLI et al., 2001).

Hayirli et al.(2001), realizaram experimento com vacas de leite suplementadas com crômio-metionina, durante os períodos pré e pós-parto. Demonstraram que, embora a suplementação no período pré- parto não tivesse afetado a concentração de triglicérides hepático, ela aumentou de maneira significativa a ingestão de matéria seca e produção de leite, ao mesmo tempo que reduziu a resistência à insulina no período. Além disso, melhorou a tolerância à glicose e resposta à insulina no pós-parto.

Burton et al. (1993), constataram reduzida incidência de cetose, aumento no crescimento corporal e melhoria na produção de leite, associados a um aumento na resposta imune de bovinos leiteiros, quando estes foram submetidos a dietas com crômio.

O possível benefício da utilização do crômio sobre a resposta imune de bovinos, tem sido pesquisado durante a última década. Wright et al. (1995), verificaram a influência da suplementação com crômio associada à vacinação, sob condições de estresse, na resposta imune de bovinos transportados. A suplementação com cloreto de crômio e levedura de crômio em bovinos, embora não tenha melhorado o desempenho produtivo, demonstrou aumentar a resposta imune sob condições de estresse (KEGLEY & SPEARS, 1995).

Ensaio visando obter aumento na resposta de anticorpos no soro de novilhos adquiridos em leilão, transportados e desafiados com injeções de ovalbumina e antígenos virais, mostrou que a suplementação com crômio aumentou a resposta imune humoral destes animais (WRIGHT, et al., 1994 ; CHAN et al., 1996). Estudos realizados nos EUA, demonstraram que algumas perdas econômicas registradas na produção bovina resultam da morbidade e mortalidade associadas com a doença respiratória bovina (BDR). A morte de animais em pequenos confinamentos, de 100 a 1000 animais, podem chegar

a 1,5 -2,7%, das quais cerca de 70% delas são atribuídas à BDR. A incidência da doença está associada com o desmame, transporte e outras condições de estresse, resultando em queda da resposta imune (GALYEAN et al., 1999).

A deficiência de crômio está relacionada não só com a baixa ingestão do mesmo. Fatores outros como a presença de minerais antagônicos (ferro e zinco), falta de precursores para biodisponibilidade (como é o caso dos aminoácidos), alto nível de antiácidos intestinais e baixo nível de ácido ascórbico, também contribuem para o baixo nível de aproveitamento do mineral. Além disso, a eliminação de crômio, provocada pela ingestão de dietas que aumentam sua necessidade, tais como os açúcares, propionato, lipídeos, nitrogênio não protéico ou solúvel e a ocorrência de situações estressantes (gestação, lactação, traumas físicos, infecções virais e bacterianas agudas, obesidade, entre outros) exercem um papel significativo na deficiência deste mineral (McWATERS, 1996). efeitos do estresse em situação de transporte de bovinos jovens suplementados com crômio, no desempenho, resposta imune e resistência a doenças. Foi observado um aumento nas concentrações de cortisol em decorrência do transporte e da relação neutrófilos/ linfócitos. Os autores concluíram, no trabalho, que a suplementação com crômio melhorou o ganho médio diário em peso dos animais, embora não afetasse de modo significativo a resposta imune.

Animais vacinados contra a doença respiratória bovina (IBR) e parainfluenza A vírus (PI-3), mostraram melhores respostas imunes naqueles animais suplementados com crômio (BURTON et al., 1994).

Arthington et al. (1997), pesquisaram a possível influência da suplementação com crômio em bovinos imunizados contra herpesvírus bovino-1(BHV-1), na produção de cortisol, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e anticorpos. Não foi comprovada alteração significativa nos parâmetros. Galyea et al. (1999), pesquisaram a possibilidade de interação entre saúde, resposta imune e nutrição em bovinos de corte, visando melhorar o desempenho produtivo destes animais. Para tanto, compararam a suscetibilidade de animais recém desmamados à doença respiratória bovina (BDR) e a suplementação com diversos microminerais tais como zinco, cobre,

selênio e crômio. Foi demonstrada uma melhora na resposta imune dos animais suplementados, contra a doença em questão.

Peres (2001), estudando a suplementação de crômio em ruminantes, concluiu que este microelemento mineral é necessário em pequenas concentrações para o metabolismo animal e que a sua possível ação esteja relacionada com o controle da tolerância dos animais à glicose e o seu efeito deve envolver o aumento da sensibilidade das células à ação da insulina. Para o autor, torna-se difícil recomendar a suplementação do crômio na dieta de bovinos, sugerindo, todavia, que a mesma possa vir a ser benéfica para a saúde e bem-estar dos animais durante os períodos de estresse.

2.3 Crômio orgânico *versus* crômio inorgânico

O crômio é um metal que ocorre em baixas concentrações no ar, no solo, na água e em todos os materiais biológicos. Foi descoberto em 1797 por Louis Vauquelin na forma de cromita (FeCr_2O_4), da qual o óxido de crômio (Cr_2O_3) pode ser obtido (ANDERSON, 1981). Do ponto de vista químico, o crômio tem número atômico 24 e peso atômico 51,996 $\mu\text{g/mol}$, sendo considerado elemento de transição (MERTZ, 1969).

O crômio é encontrado em quantidades apreciáveis na levedura de cerveja, assim como outros tipos de alimento para consumo humano e animal, tais como fígado, rim, pimenta, espinafre, açúcar não refinado e aveia integral. O conteúdo de crômio nos produtos refinados como açúcar, cereal e pães é sempre notadamente mais baixo do que os dos similares integrais, uma vez que o processo de refinamento remove mais de 80% do crômio natural (BURTON, 1995). O crômio, em forma de metal é produzido em larga escala, sendo amplamente empregado em ligas de ferro e com metais não-ferrosos, assim como na eletrodeposição. Em peso, é o vigésimo primeiro metal mais abundante da face da crosta terrestre, sendo obtido em duas formas, uma como metal puro e outra como ferrocromo. Este, constitui uma liga contendo ferro, carbono e crômio. Apresenta-se como CrO_3 – tri-óxido de crômio e Cr_2O_3 – dióxido de crômio (MERTZ, 1969). Os cromatos e dicromatos, podem ser cancerígenos, quando ingeridos em quantidades maiores (LEE, 1996).

A forma de administração do cromo usado como suplemento nutricional é muito importante para a sua absorção. Estudo em ratos, utilizando nove diferentes compostos de cromo em sua dieta, constatou que para alguns deles, incluindo a forma de cloreto de cromo, há muito pouca absorção do metal pelo tecido (ANDERSON et al., 1993).

O cromo é encontrado disponível, teoricamente, em todos os estados de oxidação de -2 a +6, mas é mais frequentemente encontrado em 0; +2; +3 e +6, dos quais o primeiro é biologicamente inerte (DUCROS, 1992). O cromo bivalente (Cr^{2+}), quando exposto ao ar troca para Cr^{3+} , por esta razão não é utilizado pelos sistemas biológicos.

Na forma hexavalente (Cr^{6+}), o cromo está ligado ao oxigênio na forma de cromato (CrO_4^{2-}) ou dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) com forte propriedade oxidante. Nesta forma, atravessa as membranas biológicas e, dentro das células reage com componentes protéicos e ácidos nucleicos, sendo reduzido para Cr^{3+} . A reação com o material genético é a base para as propriedades carcinogênicas do cromo hexavalente (MERTZ, 1992).

Já a forma trivalente (Cr^{3+}) é a mais estável forma de oxidação, na qual o cromo é encontrado em organismos vivos. Ele não atravessa facilmente as membranas celulares e é muito menos reativo. Por esta razão, o cromo trivalente é preferível, já que ela mostra forte tendência de formar compostos complexos, com pobre capacidade de reação. Nos organismos vivos, o cromo, preferencialmente, desempenha um papel mais estrutural do que do tipo enzimático (MERTZ, 1992). especial atenção é dada para a comparação entre as formas tri e hexavalente. Enquanto o cromo hexavalente há muito é reconhecido por suas propriedades tóxicas, a forma trivalente é observada pelos investigadores como menos prejudicial e até mesmo benéfica se usada em concentrações adequadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996).

Ambas as formas de toxicidade, a aguda e a crônica, são descritas para o cromo hexavalente, podendo ser irritante, carcinogênico, antigênico e corrosivo, quando absorvido em nível intestinal e pulmonar e, em algumas circunstâncias, também pela pele. Por outro lado, baseado em vários experimentos, é comumente aceito que o cromo trivalente tem muito baixa

toxicidade, sendo virtualmente não tóxico, especialmente se administrado na forma de compostos orgânicos, particularmente na forma de levedura (FLODIN, 1988).

Mowat et al. (1995), estabeleceram que a dose usualmente tóxica para o Cr^{3+} é da ordem de 1:10.000, sendo por isso mesmo um microelemento altamente seguro. De fato, ele tem toxicidade muito mais baixa que outros minerais listados, como o cobre, o zinco, o manganês e, especialmente, o selênio (LINDEMANN, 1996).

Para os estudos sobre a digestão de ruminantes, são utilizadas cânulas intestinal e abomasal, as quais estimam o fluxo e o desaparecimento dos nutrientes do rúmen. Embora este tipo de estudo possa ter vários objetivos, especialmente relacionados com a absorção de proteína e produção de energia, algumas conclusões podem ser extrapoladas para outros nutrientes (TYTGEMEYER, 1997).

Nestes trabalhos, o óxido de crômio é utilizado como marcador. Em extensa revisão de todos os experimentos deste tipo entre 1986-95, publicados no *Journal of Animal Science*, concluiu-se que: a) a recuperação fecal do marcador sempre apresentou um desvio de 100%, especialmente em criações a pasto; b) a recuperação fecal do óxido de crômio varia entre os animais e c) as concentrações fecais de óxido de crômio exibem grandes variações. Teste de absorção (TYTGEMEYER, 1997). Além disso, a disponibilidade de um princípio alimentar, a predisposição do mesmo de se tornar parte estrutural e/ou funcional do organismo. Alguns fatores exercem grande influência sobre a disponibilidade biológica de um nutriente, dentre os quais se destacam: natureza do alimento, composição e condições de equilíbrio na dieta, estado de conservação, flora microbiana do animal, estado geral de saúde do animal e momento fisiológico.

O crômio pode estar disponível na dieta como um composto inorgânico, ou na forma de complexos orgânicos. O crômio elementar, disponível por liberação ou contaminação é virtualmente não absorvível e não tem nenhum valor nutricional (DUCROS, 1992). A absorção do crômio trivalente em nível intestinal é sempre pobre e mostra uma relação inversamente proporcional

com a quantidade ingerida, variando de 2% no caso do consumo de 2 µg diários até 0,5% no caso de 40 µg diários (FLODIN, 1988).

Dentre as formas mais comuns de suplementação estão os minerais na sua forma iônica (cloretos, sulfatos, óxidos, hidróxidos, carbonatos) e outros sais. Todavia, algumas destas fontes, principalmente no caso de microelementos minerais, apresentam baixa disponibilidade biológica ou baixo metabolismo no organismo animal (SPEARS, 1989).

A biodisponibilidade dos elementos minerais é influenciada por fatores como: tamanho das partículas, solubilidade, reatividade, origem do precursor, grau de calcinação e ligantes orgânicos (HOUSE, 1999).

Em alguns casos, 98% do cromo inorgânico consumido pelo homem na alimentação não é absorvido, sendo eliminado pelas fezes (OFFENBAUCHER et al., 1986). Por outro lado, o cromo orgânico na alimentação pode ter biodisponibilidade na ordem de 25-30% (MOWAT, 1994).

Ng & Wilson (1997), estudaram a inclusão de óxido de cromo na dieta de peixe da espécie *Ictalurus punctatus*. Os resultados obtidos sugerem que o óxido de cromo não afeta a utilização da glicose pelo peixe, tornando evidente que o metal sob forma inorgânica é suficientemente inerte para ser usado como marcador de digestibilidade desta espécie aquática.

O cromo na sua forma trivalente, formando complexo com compostos orgânicos, tem uma absorção de 10 a 20% (ANDERSON, 1986). A presença de aminoácidos, ácido ascórbico, alto nível de açúcares, oxalato e aspirina na dieta aumenta a absorção de cromo, enquanto que fitatos e antiácidos reduzem-na (HUNT & STOECKER, 1996).

Os metais de transição, como é o caso do cromo, têm grande tendência de formarem íons complexos, os quais consistem de um átomo de metal central no qual vários ânions ou moléculas estão ligados. As ligações dos complexos podem ser desde fortemente covalentes a predominantemente iônicas (RUSSEL, 1982). A quelatação pode ser definida como um processo especial de complexo, formado entre um ligante e um íon metálico, sendo o produto final denominado *quelato* (SPEARS, 1996).

O crômio orgânico ou quelato é um composto formado por íons metálicos ligados a uma molécula orgânica como aminoácidos, peptídeos, ou complexos polissacarídicos, que proporcionam a estes íons alta disponibilidade biológica, alta estabilidade e solubilidade (MORAES, 2000).

Diversos trabalhos *in vitro* têm demonstrado que os minerais, sob a forma de sais inorgânicos, geralmente são ionizados no estômago e absorvidos no duodeno, onde o pH ácido proporciona a solubilidade necessária, sendo, depois, ligados a proteínas e incorporados pelas membranas celulares da mucosa intestinal. O transporte para o interior das células ocorre pela difusão passiva ou pelo transporte ativo (MORAES, 2000).

No caso de ocorrer reação com colóides insolúveis, ou competição com os sítios de absorção, poderá haver perdas consideráveis do mineral em questão (HERRICK, 1989). Já no caso do mineral quelatado, este é quimicamente inerte na molécula, não sendo afetado por íons metálicos livres.

Há evidências que sugerem que a suplementação de crômio seja feita, em ruminantes, quando o mineral estiver associado a uma partícula orgânica específica, ocasião em que apresentará maior atividade biológica e menor risco tóxico (BARUSELLI, 2000).

Os minerais quelatados são absorvidos no jejuno, atravessam as células da mucosa e passam diretamente para o plasma, ocorrendo a separação do aminoácido ligante no próprio local onde o mineral será utilizado (ASHMEAD, 2000). São características importantes dos compostos quelatados: *tamanho*, pequeno o bastante, para que os minerais ligados às moléculas carregadoras sejam facilmente absorvidas, sem perdas; *estabilidade*, cujas moléculas não sofram interações indesejáveis com outros compostos no trato digestivo; *neutralidade*, ausência de carga elétrica do composto final, evitando assim, interações com os demais componentes da dieta, podendo ser absorvido na forma original (ASHMEAD, 2000). Os quelatados de crômio apresentam melhores respostas nos experimentos de suplementação, uma vez que são similares aos compostos de crômio existentes na natureza e, por isso mesmo, melhores utilizados pelo organismo animal (MOWAT et al., 1993 ; CAZES, 1996).

Existem várias fontes de cromo orgânico, embora nem todas tenham sido testadas em animais de exploração zootécnica. As duas formas orgânicas de cromo mais pesquisadas são o cromo das leveduras e o picolinato de cromo. Estas duas fontes de cromo têm mostrado boas respostas de biodisponibilidade em trabalhos realizados com animais (LINDEMANN, 1996).

2.4 Deficiência de cromo

Embora não haja nenhum padrão preestabelecido para requerimento de cromo em bovinos de corte (GALYEAN et al., 1999), o National Research Council (1996) sugere que os resultados de recentes experimentos indicam a necessidade de suplementação com o metal em algumas situações.

A demanda de cromo pode variar por causa de mudanças ambientais, alterações no manejo e na dieta (KEGLEY & SPEARS, 1995). Existem certas situações que afetam ou reduzem o cromo nos animais e no homem. Duas destas situações, são a baixa disponibilidade do cromo nos alimentos e o efeito do estresse na excreção do cromo (CAZES, 1999).

O cromo é excretado pela urina e fezes, sendo que a excreção pela urina é a principal via (cerca de 80%) de eliminação do cromo injetado (MERTZ, 1969 ; ANDERSON et al., 1990). A excreção do cromo pode aumentar de 10 a 300 vezes nas situações de estresse ou se a dieta em açúcares for aumentada (BURTON, 1995)

Em humanos, a recomendação para ingestão de cromo está na média entre 33 - 200µg/dia (HUNT & STOECKER, 1996). Considerando que a alimentação moderna é feita frequentemente com produtos refinados, os quais apresentam menor teor deste metal, estima-se que 90% de americanos adultos consomem dieta deficiente em cromo, com cerca de 40 a 60% do requerimento diário (ANDERSON, et al., 1992 ; PARMIGIANI & MIDIO, 1994).

A deficiência de cromo em nível celular é de difícil avaliação, assim como o estabelecimento de sua exigência como elemento essencial, na dieta de ruminantes. Andriguetto et al. (1990), sugeriram que o requerimento de cromo é da ordem de 0,1ppm/animal/dia enquanto Nicodemo (2000), registra

que o consumo máximo de cromo para bovinos de corte, seria de 1000 ppm, sem contudo, especificarem qual categoria e a espécie animal.

Hayirli et al. (2001) suplementaram vacas de leite com cromo-metionina nas concentrações de 0,03, 0,06 e 0,12 ppm, avaliando o consumo de alimentos, produção de leite, ganho de peso e outros parâmetros metabólicos, antes e depois do parto. Os resultados mostraram que a suplementação não afetou as concentrações de triglicérides hepáticos, enquanto aumentou a ingestão de matéria seca e produção de leite no período pré e pós-parto. Além disso, melhorou a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose no pós-parto. Evans & Meyer (1992), demonstraram que o cromo pode ter influência sobre a longevidade de ratos. Estudos preliminares em ratos, mostraram que a longevidade aumentou em 25% quando o cromo foi suplementado na dieta dos animais em 1000 ppb (EVANS & MEYER, 1994).

A deficiência de cromo pode aumentar o risco de aparecimento de *Diabetes mellitus* (MERTZ, 1969) e doenças coronárias (SCHROEDER, 1968), além de aumentar o colesterol sérico (LDL) e triglicérides (RIALES & ALBRINK, 1981; MOSSOP, 1983)

Wright et al. (1994), registraram ótimos resultados na suplementação de bovinos com 0,14 ppm de cromo, submetidos a situação de estresse e vacinados contra a doença respiratória bovina, virose sincicial respiratória e pasteurelose. Os dados avaliados foram: ganho de peso, ingestão de alimentos e nível de cortisol. Burton et al. (1994), obtiveram resultados semelhantes com animais vacinados contra IBR e parainfluenza vírus -3.

Animais, antes do parto, podem apresentar aumento na concentração sanguínea de cortisol, fato que pode interferir na sua produção de anticorpos e o cromo tem demonstrado produzir melhor resposta imune, além de reduzir a glicose e concentração de cortisol no sangue destes animais (CAZES, 1999).

A suplementação com cromo melhora a resposta imune mediada por células, reduz a taxa de cortisol sanguíneo e aumenta a concentração de anticorpos em bovinos (KEGLEY et al., 1996; MALLARD & BORGES, 1997).

Evans (1989), verificou que a concentração de cromo nos tecidos, tende a ser mais baixa em áreas do mundo onde há uma maior incidência de

diabetes em humanos adultos, situação esta que respondeu bem à suplementação com cromo.

Como resultado da baixa disponibilidade do cromo na maioria das fontes orgânicas de alimento, há uma diluição do cromo corporal devido ao crescimento, resultando que uma percentagem da população humana e animal, irá apresentar, em idades avançadas, os sintomas de deficiência (LINDEMANN, 1996). O National Research Council (1989) recomenda para humanos a ingestão diária de 50-200 µg de cromo/dia, aceitando o pressuposto de que a média de absorção do cromo nos alimentos normais é de 0,5%, ou seja, quase que totalmente indisponível.

O estresse, oriundo de várias fontes, tem demonstrado interferir significativamente no processo de excreção do cromo. Em seres humanos, o exercício, a lactação, dietas com elevados teores de açúcar, processos infecciosos, traumatismos físicos, são alguns dos fatores que afetam o nível de cromo sob forma aguda ou crônica (ANDERSON, 1994). Além destes, a gestação e nível de proteínas nos alimentos também podem provocar pressão no limite de fornecimento do cromo (MERTZ & ROGINSKI, 1969).

Nos animais de produção, os fatores estressantes relacionados com a deficiência de cromo são: envelhecimento, manejo reprodutivo, altas densidades, transporte, infecções, manejo de desmame, confinamento e medicação, além de dietas inadequadas (LINDEMANN, 1996).

Situações de estresse de animais, tais como transporte, desmame e castração entre outras, podem ser amenizadas com a administração de cromo. Estudos realizados no Canadá, mostraram que a suplementação de cromo na dieta diminuiu significativamente os fatores de estresse em bovinos e reduziu a incidência de doenças respiratórias e a necessidade de antibioticoterapia (MOWAT, 1994). A suplementação com cromo não é efetiva em animais tratados com antibiótico (CHANG & MOWAT, 1992).

2.5 Cromo nos alimentos

É muito variável a quantidade de cromo nos alimentos destinados a humanos e animais e depende de alguns fatores como natureza e origem das

fontes nutricionais, processamento, tipo de contaminação ambiental, composição do solo (caso de plantas) e substrato de crescimento do microrganismo (especialmente leveduras). Em condições de estresse, a biodisponibilidade do cromo é muito baixa (MORDENTI *et al.*,1997).

De um modo geral, as dietas humanas não excedem a 0,5 ppm . O conteúdo de cromo nos cereais e batata gira em torno de 0.1 ppm, embora algumas amostras de milho exceda a 20 ppm (ADRIAN, 1991). A levedura é rica em cromo, ainda que a concentração deste microelemento dependa da natureza do substrato fermentado (ZETIC *et al.*,2001). A carne e os seus derivados têm um conteúdo constante e relativamente baixo de cromo, em média 0,15 ppm (MORDENTI *et al.*,1997). O açúcar e batata têm alta concentração de cromo, assim como vários frutos do mar, cereais integrais, queijos e centeio têm valores intermediários. O processo de refinação extrai o cromo junto com o germe e o farelo, enquanto que a refinação do açúcar separa o cromo em porções de melaço (ANDERSON & KOZLOVSKY,1985).

O conteúdo de cromo no leite tende a ser mais baixo na lactação, embora o colostro seja mais rico. O mineral se encontra ligado à gordura do leite e por isso o leite desnatado tem menos cromo que o leite integral, a manteiga e o queijo. A média no leite é da ordem de 0,015 ppm (ADRIAN, 1991). O ovo tem entre 0,005 e 0,02 ppm, sendo que a gema pode ter de 2 a 20 vezes mais (MORDENTI *et al.*,1997).

Bonomi *et al.* (1997), pesquisaram o conteúdo de cromo em setenta amostras de feno de alfafa, encontrando valores em torno de 0,70 mg/kg ou 0,7 ppm. O conteúdo de cromo em forragens é bastante variável, indo de apenas traços do elemento até 5 ou 10 ppm (Begliomini *et al.*, 1979). Fosfatos contêm de 60 a 500 ppm de cromo, com valor médio de 200 ppm (SULLIVAM *et al.*,1994), mas a biodisponibilidade do cromo de fosfatos é limitada. Em melaços, o conteúdo é de aproximadamente 2 ppm, daí o alto conteúdo de cromo em leveduras crescidas neste substrato (MORDENTI *et al.*,1997).

Sob condições normais, o conteúdo de cromo nos alimentos pode variar de 0,1 ppm nos cereais a 200 ppm nos fosfatos, como consequência rações completas ou suplementares podem mostrar diferentes concentrações

de cromo, dependendo da matéria-prima usada. Abundante literatura científica sobre microelementos minerais mostra que o cromo trivalente tem absorção muito baixa, alcançando valores de 0,5 a 3,0 %, se administrado na forma inorgânica. O cromo administrado sob forma de complexos orgânicos de leveduras ou ligados a compostos como proteinatos, picolinato, nicotinato ou disponível em rações de origem animal pode ser mais prontamente absorvido e a absorção será inversamente proporcional à quantidade consumida (FLODIN, 1988).

A concentração do elemento cromo é bem menor nos meios líquidos, sendo menor ainda em águas marinhas do que em águas fluviais (CHRISTIAN & FELDMAN, 1966).

Wallach (1985), demonstrou que o cromo tende a fazer parte de alguns tecidos como pele e anexos e, também alguns órgãos, como rins, fígado, ossos, baço e pulmões, sendo que o seu acúmulo em músculos é muito limitado ou inexistente, sugerindo que dietas ricas em cromo usadas na alimentação animal, não constitui qualquer risco para o consumidor.

2.6 Levedura de crômio

A adição de culturas de levedura na ração de animais, tornou-se prática freqüente nos últimos anos. Os benefícios proporcionados pelo seu uso são inúmeros, dos quais podemos citar: aumento da produção e da gordura no leite, aumento do pH ruminal, diminuição na produção de metano, aumento no número de microrganismos do rumem, aumento no número de bactérias celulolíticas e anaeróbicas (DAWSON & NEWMAN, 1987; WIEDMEIER et al. 1987; HARRISON et al., 1988 ; PIVA et al., 1989; WILLIAMS, 1989; WILLIAMS et al., 1991). Wiedmeier et al. (1987) observaram que o aumento do número e proporção de bactérias celulolíticas no rúmen, resulta em melhora da digestibilidade dos carboidratos.

Animais suplementados com culturas de levedura apresentaram aumento significativo na ingestão de alimentos, produção de leite, ganho de peso, produção de ácidos graxos voláteis, aumento na digestão e pH ruminal (RUF et al., 1953; PHILLIPS & VONTUNGE, 1985; MARTIN et al., 1989).

Arambel & Kent (1990) observaram que animais estressados apresentaram maior ingestão de alimentos , quando suplementados com culturas de levedura, em consequência de um aumento no número total de bactérias celulolíticas. Escobar et al. (1992), suplementaram com cultura de levedura (Yea-Sacc-Alltech), vacas de leite holandesas portadoras de cânulas no rúmen e duodeno. Eles analisaram o nitrogênio ruminal, ingestão de matéria seca, produção de leite e fermentação. Os resultados mostraram aumento na ingestão de matéria seca e produção de leite, todavia não observaram influência na composição do leite. Verificaram, também, aumento da digestibilidade da proteína e redução da produção de ácido láctico, apesar de não ocorrer alteração do pH. A síntese de aminoácidos tende a ser mais alta nos animais suplementados. Zhai et al. (2000) adicionaram cloreto de crômio em meio de cultura de *Saccharomyces cerevisiae* visando o estímulo para crescimento da levedura, além da produção de etanol. Extratos da cultura apresentaram o fator de tolerância à glicose (GTF), verificada pela acentuada produção de CO₂ no processo e aumento na utilização da glicose.

Os efeitos da suplementação com o uso de levedura, sobre parâmetros como aumento do pH ruminal, aumento da concentração de proteína, a fermentação no rúmen, redução da produção de metano, somados ao aumento do número total de microrganismos e bactérias celulolíticas, foram observados nos trabalhos realizados por Piva et al. (1993).

Chiquette (1995), realizou dois experimentos, utilizando culturas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*, sozinhas ou combinadas, como suplemento de bovinos de corte. Ele constatou aumento na produção de acetato, propionato e ácidos graxos totais, no rúmen daqueles animais. Morais e Sano (1991), verificaram diferentes níveis de suplementação com levedura de crômio em vitelos submetidos a estresse (transporte, aumento da densidade animal, restrição da alimentação e outros). Os níveis utilizados foram 0, 0,2, 0,5 e 1 ppm. Concluíram, que as mais altas concentrações de suplementação aumentaram significativamente, a taxa de crescimento, ingestão de matéria seca, redução de doenças e taxa de cortisol, mostrando ter ocorrido redução no estresse.

Sano et al. (1991), trabalhando com vacas de leite prenhes, estudaram a relação da resposta à insulina e suplementação com concentrações diferentes de crômio levedura (0,2-0,4 e 0,6 ppm). Um significativo aumento de resposta à insulina ocorreu com 0,2 e 0,4 ppm, mas este efeito foi perdido com 0,6 ppm. Segundo Venchikov (1974), este padrão de resposta não é incomum, já que as respostas biológicas e, em particular, a resposta aos microelementos, freqüentemente aumentam até um platô e podem até mesmo diminuir, com o aumento do estímulo dentro de sua zona biológica de ação.

A utilização de levedura na nutrição animal passou a ter interesse cada vez mais crescente, não só em razão de seu valor protéico, mas também pelos valores nutritivos agregados como: capacidade de alterar o padrão de fermentação ruminal, potencial de se combinar com patógenos entéricos, presença de mananos com ação antimicrobiana, capacidade de formar quelatos com minerais tornando-os mais biodisponíveis (MACHADO, 1997).

Segundo Machado (1997), as culturas de leveduras desidratadas produzidas no Brasil, são mortas por um processo de termólise, o qual leva ao

rompimento e destruição das células. Por outro lado, as culturas de levedura importadas apresentam-se como células vivas, já que não passam pelo referido processo industrial.

A cepa 1026, para uso industrial, descoberta em 1982, propiciou uma análise científica mais acurada de aditivos naturais do alimento, a qual, finalmente tornou-se possível depois de muitos anos, graças ao aparecimento da levedura padrão para alimentos. O Yea-sac 1026 é agora conhecido por estimular certas populações microbianas no rúmen e trato gastrointestinal, promovendo deste modo a digestão de fibras e removendo o ácido láctico da fermentação. A atividade resiste à peletização, podendo ser usado em combinação com ionóforos para estimular absorção (LYONS, 1997).

De acordo com Dawson (1993), a Yea-sac 1026 estimula o crescimento e a atividade de bactérias que degradam a fibra aumentando a produção de ácido acético e propiônico, além de estimular o crescimento de bactérias que ativam o ácido láctico. Estes eventos determinam a elevação do pH ruminal, proporcionando ambiente mais favorável para o desenvolvimento da microbiota em geral e um maior aproveitamento do nitrogênio da dieta, resultando em maior produção de energia e de proteína.

2.7 Imunização contra a raiva

A raiva é uma doença infecciosa conhecida desde a Antigüidade sendo que os primeiros relatos sobre a doença podem ser encontrado no Código Eshuma, da antiga Mesopotâmia, no ano 500 A.C. (STEELE, 1975). O agente etiológico da raiva é um vírus RNA, neurotrópico, grande, cilíndrico, em forma de bala de revólver, pertencente a família *Rabdoviridae*, gênero *Lyssavírus* (MARTIN & SEDMAK, 1983 ; MURRAY et al., 2002).

Inicialmente, os vírus rábicos foram classificados em quatro sorotipos: sorotipo 1 (*vírus de rua*) e três cepas vacinais, os sorotipos 2,3 e 4 (*lagos bat*, *mokola* e *duvenhage*). Algum tempo depois foram identificados, na Europa, mais dois genótipos: o 5 e o 6 (EBL 1 e EBL 2). Mais recentemente, foi identificado o sorotipo 7 na Austrália (HARPER et al. 1997).

A estrutura do vírus da raiva é composta por cinco proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz protéica (M), glicoproteína transmembrânica (G) e a polimerase (L) (ITO et al., 2001; MCGETTIGAN et al., 2003). A glicoproteína do envoltório viral é o único antígeno capaz de induzir a síntese de anticorpos anti-rábicos neutralizantes no hospedeiro (MURRAY et al., 2002), destacaram a participação da glicoproteína do vírus da raiva nas respostas celulares do hospedeiro, na produção de anticorpos, além de significativa função no mecanismo de patogenicidade.

A raiva é transmitida, exclusivamente, pelos mamíferos infectados, os quais constituem os únicos seres vivos susceptíveis ao vírus (INSTITUTO PASTEUR, 2002) e, circunstancialmente, por portadores inaparentes (DOMINGUES & LANGONI, 2001).

Com frequência, os morcegos hematófagos aparecem como os principais vetores do *Lyssavírus* para os herbívoros domésticos, na América Latina e no Brasil, principalmente o *Desmodus rotundus* (LARGHI & NEBEL, 1985; MATTOS et al., 1996; PASSOS et al., 1998; RODRIGUES DA SILVA et al., 2000). No Brasil são catalogados cerca de 140 espécies de quirópteros, dos quais, em 31 espécies já se isolou o vírus rábico, estando incluído neste número hematófagos, insetívoros, frugívoros e onívoros, fornecendo forte indicação de que todas as espécies de morcegos são transmissores em potencial do vírus, independente de seu hábito alimentar (SCHNEIDER et al., 1996; UIEDA et al., 1996; INSTITUTO PASTEUR, 2002).

O período de incubação da raiva depende de fatores como cepa do vírus, espécie do hospedeiro, tamanho do inóculo e, principalmente, da proximidade entre o local da inoculação e o sistema nervoso central. A variação deste tempo pode ser provocada pela retenção do vírus nos miócitos existentes no local de inoculação, de modo que o vírus pode permanecer no local da inoculação por dias e meses (MARTIN & SEDMAK, 1983; MURRAY et al., 2002). A penetração do vírus nos nervos periféricos pode também explicar um encurtamento no tempo de incubação após exposição e sua migração centrípeta rápida para o sistema nervoso central, sem prévia replicação em tecido não nervoso (MARTIN & SEDMAK, 1983).

Após inoculação subcutânea ou intradérmica, o vírus se multiplica localmente, migrando após alguns dias para o sistema nervoso central por meio dos nervos periféricos, radículas espinhais e medula espinhal, produzindo encefalite viral (SMITH, 1994; INSTITUTO PASTEUR, 2002). Ele infecta os nervos periféricos ao atravessar os fusos neuromusculares e neurotendinosos e, a progressão ao longo do nervo, acredita-se ocorrer nos espaços teciduais do fascículo nervoso (BAER, 1975).

A disseminação para o cérebro pode ocorrer por transporte passivo no líquido cérebro espinhal, nervos ou sangue (MARTIN & SEDMAK, 1983; MAYHEW & MACKAY, 1982 ; MURRAY et al., 2002). Ele pode se replicar nos miócitos do local de penetração, permanecendo indetectável por semanas e até meses, antes de se dirigir ao sistema nervoso central (MURRAY et al., 2002). Ao alcançar o sistema nervoso central, o vírus se espalha rapidamente por multiplicação nos neurônios do cérebro, da medula espinhal, do tronco simpático e nas células da glia (MARTIN & SEDMAK, 1983; MAYHEW & MACKAY, 1982 ; MURRAY et al., 2002). Após progredir de modo centrífugo até o nervo periférico pelo fluxo axoplasmático, ele se replica nos gânglios espinhais e raiz dorsal do nervo periférico correspondente (MAYHEW & MACKAY, 1982; MARTIN & SEDMAK, 1983; MURRAY et al., 2002).

Disfunções neurológicas poderão resultar em alterações comportamentais, além de anomalias variáveis dos nervos craniais e periféricos. Os sinais clínicos podem incluir perda multifatorial do funcionamento dos neurônios motores inferiores (SMITH, 1994).

O prognóstico da raiva é sempre fatal em todos os casos não tratados, representando por isso mesmo sério problema de saúde pública (INSTITUTO PASTEUR, 2002).

A raiva causa prejuízos econômicos consideráveis em bovinos destinados à produção de leite, carne e reprodução (ACHA, 1967 ; TUPINAMBÁ VALENTE & SIQUEIRA AMARAL, 1972 ; ALBAS, et al., 1995 ; ALBAS, et al., 1998 ; OLIVEIRA et al., 2000), sendo, em razão disso, considerada como uma das mais importantes zoonoses (MURRAY et al., 2002).

No Brasil, o número de casos da doença ainda permanece muito alto (SCHNEIDER et al.,1996 ; ALMEIDA et al., 1997). Bovinos e eqüinos são severamente afetados (PEIXOTO et al.,2000 ; OLIVEIRA et al.,2000). A maior preocupação ocorre com bovinos, pois estes animais ocupam a segunda posição em número de casos da doença, superados somente pela espécie canina (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES, 1989).

Estima-se mortalidade entre 30 a 40 mil bovinos/ano no Brasil, com prejuízo da ordem de 15 milhões de dólares (RODRIGUES DA SILVA et al., 2000 ; INSTITUTO PASTEUR, 2002), cifras que podem ser maiores, já que poucos casos suspeitos são encaminhados para diagnóstico laboratorial (MONTAÑO et al., 1987). Para a vacinação contra a raiva exista desde a segunda metade do século XIX, desenvolvida inicialmente por Pasteur (BIER, 1963 ; TURNER, 1984), no Brasil em 1999, em vários estados a raiva afetou 970 canídeos, 2.628 bovinos, 331 outros animais domésticos e 31 animais selvagens (UMEHARA et al., 2002). Mas et al. (1995), constataram ausência de resposta protetora, além de queda acentuada do título de anticorpos logo após a vacinação anti-rábica.

Em razão deste fato, diversos trabalhos têm sido realizados visando a obtenção de uma vacina mais eficiente e mais duradoura, além de esquemas vacinais mais adequados, nas regiões onde a doença ainda ocorre (ALBAS et al., 1998 ; ALBAS et al., 2002 ; ASPDEN et al., 2002 ; UMEHARA et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre agosto e dezembro de 2001, em colaboração com o Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu – SP, Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu – SP, Instituto Biológico de São Paulo, Secção de Presidente Prudente – SP e a propriedade “Estância Vieira de Leiria” – município de Mirante do Paranapanema – SP (Figura 1).

A propriedade de 146,4 ha, possui solo arenito Bauru, com altitude média de 432 m, latitude 22° 18” e longitude 51° 56” , regime pluvial de outubro a abril e período seco de maio a setembro.



Figura 1 – Vista parcial da pastagem de *Brachiaria decumbens* com animais do ensaio, na Estância Vieira de Leiria, Mirante do Parapanema – SP.

3.1. Formação dos grupos de animais

Os animais utilizados, novilhas, com idade entre 2 e 5 anos, com peso médio corporal de 300 kg, identificados por meio de brincos de PVC, mantidos em pastos de *Brachiaria decumbens*, água natural fornecida em caixas de concreto, com cochos cobertos para fornecimento do sal mineral. O sistema de manejo é o de cria extensivo para a produção de bezerros.

De um rebanho de 160 fêmeas, foram selecionados 75 animais, os quais foram divididos em grupos de 15 animais. Os animais de cada grupo foram separados em cinco pastos individuais, cuja gramínea foi analisada no período da seca e das águas, para verificação dos níveis de mineral existentes, assim como a água fornecida.

Os grupos receberam os seguintes tratamentos: O **Grupo GC**, não recebeu imunização contra a raiva e nem suplementação com levedura de crômio. O **Grupo GV**, recebeu imunização contra a raiva, mas não suplementação com levedura de crômio. O **Grupo GV + 8,5**, recebeu imunização contra raiva e suplementação com 8,5 ppm de levedura de crômio. O **Grupo GV + 17**, recebeu imunização contra a raiva e suplementação com 17 ppm de levedura de crômio. O **Grupo GV + 34**, recebeu imunização contra a raiva e 34 ppm de levedura de crômio. Todos os animais dos tratamentos GV + 8,5, GV + 17 e GV + 34 receberam 70 g de sal mineral adicionado de levedura de crômio, fornecido diariamente, durante todo o experimento (Figuras 2 e 3).

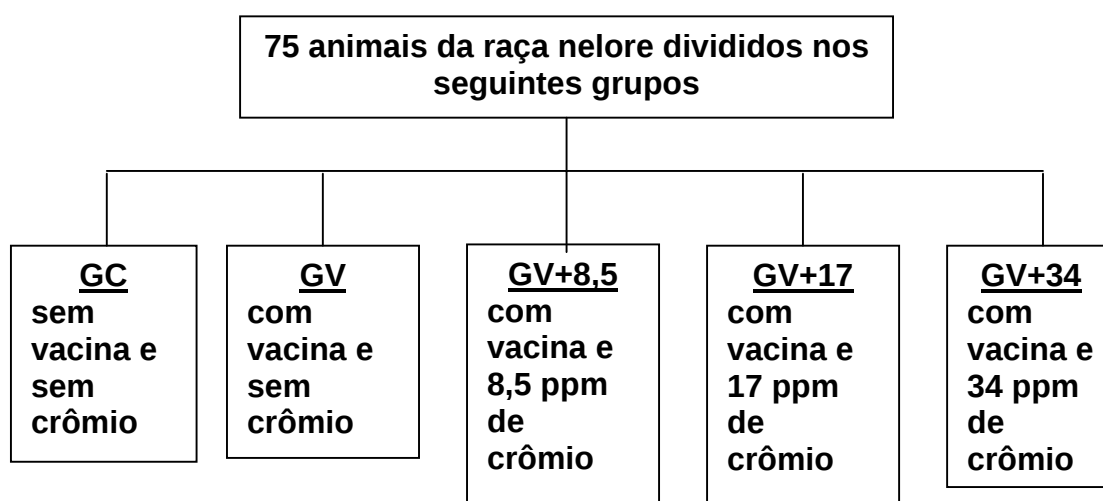


Figura 2- Organograma da distribuição dos grupos de animais

As colheitas de sangue ocorreram em: 22 de novembro de 2001 (início); 21 de dezembro de 2001 (trinta dias); 20 de janeiro de 2002 (sessenta dias); 19 de fevereiro de 2002 (noventa dias). Antes do início do experimento, foram realizadas análises de crômio nas pastagens e na água fornecida aos animais, bem como adaptação aos piquetes e à mistura mineral com levedura de crômio.



Figura 3 – Grupo de animais do ensaio aguardando a colheita de sangue.

3.2 Suplementação com crômio

A suplementação do crômio foi feita incorporando levedura de crômio ao sal mineral (Quadros 1 e 2). O mineral assim preparado, era distribuído em cochos cobertos, nos piquetes onde se encontravam os grupos de animais, na base de 70 g/cabeça, duas vezes/semana.

Foram desenvolvidas 03 fórmulas de suplemento mineral², contendo 60 g de fósforo/kg do produto, variando apenas na concentração do crômio. A fonte do crômio foi o produto Q-Factor III¹ que contém 1% do princípio ativo. Fórmula 1: 0,85 % de Q-Factor III (8,5 mg/kg de crômio) Fórmula 2: 1,70 % de Q-Factor III (17 mg/kg de crômio) Fórmula 3: 3,40 % de Q-Factor III (34 mg/kg de crômio)

¹ Alltech do Brasil

² Fort Sal Suplementos Minerai Ltda

Os animais do Grupo GV + 8,5 consumiram 70g/cabeça da fórmula 1 com 8,5 ppm de Cr, tendo, portanto, uma ingestão diária média de 0,595 mg de Cr/cabeça/dia. Os animais do Grupo GV + 17 consumiram 70g/cabeça da fórmula 2 com 17 ppm de Cr, tendo, portanto, uma ingestão diária média de 1,19 mg de Cr/cabeça / dia. Os animais do Grupo GV + 34 consumiram 70 g/cabeça da fórmula 3 com 34 ppm de Cr, tendo, portanto, uma ingestão diária média de 2,38 mg de Cr/cabeça/dia (Figura 4).



Figura 4 – Distribuição nos cochos do suplemento de cromo (Q-Factor III) adicionado ao sal mineral.

Quadro 1 – Níveis de garantia da mistura mineral fornecida aos animais do experimento (sal mineral). MS = matéria seca, NDT = nutrientes digestivos totais, PB = proteína bruta, Ca = cálcio, P = fósforo, Na = sódio, Mg = magnésio, S = enxofre, Cu = cobre, Zn = zinco, Fe = ferro e Mn = manganês, Co = cobalto, I = iodo, Se = selênio, Ni = níquel e Cr = crômio .

Nutriente	Unidade	Quantidade
MS	%	98,28
NDT	%	1,40
PB	%	0,32
Ca	g/Kg	30
P	g/Kg	60
Na	g/Kg	144
Mg	g/Kg	10,76
S	g/Kg	12
Cu	mg/Kg	1200
Zn	mg/Kg	4200
Fe	mg/Kg	4.733,59
Mn	mg/Kg	900
Co	mg/Kg	90
I	mg/Kg	130
Se	mg/Kg	22,5
Ni	mg/Kg	21
Cr	ppm	8,5 (GV + 8,5) 17 (GV+17) 34 (GV+34)

Quadro 2 – Níveis de garantia da levedura de crômio adicionada ao sal mineral, utilizada na suplementação dos bovinos durante o ensaio

Fonte de crômio	Q – FACTOR III
Composição básica	<i>Saccharomyces cerevisae</i> seco rico em Cr ³⁺
Níveis de garantia	1000 mg de Cr ³⁺ /kg por produto

3.3 Colheita de amostras

De todos os animais foram retiradas amostras de sangue, mediante punção jugular, com agulha 25 x 7¹, diretamente em tubo de 10 ml identificados com o número de cada animal. A colheita das amostras ocorreu nos dias 0, 30, 60 e 90. O sangue em tubos sem anti-coagulante, foi centrifugado para a obtenção de soro, o qual foi acondicionado em tubos “ependorf” de 1,5 ml, em triplicatas, identificados com o número do animal, o grupo a que pertencia e a análise a ser efetuada, sendo mantidos em “freezer” a – 20^o C (Figura 5).



Figura 5 – Colheita de sangue por meio de punção jugular.

3.4 Dosagem do Crômio no Soro

As amostras de soro, acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo, foram transportadas para o Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências – UNESP – *Campus* de Botucatu – SP, para análise do crômio. Para a determinação do crômio foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite² com corretor “Self-Reversal” para correção de fundo, amostrador automático, lâmpada de catodo oca de crômio, operando a 10 mA, no comprimento de onda de 357,4 nm.

¹ Vacutainer -BD

² Varian –modelo AA-800

Utilizou-se uma fenda de 0,5 nm, tubos de grafite recobertos piroliticamente e vazão de 3 L min⁻¹ de argônio com gás de purga, interrompido durante a etapa de atomização (etapa 6 do Quadro 3). Os volumes de amostra e de modificador químico *paladium* injetados no tubo de grafite foram de 10 µl. Os copos do amostrador automático foram previamente descontaminados em banhos de ácido nítrico a 10 % por 24 horas.

Foram utilizadas soluções estoques contendo 1000 mg L⁻¹ de crômio¹ e 2% m/u *paladium*² em 1% u/u de ácido nítrico, com pureza de 9,999%. Para a calibração do aparelho (Figuras 6 e 7) foram utilizados padrões a partir da solução estoque de 1000 µg/l na faixa de concentração de crômio entre 0 a 5,0 µg/ml. Todas as soluções foram preparadas com água purificada à 8 mΩ em sistema Milli - QR³.

Um volume de 1 ml de amostra foi diluída 5 vezes com água deionizada. Dessa solução, foi retirada uma alíquota de 1 ml e acrescentado 0,5 ml da solução de 100 mg/l de nitrato de *paladium* (modificador de matriz) acertando-se, em seguida, o volume para 5 ml, dando uma diluição final de 1:25. Utilizou-se como branco analítico uma solução aquosa contendo 10 mg/l de *paladium*. O programa de aquecimento utilizado está apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 – Programa de aquecimento para determinação de crômio. Volume injetado 10 ml da amostra + 10 ml de modificador de *paladium*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (seg.)	Leitura
1	120	20	Não
2	250	10	Não
3	700	10	Não
4	700	3	Não
5	2500	3	Não
6	2500	3	Sim

¹ Merk

² Aldrich



Figura 6 – Aparelho de espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (análise de crômio).



Figura 7 – Separação de soros para análises.

3.5 Dosagem do Cortisol¹

A análise do cortisol no soro foi realizada no Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu – SP. As concentrações séricas de cortisol foram mensuradas por radioimunoensaio (Figura 8) de fase sólida, utilizando-se kit comercial específico¹ para dosagem de cortisol. Pipeta-se 25 µl de cada amostra de soro, após descongeladas, em tubo de ensaio contendo anticorpo anti-cortisol, adicionando-se 1 ml de cortisol sintético marcado com I¹²⁵

O conteúdo é homogeneizado e os tubos colocados em banho-maria a 37° C durante 45 minutos, sendo decantados e os resíduos removidos com papel absorvente.

Os tubos são mantidos em temperatura ambiente por 12 horas e, após este tempo, realiza-se mensuração da radioatividade remanescente no seu interior por meio de contador gama, durante 1 minuto e, a partir da curva padrão, automaticamente calculadas as concentrações séricas de cortisol.

¹ Cortisol – Med-Lab®

Para a calibração neste trabalho, utilizou-se calibradores contendo 0 – 1,380 nmol/l de cortisol na forma líquida. O limite de detecção ou dose mínima detectável do ensaio foi cerca de 5,5 nmol/l e os coeficientes intra e interensaio de 17,6% e 16,1%, respectivamente.



Figura 8 – Dosagem de cortisol no soro por radioimunoensaio.

3.6 Mensuração da Resposta Imune Humoral

Vacina: foi utilizada a inativada, com as seguintes características:

A vacina¹ utilizada foi BGS-Cell contra raiva em herbívoros, formada por um suspensão de vírus rábico, cepa PV, replicado em células BHK-21, clone 13, inativado pela bromoetileinamine (BEI) e adsorvido em hidróxido de alumínio. Partida n ° 007/99 com valor antigênico $10^{8.08}$ aferido pelo Teste de Habel (HABEL, 1996). Este teste é realizado pelo laboratório de Referência Animal – LARA, Ministério da Agricultura, Campinas, SP, Brasil.

Vírus: o vírus empregado na prova de soroneutralização foi constituído de uma suspensão a 20% de cérebro de camundongos (WILBUR & AUBERT, 1996) infectados com vírus rábico fixo amostra CVS (Challenge Vírus Standard)², replicado recentemente³. Posteriormente, foi liofilizado e mantido à temperatura de – 20°C até o momento de uso.

¹ Lab. Hertape Ltda – Belo Horizonte-MG

² Lab.de Referência Animal-LARA – Campinas-SP

³ Lab. Bio Vet- S.A . – Vargem Grande-SP

Soros: foram inativados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e mantido à temperatura de – 20°C, em alíquotas de aproximadamente 2,0 ml até o momento de uso.

Teste de Soroneutralização em Camundongos (SN): este é um teste “*in vivo*” (Figuras 9 e 10) desenvolvido por Fitzgerald (1996), que utiliza camundongos suíços, albinos, no peso de 14 a 16 g. Consiste na neutralização, utilizando-se uma série de diluições de soros, mesclada com uma dose constante de vírus previamente titulado. Pode ser usado para titular qualquer tipo de soro que contenha anticorpos anti-rábitos. Neste trabalho foram utilizadas diluições múltiplas de 5 (1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125). Para cada diluição de soro, foi agregada uma diluição fixa do vírus, de forma a conter, em média 31,6 doses letais 50 (DL₅₀). As misturas vírus-soro foram colocadas em estufa a 37°C, durante 90 minutos e, a seguir, cada uma delas foi inoculada pela via intracraniana, na dose de 0,03 ml por animal, em cinco camundongos por diluição. Adotou-se tratamento igual para o controle do vírus. Neste caso a suspensão de vírus foi submetida a diluições decimais, misturando-se a seguir, com igual volume de diluente, e da mesma forma, estas diluições também foram incubadas e, posteriormente, inoculadas em camundongos na mesma via e dose acima citadas. Durante as inoculações as referidas misturas foram mantidas em banho de gelo.

Os animais inoculados foram observados diariamente durante 14 dias. Foram registradas, para efeito de interpretação das provas, as mortes ocorridas a partir do quinto dia, precedidas da sintomatologia característica (paralisia das patas e tremores). Os títulos dos soros e do vírus controle foram calculados por meio do método de Reed & Muench (1938). Foi considerado reagente, o soro que apresentou título $\geq \log_{10} = 0,69$, significando que a diluição 1:5 protegeu 50% dos camundongos inoculados.

Diluente: o diluente, tanto para os soros, como para a suspensão viral, foi composto de água destilada acrescida de 2% de soro normal de cavalo contendo antibióticos (1.000 unidades de penicilina e 1, 25 miligramas de estreptomicina por mililitro).

Camundongos: para o teste de soroneutralização foram utilizados camundongos suíços albinos, de ambos os sexos, pesando de 14 a 16 gramas, com

idade aproximada de 30 dias, do biotério do Instituto Butantan, SP, Brasil.



Figura 9 – Inoculação intracerebral em camundongo albino.



Figura 10 – Camundongos albinos para teste de soroneutralização.

3.7 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa *software* computadorizado Microcal (TM) Origin 6,0 Profissional. Os títulos (N) individualizados em $\log_{10}$, foram expressos em $\log_{10}(\text{SN})+1$ e o teste ANOVA – *Análise de Variância*, avaliou a possibilidade de haver diferenças significativas entre os Grupos e entre os dias 0, 30, 60 e 90.

Para a comparação do efeito da adição do cromo nos 05 tratamentos sobre os valores de SN, foram ajustadas regressões do segundo grau, polinomiais (situação dos pares de dados, resultados das leituras dos títulos de SN de bovinos vacinados com vacina anti-rábica de uso comercial, após transformação logarítmica $\log_{10}(\text{SN}+1)$, em função do tempo- dias de colheita de amostras de soro).

Para a comparação das concentrações de cromo nos 05 tratamentos, foram ajustadas regressões lineares simples (situação dos pares de dados, resultados da concentração de cromo no soro de bovinos, em função do tempo), por meio do coeficiente angular e linear da mesma (OSTLE & MESING,1975).

Para a comparação do efeito das concentrações de cromo nos 05 tratamentos foram ajustadas regressões lineares simples (situação dos pares de dados, resultados da concentração de cromo no soro de bovinos, em função do tempo), por meio de coeficiente angular e linear da mesma (OSTLE & MESING, 1975).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comparação entre os títulos de SN dentro dos grupos

A soroneutralização antes da primovacinação foi realizada para a certificação de que os animais não possuíam anticorpos anti-rábicos, quer por contato com o vírus, quer por vacinações que precederam o ensaio.

Para a avaliação da eficácia da vacina anti-rábica, os laboratórios de referência utilizam a Unidade Internacional (UI) para mensuração dos títulos séricos, os quais são obtidos pela comparação com soro anti-rábico padrão. Títulos iguais ou acima de 0,5UI, após vacinação, são considerados bons indicadores da resposta imune contra a raiva, conferindo proteção segura contra a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Abaixo desse valor, recomenda-se doses de reforço até que o título mínimo seja alcançado. O teste de soroneutralização (SN) em camundongos (ATANASIU, 1973) modificado por FITZGERALD (1996), foi escolhido por ser recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

No caso da SN, entende-se por título protetor de um soro, a recíproca da diluição que protege 50% dos camundongos inoculados via intracerebral. Nesse experimento, foram considerados reagentes as amostras de soros que apresentam títulos $>$ que 5 ou $\log_5 = 0,69$, significando que a diluição 1:5 protege 50% dos camundongos inoculados com vírus.

Considerando-se que o título mínimo para a proteção contra a raiva é 0,69, pode-se observar (Tabela 1e Figura 11) que, dos grupos, apenas o grupo GV+34 expressa título protetor após 90 dias da vacinação.

Tabela 1- Comparação entre as médias dos títulos dos anticorpos neutralizantes transformados pela equação $\log_{10} = (SN+1)$ obtidos nos diferentes tratamentos em diferentes momentos

Grupo	Dia após a vacinação		
	30	60	90
GV–GV+8,5	0,51 – 1,30	0,78 – 0,79	0,37 – 0,36
GV–GV+17	0,51 – 1,78	0,78 – 1,08	0,37 – 0,66
GV–GV+34	0,51 – 1,40	0,78 – 0,97	0,37 – 0,80
GV+8,5–GV+17	1,30 – 1,78*	0,79 – 1,08	0,36 – 0,66
GV+8,5–GV+34	1,30 – 1,40	0,79 – 0,97	0,36 – 0,80*
GV+17–GV+34	1,78 – 1,40	1,08 – 0,97	0,66 – 0,80

* Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$)

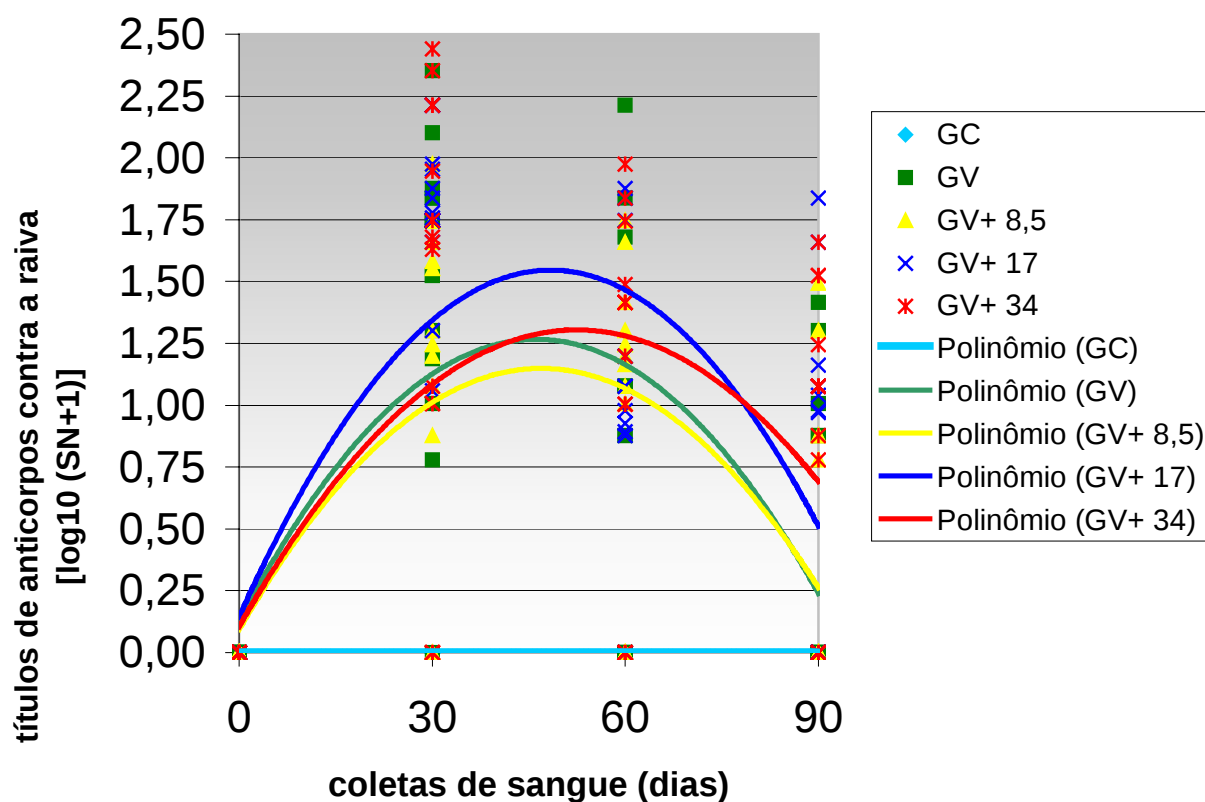


Figura 11 – Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes transformados pela equação $\log_{10} (SN+1)$ após a primovacinação contra a raiva.

Os parâmetros das regressões estabelecidas dos títulos de soroneutralização são encontrados na Tabela 2.

Tabela 2 –Cálculos das Regressões dos Títulos de Soroneutralização (SN) transformados logaritmicamente pela Equação $\log_{10} (SN + 1)$. **Grupo GC** (sem vacinação e sem cromo), **Grupo GV** (com vacinação e sem cromo), **Grupo GV+8,5** (com vacinação e com 8,5 ppm de cromo), **Grupo GV+17** (com vacinação e com 17 ppm de cromo), **Grupo GV+34** (com vacinação e com 34 ppm de cromo)

PARÂMETROS					
GRUPOS	Intercepto	Coeficiente bx	Coeficiente bx ²	r ²	P
GC	–	–	–	–	P<0,0001
GV	0,12597	0,04944	-0,00053535	0,39165	P<0,0001
GV+8,5	0,09297	0,04497	-0,000478705	0,3815	P<0,0001
GV+17	0,14373	0,058	-0,000598887	0,48545	P<0,0001
GV+34	0,10457	0,04573	-0,000435741	0,30981	P<0,0001

Comparando-se as médias dos títulos de SN, grupo a grupo, verifica-se que decorridos 30 dias da primovacinação, ocorre diferença entre os títulos dos animais do Grupo GV+8,5 (8,5 ppm de Cr) e os animais do Grupo GV+17 (17 ppm de Cr).

A comparação entre as médias dos títulos de SN após 30 dias da primovacinação, mostra redução progressiva dos títulos de anticorpos, corroborando ALBAS et al., (1995) ; OLIVEIRA et al., (2000) e RODRIGUES et al., (2000), sugerindo a necessidade de reforço na vacinação.

É esperada a redução progressiva dos títulos de anticorpos, decorrido algum tempo após a exposição ao estímulo antigênico, como observado no trabalho. Essa redução, segundo Chang & Mowat (1992) ; Burton et al. (1993) ; Bauer (2000), seria agravada, caso a vacinação ocorresse sob condições estressantes.

É justamente neste padrão de resposta imune, que o crômio poderia desenvolver papel modulador da resposta, minimizando os efeitos deletérios do estresse sobre o animal e, conseqüentemente, melhorando as condições de produção de anticorpos (BURTON, *et al.*, 1993 ; MOONSIE - SHAGEER & MOWAT, 1993 ; BURTON, 1994; KEGLEY & SPEARS, 1995 ; WRIGHT et al., 1995).

Na figura 10 fica evidenciado que apenas o grupo GV+34 (vacinado +34 ppm de crômio), mantém título protetor até 90 dias após vacinação, prolongando desta forma o período de revacinação em relação aos outros grupos estudados.

A suplementação de bovinos com concentrações mais elevadas de crômio, pode proporcionar um maior tempo de imunidade, como acontece nesse experimento aos 90 dias e, conseqüentemente, maior resistência, embora outros trabalhos não tenham conseguido mostrar influência positiva do crômio sobre a resposta imune (ARTHINGTON et al., 1997; KEGLEY *et al.*, 1997).

A persistência do título protetor contra a raiva, nos animais suplementados com maior concentração de crômio até os 90 dias, oferece uma expectativa otimista para o produtor, que busca segurança e economia na prevenção dos rebanhos contra possíveis epizootias.

4.2 Dosagem das concentrações de crômio no soro.

A Tabela 3 mostra os valores médios das concentrações séricas de crômio, nos diferentes grupos estudados.

Tabela 3 - Médias das concentrações de crômio nos soros (ppb) nos diferentes tratamentos em diferentes momentos

Grupo	Dia após a vacinação			
	0	30	60	90
GC	11,1	11,2	12,2	18,2
GV	10,2	11,8	12,5	19,3
GV+8,5	11,3	11,8	12,6	20,9
GV+17	9,8	11,9	14,3	18,9
GV+34	9,4	12,7	23,0	16,9

Na figura 12, são expressas as médias das concentrações séricas de crômio.

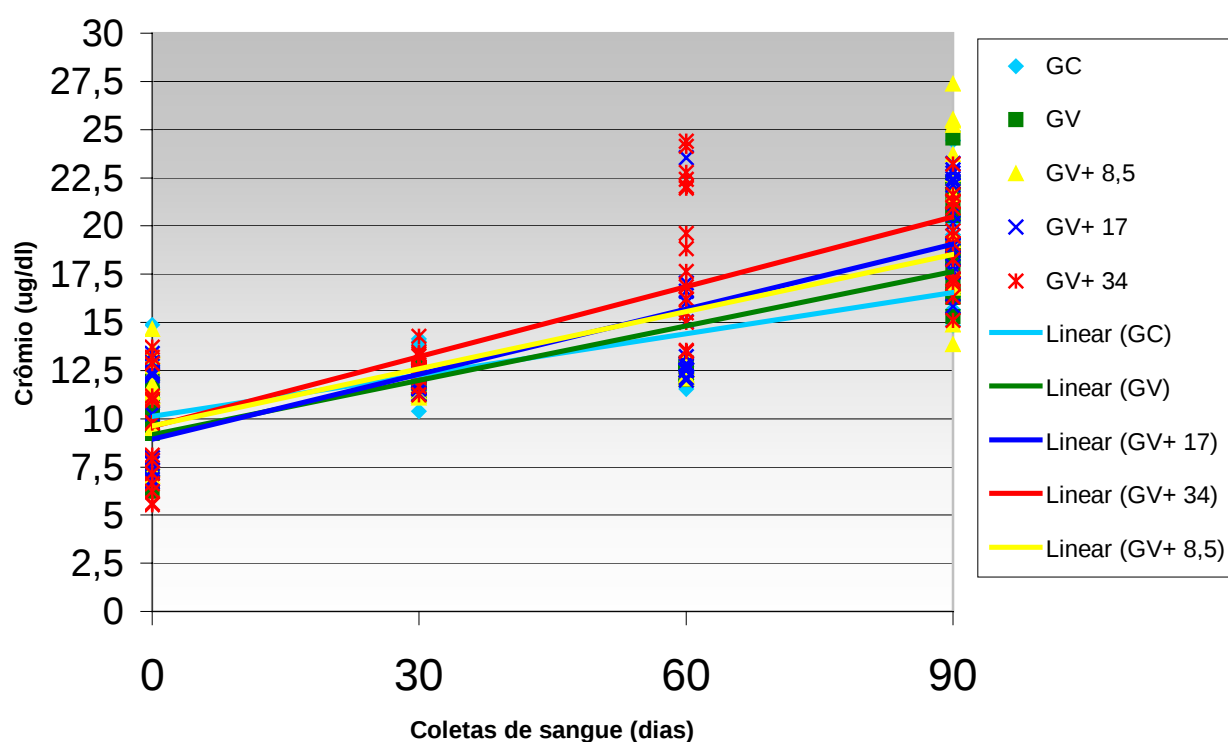


Figura 12 – Médias das concentrações séricas de crômio (ppb) nos animais dos diferentes grupos e nos diferentes momentos.

Os parâmetros das regressões estabelecidas das concentrações séricas de crômio são encontradas na Tabela 4.

Tabela 4 –Cálculos das Regressões das Concentrações de Crômio nos Soros de Bovinos dos Diferentes Grupos. Grupo GC (sem vacinação e sem crômio), Grupo GV (com vacinação e sem crômio), Grupo GV+8,5 (com vacinação e com 8,5 ppmde crômio), Grupo GV+17 (com vacinação e com 17 ppm de crômio), Grupo GV+34 (com vacinação e com 34 ppm de crômio).

PARÂMETROS				
GRUPOS	Intercepto	Coeficiente bx	r ²	P
GC	10,121	0,014	0,5624	P<0,0001
GV	9,1771	0,094	0,6846	P<0,0001
GV+8,5	9,6363	0,09898	0,5223	P<0,0001
GV+17	8,9398	0,1125	0,6963	P<0,0001
GV+34	9,5591	0,1209	0,6676	P<0,0001

A análise estatística dos resultados, pelo método de comparação de retas entre si (OSTLE & MESSING, 1975), demonstra não haver diferenças significativas entre os diversos tratamentos. A adição de crômio na dieta não altera os níveis séricos de crômio.

Os valores de crômio séricos encontrados no trabalho, são compatíveis ou próximos com os valores de literatura, os quais apresentam grande variabilidade. Segundo MERTZ (1969), os valores médios se situam entre 10 e 440 ppb, para o homem e animais.

MORDENTI et al. (1997), registram os valores de concentração de crômio sangüíneo entre 5 e 50 ppb, em razão de sua baixa absorção e baixa biodisponibilidade, especialmente nas situações de estresse, quando aumenta em muito a excreção urinária do metal. Por outro lado, a deficiência de crômio em nível celular é de difícil avaliação, assim como o estabelecimento da sua exigência por

parte dos ruminantes, já que são inúmeros os fatores que interferem com a biodisponibilidade.

Em condições normais ele é encontrado em concentrações muito baixas nos tecidos e no sangue (MERTZ, 1969). Nas situações de estresse é que a exigência do mineral aumenta, sendo a forma trivalente preferida para a sua suplementação, por aumentar a sua biodisponibilidade (MERTZ, 1992).

Nesse experimento, o crômio foi adicionado à cultura de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Yea-Sacc 1026 cuja recomendação de inclusão é de 10 g / cabeça /dia. Neste nível de inclusão, o efeito da levedura não pode ser como uma fonte de proteína e sim como metabólico.

4.3 Dosagem das concentrações de cortisol no soro

Foram realizadas análises sorológicas das amostras para detecção das concentrações sanguíneas de cortisol, nos dias 0, 30, 60 e 90, após a primovacinação contra a raiva. As médias das concentrações de cortisol são demonstradas na Tabela 5 e Figura 13.

Tabela 5 – Médias das concentrações de cortisol ($\mu\text{g/ dl}$) nas amostras de soros dos diversos tratamentos em diferentes momentos.

Grupo	Dia da vacinação			
	0	30	60	90
GC	8,96	8,28	7,92	4,94
GV	6,02	6,60	4,89	3,90
GV+8,5	6,39	6,63	8,02	6,51
GV+17	5,91	7,01	5,64	5,28
GV+34	7,91	8,73	5,69	6,78

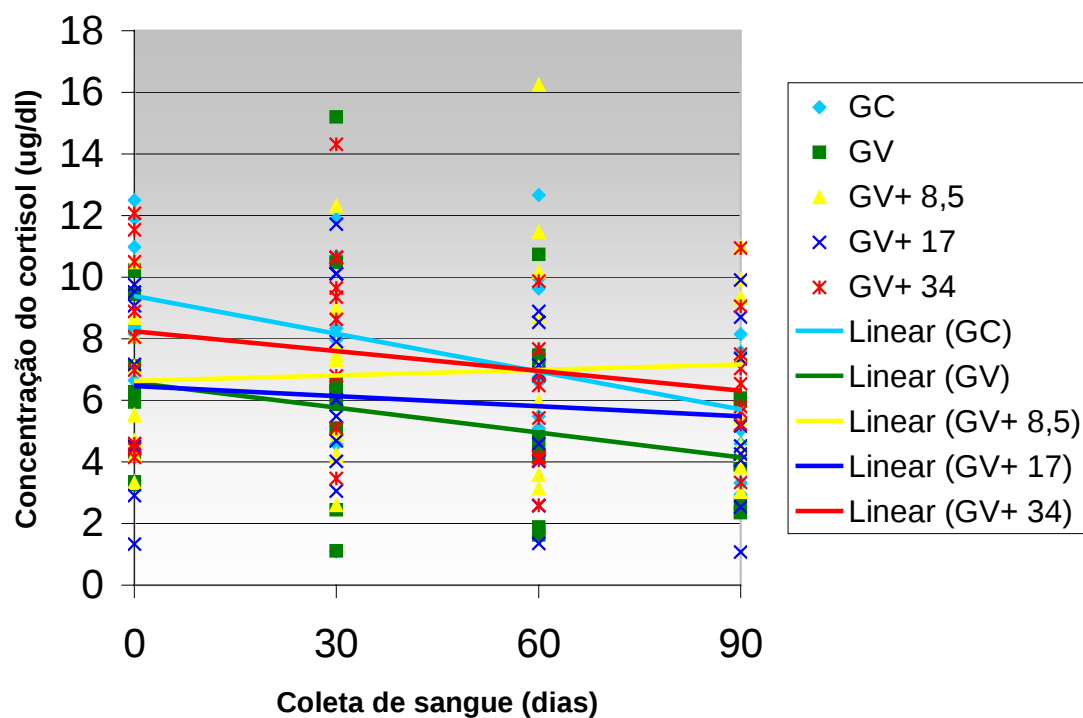


Figura 13 – Médias das concentrações de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) nas amostras de soros dos diversos tratamentos em diferentes momentos.

Os parâmetros das regressões estabelecidas das concentrações séricas de cortisol são encontradas na Tabela 6.

Tabela 6 –Cálculos das Regressões das Concentrações de Cortisol nos Soros de Bovinos dos Diferentes Grupos. Grupo GC (sem vacinação e sem crômio), Grupo GV (com vacinação e sem crômio), Grupo GV+8,5 (com vacinação e com 8,5 ppm de crômio), Grupo GV+17 (com vacinação e com 17 ppm de crômio), Grupo GV+34 (com vacinação e com 34 ppm de crômio)

PARÂMETROS				
GRUPOS	Intercepto	Coeficiente bx	r ²	P
GC	9,3813	0,0409	0,2126	P<0,0001
GV	6,5707	0,027	0,0916	P<0,0001
GV+8,5	6,6294	0,00059	0,0041	P<0,0001
GV+17	6,4558	0,109	0,0168	P<0,0001
GV+34	8,2125	0,0234	0,0641	P<0,0001

Os valores normais médios de cortisol em bovinos de raça zebuina, citados na literatura, são da ordem de 3.16- 3,29 µg/dl (ARAGÓN et al., 2001); 3,29 µg/dl (ARAGÓN VÁSQUEZ & HERREIRA, 2003 ; CHANG & MOWAT, 1992; MOONSIE SHAGEER, 1993), 2,07- 3,81 ng/ ml (HOPSTER et al., 1999).

A Figura 12 mostra valores de cortisol muito altos no início do experimento, fato justificado pelo temperamento agressivo demonstrado pelos animais. Com o decorrer do experimento, os animais foram se adequando ao manejo, permanecendo mais tranquilos em relação às fases iniciais do ensaio.

O estresse a que foram submetidos os animais durante o experimento, foi causado pela caminhada no percurso entre os pastos e o brete, pela sua contenção e punção da jugular durante a colheita de sangue. HOPSTER et al. (1999), verificaram em repetidas punções na jugular de bovinos de leite, um aumento nas concentrações séricas de cortisol.

Analisando a Figura 13, verifica-se que os animais dos diferentes grupos expressam concentrações de cortisol que variam de 5,91 a 8,96 ug/dl no início do experimento (porém, com valores acima daqueles encontrados na literatura), as quais decrescem de 6,78 para 4,94 ug/dl, após 90 dias.

O nível de cortisol não varia durante o experimento, sugerindo que a adição de crômio não influencia nos níveis séricos de cortisol, resultado que corrobora KEGLEY & SPEARS (1995), os quais, trabalhando com bovinos sob condições de estresse e suplementados com crômio, não detectaram qualquer diferença significativa nos valores de cortisol entre os dias 7 e 35 da suplementação.

Conflita, todavia, com Chang & Mowat (1992) e Moonsie-Shageer & Mowat (1993), que encontraram significativa diminuição do cortisol sérico em bovinos submetidos ao estresse e recebendo suplementação com crômio, embora essa diminuição fosse detectada muito tempo depois da indução do estresse.

Estes resultados sugerem que as respostas ao estresse, são dependentes de inúmeras variáveis, incluindo o tipo de estresse, a sua duração e o temperamento dos animais submetidos a ele.

No presente trabalho, como não ocorre resposta significativa nos valores de cortisol, pode-se pensar que a persistência do título de SN no grupo GV+34 ocorre independentemente do estresse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A . K. A reassessment on the mechanisms of antigen specific T cell-dependent B cell activation. **Immunology Today**, 9:89-94, 1998.

ADA, G. The immunological principles of vaccination. **Lancet**, 335:523-526, 1990.

ACHA, P.N. Epidemiologia de la rabia bovina paralitica y de la rabia del murciélago. **Bull off Int. Epiz.**,1967.

ADRIAN, J. Le chrome des produit alimentaires: origines et teneurs. **Science des Aliments**, 11:417-464, 1991.

ALBAS, A . ; ALBERTI, A . ; ALBERTI, A . L.L. ; PARDO, P.E. GIOMETTI, J. Ausência de resposta imune em bovinos vacinados contra raiva na região de Presidente Prudente, SP, Brasil. **A Hora Veterinária**, n.15, p.64-66, 1995.

ALBAS, A . ; PARDO, P.E. ; GOMES, A . A . B. ; BERNARDI, F. ; ITO, F. H. Effect of a booster-dose of rabies vaccine on the duration of virus neutralizing antibody titers in bovines. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, n.31, p.367-371, 1998.

ALBAS, A . ; PARDO, P.E. ; GIOMETTI, J. ; BERNARDI, S. ; ITO, F. H. Evaluation of neutralization test in mice (MNT) using effective dose 50 (ED50) and International Units (IU) on bovines sera vaccinated with in inactivated rabies vaccine. **Revista Brasileira de Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, v.9, p.86-88, 2002.

ALMEIDA, M.F. ; AGUIAR, E. A . C. ; MARTORELLI, L. A . F. ; PRESOTTO, D. ; BRANDÃO, M. M. ; PEREIRA, O . A . C. ; Resposta imune humoral de cães à vacina inativada de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.31,n.5, São Paulo, 1997.

ANDERSON, R.A . Nutricional role of chromium. **The Science of the Total Environment**, v.17, p. 13-29, 1981.

ANDERSON, R.A . Chromium metabolism and its role in disease processes in man. **Clin. Physiol. Biochem.**, v.4, p.31, 1986.

ANDERSON, R.A . Chromium. In: SMITH, K. (Ed). **Trace Minerals in Foods**. Marcel Dekker Inc., New York, p.231-247, 1988.

ANDERSON, R.A . Stress effects on chromium nutrition of humans and farm animals. In: LYONS, T.P.; JACQUES,K.A . (Eds). **ALLTECH`S ANN.SYMP. Proceedings**. Nottingham University Press, Loughborough, p.267-274, 1994.

ANDERSON, R.A .; BRYDEN, N.A .; POLANSKY, M.M. ; REISER, S. Urinary chromium excretion and insulinogenic properties of carboydrates. **Am. J. Clin. Nutr.** 51, p. 864-868, 1990.

ANDERSON, R.A .; BRYDEN, N. A .; POLANSKY, M.M. Dietary chromium intake. **Biol. Trace Element.Res.** 32: p. 117-121, 1992.

ANDERSON, R.A .; BRYDEN, N.A .; POLANSKY, M.M. Form of chromium affects tissue chromium concentration. **FASEB J.**, 7: A204, 1993..

ANDERSON, R.A . ; KOZLOVSKY, A . S. Chromium intake, absorption, and excretion of subjects consuming self-selected diets. **Am J. Clin. Nutr.**, v.41, p. 1117, 1985.

ANDRIGUETTO, J. M. ; PERLY, L. ; MINARDI, I. ; GEMAEL, A . ; FLEMMING, J.S. ; ALVES DE SOUZA, G. ; BONA FILHO, A . **Nutrição Animal**. 4ª ed. São Paulo, Editora Nobel, 1990, v.1.

ARAGÓN, V. E. F. ; GRAÇA, D. S. ; NORTE, A . L. ; SANTIAGO, G. S. ; PAULA, O . J. Suplementação com cromo e desempenho reprodutivo de vacas zebu primíparas mantidas a pasto. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** , v. 53, n. 5, Belo Horizonte, 2001.

ARAGÓN, V. E. F. ; HERRERA, A . del P. N. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio,e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n.4, p. 743- 747, 2003.

ARAMBEL, M. J. ; KENT, A .B. Effect of yeast culture on nutrient digestibility and milk yeld digestibility in early to midlactation dairy cows. **Journal Science**, v.73, p. 1560-1563. 1990.

ARTHINGTON, J.D.; CORAH, L. R. ; MINTON, J. E.; ELSASSER, T.H.; BLECHA, F.. Supplemental dietary chromium does not influence ACTH cortisol or immune responses in young calves. **Journal of Animal Science**, v.75, n.1, p.217-223, 1997.

ASHMEAD, S. D. Comparison of the rates of vitamin degradation when mixed with metal sulphates or metal amino acid chelates. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 875-884, 2000.

ASPDEN, K. ; VAN DIJK, A. A. ; BINGHAM, J. ; COX, D. ; PASSMORE, J.A.; WILLIAMSON, A .L . Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle. **Vaccine**, v. 20, p.2693-2701, 2002.

ATANASIU, P. Quantitaive assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin. **WHO Monogr. Ser.**, v. 23, n. 314, 1973.

BAER, G. M. Bovine paralytic rabies and rabies in vampire bat. In: BAER, G. M (Ed.) **The Natural History of Rabies**. New York, Academic Press, p. 155-175, 1975.

BARUSELLI, M.S. Minerais orgânicos: o que são, como funcionam e vantagens do seu uso em ruminantes. In: Simpósio Internacional de Patologia Clínica Veterinária, 2. **Anais**. Botucatu: UNESP/FMVZ, 2000, p.2-19.

BAUER, M.E. Estresse: como ele abala as defesas do corpo? **Ciência Hoje**, v. 30, n.179, p. 20-25, 2002

Begliomini, A . ; Camilli, F. ; Morcerllini, M. ; Morozzi, A . Composizione chimica e valore nutritivo delle principali foraggere coltivate in Umbria e grado di contaminazione delle stresse da pesticidi e metalli pesanti. **Zoot. Nutr. Anim.** v.5, p. 495-500, 1979.

Bier, O .G. **Microbiologia e Imunologia**. Ed. Melhoramentos, São Paulo, 1963.

Blecha, F. ; Minocha, H.C. Suppressed lymphocyte blastogenic responses and enhanced in vitro growth of infectious bovine rhinotracheitis virus in stressed feeder calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.44, p.2145, 1983.

Bonomi, A . ; Zambini, E. M. Bonomi, B. A . ; Guareschi, G. Ricerche ed osservazioni sul contenuto di cromo nei foraggi prodotti nell'agro parmense. **In Press**. 1997.

Brown, R.O . ; Forloines-Lynn, S.; Cross, R. E. ; Heizer, W. D. Chromium deficiency after long-term total parenteral nutrition. **Dig. Dis. And Sci.**, v.31, p.661, 1986.

Burton, J.L. Supplemental chromium : its benefits to the bovine immune system. **Animal Feed Science and Technology**, v.53, n.2, p.117-131, 1995.

Burton, J.L.; Mallard, B.A . ; Mowat, D. N. Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p.1532-1539, 1993.

BURTON, J.L.; MALLARD, B. A . ; MOWAT, D. N.. Effects of supplemental chromium on antibody responses of newly weaned feedlot calves to immunization with infectious bovine IBR/PI3 virus. **Can. Journal of Veterinary Research**, v. 58, p.148, 1994.

CAZES, R.L. Minerais orgânicos, imunidade, resistência e reprodução. **Boletim Técnico Tortuga**, v.1, n.4, p.2-7, 1996.

CAZES, R.L. Cromo orgânico. **Hora Veterinária**, v.19, n.110, jul/ago.,1999.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. Vigilancia Epidemiol. **Rabia Americ.** v.21, n.7, 1989.

CHANG, X. ; MOWAT, D.N. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. **Journal Animal Science**, v. 70, p.559, 1992.

CHANG, G,X. ; MALLARD, B. A .; MOWAT, D. N.. ; GALLO, G. F.. Effects of supplemental chromium on antibody responses of newly arrived feeder calves to vaccines and ovalbumin. **Journal of Veterinary Research**, v.60, n.2, p.140-144, 1996.

CHIQUELLE, J. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. **Canadian Journal Animal Science**, n.75, v. 3, p. 405-415, 1995.

CHRISTIAN, G.C. ; FELDMAN, F. J. The spectrophotometric determination of chromium in sea water, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.35, p.240-246, 1966.

CLARK, C.K.; ANSOTEGUI, R. P. ; SWENSSON, E. J.; PATERSON, J. A ; JOHNSON, A .B. Influence of trace mineral supplementation on immune response, mineral retention, and reproduction in first-calf beef heifers. **Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci.**, n. 48, p. 324-327, 1996.

DOMINGUES, P. F. ; LANGONI, H. **Manejo sanitário animal. Manejo sanitário de bovinos**. 1ª ed. Rio de Janeiro, Editora de Publicações Biomédicas Ltda., 2001.

DUCROS, V. Chromium metabolism. **Biol. Trace Element Res.**, v.32, p. 65-77, 1992.

DAWSON, K. A . Current and future role of yeast culture in animal production: a review of research over the last seven years. In: ALLTECH TECHN.PUBL. **Biotechnology in the Feed Industry**. Proceedings of Symposium, 1993.

DAWSON, K. A . ; NEWMAN, K. E. Effects of yeast culture supplements on the growth and activities of rumen bacteria in continuous culture. **Journal Animal Science**, v. 65. P.452, 1987.

ERASMUS, L. J.; BOTHA, P. M. ; KISTNER, A . Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n. 11, p.3056-3065, 1992.

EVANS, G. W. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. **Int. J. Biosocial Med. Res.**, v. 11, p. 163, 1989.

EVANS, G. W. ; MEYER, L. K. Chromium picolinate increases longevity. **Age**, v. 15, p. 134, 1992.

EVANS, G. W. ; MEYER, L. K. Life span is increased in rats supplemented with chromium - pyridine 2 carboxylate complex. **Adv. Sci. Res.**, v. 1, p. 19-22, 1994.

FITZGERALD, E. A . Potency test for antirabies serum and immunoglobulin. In: MESLIN, F. X. ; KAPLAN, M. M. ; KOPROWSKI, H. **Laboratory Technique in Rabies**. 4^a ed. Geneva, WHO. p.417-422, 1996.

FLODIN, N. W. Pharmacology of micronutrients,14 chromium. In: ALLTECH`S 13 th ANNUAL SYMPOSIUM, LYONS T.P.; JACQUES, K.A . (Eds). **Biotechnology in the Feed Industry** Nottingham University Press, Loughborough. p.239. 1988.

FREUND, H.; ATMIAN, S. ; FISCHER, J.E. Chromium deficiency during total parenteral nutrition. **J. Am. Med. Assoc.**,v. 241, p.496, 1979.

GALYEAN, M.L.; PERINO, L.J. ; DUFF, G. C. ; Interaction of cattle health/ immunity and nutrition. **Journal of Animal Science**, n.77, v.5, p.1120-1134, 1999.

GRIFFIN, J. F. T. Stress and immunity: a unifying concept. **Vet. Immunol. Immunopath.** n.20, p.263, 1989.

HABEL, K. Habel test for potency. In: MESLIN,F.X.; KAPLAN, N.M.;KOPROWSKI, H. (Eds).**Laboratory techniques in rabies**. 4 ^a ed. WHO, Geneva p. 369- 377, 1996.

HARRISON, G. A . ; HEMKEN, R. W. ; DAWSON, K. A . ; HARMON, R. J. ; BACKER, K. B. Influence of addition of yeast culturer supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. **J. Dairy Sci.** v. 71, p. 2967- 2975, 1988.

HARPER, P.T. ; HUNT, R.A . ; GOULD, A . R. ; SAMARATUNGA, H. ; FIYATT, A . ; GLEESON, L. J. ; RODWELL, B. J. ; RUPRECHT, C. E. ; SMITH, J.S. ; MURRAY, P.K. A new Lyssavirus - the first endemic rabies-related virus recognized in Australia. **Bull. Inst. Pasteur**, v.95, p. 209-218, 1997.

HAYIRLI, A . ; BREMMER, D.R. ; BERTICS, S.J. ; SOCHA, M.T. ; GRUMMER, R.R. . Effects of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, n.84, v.5, p. 1218-1230, 2001.

HERRICK, J. Zinc methionine: feedlot and dairy indications. **Large Animal Vet**, v. 44, p. 35, 1989.

HOPSTER, H. ; VAN DER WERF, J.T.N.; ERKENS, J.H.F.; BLOKHUIS, H.J. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. **J. Anim. Sci.** n.77, p. 708-714, 1999.

HOUSE, W. A . Trace elements bioavailability as exemplified by iron and zinc. **Field Crops Research**. v. 60, p. 115-141, 1999.

HUNT, C. D. ; STOECKER, B. J. Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for boron, chromium and fluoride dietary recommendations. **J. Nutrition**. (supplement). R. D. A . Workshop, p. 2441s- 2451s, 1996.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. **A raiva**. São Paulo, 2002.

ITO,N.; TAKAYAMA, M. ; YAMADA, K. SUGIYAMA, M. MINAMOTO, N. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity gene: glicoprotein gene is associated with virulence for adult mice. **Journal of Virology**, v.75, n.19, p.9121-9128, 2001.

JEEJEBHOY, K. N. ; CHU, R. C. ; MARLISS, E. B. ; GREENBERG, G. R. ; BRUCE-ROBERTSON, A . Chromium deficiency glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation, in patient receiving long-term total parenteral nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.30, p.531, 1977.

KAHANSARI, D. N. ; MURGO, A . J. ; FAITH, R. E . Effects of stress on the immune system. **Immunol. Today**, v.11, n.2, p.170- 175, 1990.

KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W. Immune response , glucose metabolism and performance of stressed feedes calves fed inorganic or organic chromium. **Journal of Animal Science**, n.73, p. 2721-2726, 1995.

KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W. ; BROWN, T.T. Immune response and disease resistance of calves fed chromium nicotinic acid complex or chromium chloride. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.7, p.1278-1283, 1996.

KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W. BROWN, T.T. Effect of shipping chromium supplementation on performance immune response and disease resistance of stress. **Journal of Animal Science**, n.75, v.7, p.1956-1964, 1997.

KEGLEY, E. B. ;GALLOWAY, D. L. ; FAKLER, T. M. Effect of dietary chromium-L-methionine on glucose metabolism of beef steers. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 3177-3183, 2000.

KORNEGAY, E.T.; WANG, Z. ; WOOD, C.M. ; LINDERMAN, M.D. Supplemental chromium picolinate influences nitrogen balance, dry matter digestibility, and carcass traits in growing-finishing pigs. **Journal Animal Science**, v.75, p.1319, 1997.

LARGHI, O . P. ; NEBEL, A . E. Duration of immunity afforded to cattle by a binary ethylenimine inactivated rabies vaccine. **Zbl. Vet. Med.** 32, p. 609-615, 1985.

LEE, J.D. **Química Inorgânica**. São Paulo, Ed. Blücher, 1996.

LINDELL, S. ; BRANDT, R. JR.; MINTON, J, ; STOKKA, G.; MILTON, C. Supplemental chromium and revaccination effects on performance and health of newly weaned calves. **J. Anm. Sci.**, v.72 (supp 1),p.37, 1994.

LINDEMANN, M.D. Chromium picolinate for the enhancement of muscle development and nutrient management. In: E.T. KORNEGAY (Ed.) **Nutrient Management of Food Animals to Enhance and Protect the Environment**. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, 1995.

LINDEMANN, M. D. Supplemental chromium may provide benefits but cost must be weighed. **Feedstuffs Dec.**, v.23, p.14-17, 1996.

LINDEMANN, M.D.; HARPER, A .F.; KORNEGAY, E.T. Further assessments of the effects of supplemental of chromium from chromium picolinate on fecundity in swine. **Journal Animal Science**, v.73, p.185, 1995b.

LINDEMANN, M..D.; WOOD,C. M.; HARPER, A .F.; KORNEGAY, E.T. ; ANDERSON, R. A . Dietary chromium picolinate additions improve gain: feed and carcass characteristics in growing-finishing pigs and increase litter size in reproducing sows. **Journal Animal Science**, v.73, p.457, 1995a.

LOFGREEN, G. P. Nutrition and management of stressed beef calves-an update. Vet. Clin. North Am. **Food Anim. Pract.**, v. 5, p.87-101, 1983.

LYONS, T.P. A new era in animal production: the arrival of the scientifically proven natural alternatives. In: LYONS, T. P. ; JACQUES, K.A . (Eds.). 13 th ALLTECH`S ANNUAM SYMPOSIUM. **Biotechnology in the feed industry**. 22 Nottingham, University Press, p.1-13, 1997.

MACHADO, P. F. Uso da levedura desidratada na alimentação de ruminantes. In: Simpósio sobre tecnologia da produção e utilização da levedura desidratada na alimentação animal. **Anais**, Campinas, p. 111-128, 1997.

MALLARD, B.A .; BORGS, P. Effects of supplemental trivalent chromium on hormone and immune responses of cattle. In: LYONS, T.P. ;JACQUES, K.A . (Eds).13th ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM. **Biotechnology in the feed Industry Proc.** Nottingham Univ. Press, U.K., 1997.

McDONALD, P. ; EDWARDS, R. A . ; GREENHALG, J. F. D. Nutrizione animale. **Tecniche Nuove**, Milano, Italy, 1992.

MARTIN, M. L. ; SEDMAK, P. A . Rabies. Part I: epidemiology, pathogenesis and diagnosis. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** n.5, p.521, 1983.

MARTIN, S. A . ; NISBET, D. J. ; DEAN, R. G. Influence of a commercial yeast supplement on the in vitro ruminal fermentation. **Nutr. Rep. Int.**, n.40, p. 395, 1989.

MATTOS, C. A . ; MATTOS, C. C. ; SMITH, J.S. ; MILLER, E.T. ; PAPO, A . ; UTRERA, A . ; OSBURN, B.I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1553-1557, 1996.

MAYEHEW, I. O . ; MACKAY, R. J. Rabies. In: MANSMANN, R. A . ; MCALLISTEN, E. S. ; ORATT, P. N. (eds.) **Equine Medicine and Surgery**.3^a ed. Santa Barbara, Calif. American Veterinary, N. B. Saunders, p.1192, 1982.

MCGETTIGAN, J. P. ; PROMERANTZ, R. J. ; SILER, C. A . ; MCKENNA, P. M. FOLEY, H. D. DIETZCHOLD, B. ; SCHINELL, M.J. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus Type I Gag have greathly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. **Journal of Virology**, p. 237- 244, 2003.

MERTZ, W. Chromium ocurrence and function in biological systems. **Physiological Reviews**, v.49, p.163-239, 1969.

MERTZ, W. Chromium : history and nutritional importance. **Biological Trace Elements Research**, v.32, n.3, 1992.

MERTZ, W. Chromium in human nutrition: a review. **Journal of Nutrition**, v.123, p.26-633, 1993.

MERTZ, W. ; ROGINSKI, E.E. Effects of chromium (III) supplementation on growth and survival under stress in rats fed low protein diets. **Journal Science Nutrition**, v.97, p.531, 1969.

MERTZ, W.; ROGINSKI, E.E. Chromium metabolism: the glucose tolerance factor. In: MERTZ, W. & CORNATZER, W.E. **Newer trace elements in nutrition**. New York, Marcel Dekker, p.123-153, 1971.

MONTAÑO, J. A .; POLACK, O . W. ; MORA, E. F. Raiva bovina em animais vacinados II. Situação epidemiológica no Estado do Paraná, Brasil. **Arq. Biol. Tecno.** v. 30, n.2, p.367-380, 1987.

MOONEY, K.W.; CROMWELL, G.L. Efficacy of chromium picolinate and chromium chloride as potential carcass modifiers in swine. **Journal Animal Science**, v.75, p.2661, 1997.

MOONSIE-SHAGEER, S.; MOWAT, D.N. Effects of level supplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. **Journal of Animal Science**, n. 71, p.232, 1993.

MOORADIAN, A . D. ; MORLEY, J.E. Micronutrients status in diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Nutrition**, n.45, p.877, 1987.

MORAES, S.S. Elementos minerais quelatados em suplementos para bovinos de corte. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, n.3, p.62, 2000.

MORDENTI, A . ; PIVA, A .; PIVA, G. The european perspective on organic chromium in animal nutrition. In: LYONS, T.P.; JACQUES,K.A . (Eds).13th ALLTECH`S ANNUAL SYMPOSIUM. **Biotechnololgy in the feed industry**. Nottingham Un.Press, 1997.

MOSSOP, R.T. Effects of chromium III on fasting blood glucose, cholesterol and cholesterol HDL in diabetics. **Cent. Afr. J. Med.**, v. 29, p. 80, 1983.

MOWAT, D. N. Cromo organico, nuovo supplemento minerale per gli animal stressati. In: 8th ALLTECH`S EUROPEAN LECTURE TOUR, Italy. **Proceedings**. p. 45-46, 1994.

MOWAT, D. N. Feed organic chromium in receiving and pre slaughter diets. **Proc. Purina Cattle Conf.**, Verona Agr. Fair, Italy, 1996.

MOWAT, D. N. ; CHANG, X. ; YANG, W.Z,. Chelated chromium for stressed feeder calves. **Canadian Journal of Animal Science**, v.73, p. 49-55, 1993.

MOWAT, D. N. ; SUBIJATNO, A .; YANG, W. Z. Chromium deficiency in first parity cows. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A . (Eds). 11th ALLTECH`S ANNUAL SYMPOSIUM. **Proceedings**... Nottingham University Press, Loughborough, U.K., 1995.

MUNCK, A . ; GUYRE, P. ; HOLBROOK, N. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocrinology Veterinary**, New York, v.5, n.1,p.25-44, 1984.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. J. ; KOBAYASHI, G.S. ; PFALLER, M. A **Microbiologia Médica e Clínica**. Ed. Guanabara Koogan S.A . , 2002. 762 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances**, 10th Edition. National Academy of Science. National Academy Press, Washington, D.C 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**, 7th edition. WASHINGTON, D.C. National Academy of Sciences, National Academy Press, 1996.

NG, K.W. ; WILSON, R.P. Chromic oxide inclusion in the diet does not affect glucose utilization or chromium retention by channel catfish, *ictalurus punctatus*. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 2357- 2362,1997.

NICODEMO, M. L. F. Cálculo de misturas minerais para bovinos. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, n. 3, p. 1, 2000.

OFFENBACHER, E. G. ; SPENCER, H. ; DOWLING, H. J. ; PI-SUNIER, F. X. Metabolic chromium balances in men. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 44, p. 77-82, 1986.

OLIVEIRA, A . N. ; ANDRADE, M.C.R. ; SILVA, M. V. ; MOURA, W.C. ; CONTREIRAS, E. C. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.95,p.83-88, 2000.

OSTLE, B. ; MENSING, R. W. **Statistic in Research**. 3^a Ed. Ames Iowa State University Press, 1975. 536 p.

PAGAN, J. D. ; JACKSON, S. G. ; DUREN, S. E. The effect of chromium supplementation on metabolic response to exercise in thoroughbred horses. In: LYONS, T.P. ; JACQUES, K.A .(Eds). 11th ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM. **Biotechnology in the Feed Industry**, Nottingham University Press, Loughborough, Leics. UK. P. 249-256, 1995.

PAGE, T. G. ; SOUTHERN, L.L. ; WARD, T. L. ; THOMPSON, Jr., D.L. Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs. **J. Anim. Sci.** , n. 71, p. 656, 1993.

PARMIGIANI, M. P. C. V. D. ; MIDIO, A . F. Aspectos da análise toxicológica de metais em alimentos. **Revista Brasileira da Toxicologia**, v. 7, p. 27- 36, 1994.

PASSOS, A . D. C. ; CASTRO E SILVA, A . A . M. C. ; FERREIRA, A . H. C. ; MARIA E SILVA, J. ; MONTEIRO, M . E. ; SANTIAGO, R. C. Epizootia de raiva na área urbana de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 14, n.4, Rio de Janeiro, 1998.

PEIXOTO, Z. M. P. ; CUNHA, E.M.S. ; SACRAMENTO, D.R.V. ; SOUZA, E.A .M. QUEIRÓS DA SILVA, L.H. ; GERMANO, P.L ; KROEFF, S. ; KOTAIT, I. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 31, n.1, p.1-8, 2000.

PERES, J.R. **Suplementação de cromo (Cr) para vacas leiteiras: uma novidade promissora.** Disponível em <http://www.beefpoint.com>. Acesso em 16/06/2001.

PHILLIPS W.A .; VONTUNGE, D. L. The effects of yest culture on the post performance of feeder calves. **Nutr. Rep. Int.**, v. 32, p. 287, 1985.

PIVA, G. ; MASOERO, F. ; BELLADONNA, S. ; FUSCONI, G. ; PRANDINI, A . Effects of inactivated yeasts on ruminal fermentation: in vitro and in vivo trials. **Microbiol. Aliment. Nutr.**, v.7, p.303, 1989.

PIVA, G. ; BELLADONNA, S. ; CERZOO, G.F. ; SICBALDI, F. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. **J. Dairy Sci.** n. 76, p. 2717-2722, 1993.

PRESS, R. I. ; GELLER, J. ; EVANS, G. W. The effect of chromium on serum cholesterol and apolipoprotein fractions in human subjects. **West. J. Med.**, n. 152, p. 41, 1990.

REED, L. J. ; MÜENCH, H. A . A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, n.27, v.3, p.493-497, 1938.

RIALES, B.; ALBRINK, M.J. Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high-density lipoprotein of adult men. **Am. J. Clin. Nutri.**,v.34, p.2670, 1981.

RODRIGUES DA SILVA, A . C. ; CAPORALE, G. M. M. ; GONÇALVES, C.A . ; TARGUETA, M. C. ; COMIN, F. ; ZANETTI, C. R. ; KOTAIT, I. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 42, n.2, p.95-98, 2000.

RUF, E. W. ; HALE, W.H. ; BURNOUGHS, W. Observations upon in unidentified factor in feed stuffs stimulatory to cellulose digestion in the rumen and improved live weight gains in lambs. **J. Anim. Sci.**, v. 12, p. 731, 1953.

RUSSEL, J.B. **Química Geral**. São Paulo, Ed. McGraw-Hill do Brasil, 1982, 794 p.

SANO, H. ; NAKAI, M. ; KONDO, T. ; TERASHIMA, Y. Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin in lactating, pregnant, and non-pregnant, nonlactating beef cows. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 1122, 1991.

SCHNEIDER, M. C. ; ALMEIDA, G. A . ; SOUZA, L. M. ; MORARES, N. B. ; DIAZ, R. C. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. **Rev. Saúde Pública**, v.2, n.30, p.196- 203, 1996.

SCHROEDER, H. A . The role of chromium in mammalian nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 21, p. 220, 1968.

SCHWARTZ, K. ; MERTZ, W. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. **Arch. Biochem. Biophys**, v.72, p.515, 1957.

SCHWARTZ, K. ; MERTZ, W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 85, p. 292, 1959.

SMITH, P. B. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. 2ª ed. Rio de Janeiro. Editora Manole Ltda, 1994, 1736 p.

SPEARS, J. W. Zinc methionine for ruminants: relative bioavailability of zinc in lambs and effects of growth and performance of growing heifers. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 835-843, 1989.

SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal feed Science and Technology**, v. 58, p. 151-163, 1996.

STEELE, J.H. History of rabies. In: BAER, G. M. (Ed.) **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, v.1, p.1- 29, 1975.

STEELE, N. C. ; ROSEBROUGH, R. W. Trivalent chromium and nicotinic acid supplementation for the turkey poult. **Poult. Sci.**, v. 58, p. 983, 1979.

SULLIVAN, T. W. ; DOUGLAS, J. H. ; GONZALES, N. J. Level of various elements of concern in feed phosphates of domestic and foreign origin. **J. Poultry Sci.**, v. 73, p. 520-528, 1994.

TEDESCH, L. O . **Suplementação de cromo para bovinos**. Disponível em: <http://www.beefpoint.com>. Acesso em 16 jun. 2001.

TITGEMEYER, E. C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. **J. Anim. Sci.**, n.75, p.2235-2247, 1997.

TUPINAMBÁ VALENTE, F. A . ; SIQUEIRA AMARAL, L. B. Ocorrência de moléstias nos rebanhos bovinos do estado de São Paulo no triênio 1965/1967- Raiva nas regiões de Sorocaba, Presidente Prudente, Araçatuba e São José do Rio Preto. **O Biológico**, v.35, n.1, p.25-29, 1972.

TURNER, G.S. Rabies. In: TOPLEY & WILSON'S. **Principles of bacteriology, virology and immunity**. 7ª Ed., Baltimore, v.4, p.472- 486, 1984.

UIEDA, W. ; HARMANI, N. M. S. ; SILVA, M.M.S. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. **B. Inst. Pasteur**. São Paulo, v. 1, n.2, p.17-35, 1996.

UMEHARA, O . ; DE LUCCA NETO, D. ; MORO, E. ; BERNARDI, F. ; ITO, F. H. ; RODRIGUES, C. A . Rabies virus neutralizing antibody profile in cattle vaccinated with inactivated vaccine adjuvanted with either aluminum hydroxide alone or combined with avridine. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 69, n.1, p.23-28, 2002.

VENCHIKOV, A . Zones of display of biological and pharmacological action of trace elements. In: HOEKSTRA, W.G.; GANTHER, H.E. ; MERTZ, W. (Eds). **Trace elements metabolism in animals, II**. University Park Press, Baltimore, USA, 1974.

WIEDMEIER, R. D. ; ARAMBEL, M. J. ; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus orizae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **J.Dairy Sci.**, v. 70, p. 2063, 1987.

WALLACH, S. Clinical and biochemical aspects of chromium deficiency. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 4, p. 107-120, 1985.

WARD, T. L.; SOUTHERN, L. L. ; BOLEMAN, S. L. Effect of dietary chromium picolinate on growth, nitrogen balance and body composition of growing broiler chicks. **Poult. Sci.**, v. 72 (suppl.), p.37, 1993.

WILBUR, L. A . ; AUBERT, F. A . The NIH test for potency. In: **Laboratory techniques in rabies**. 4^a ed. WHO, Geneva, p.360- 368, 1996.

WILLIAMS, P. E. V. The mode of action of yeast culture in ruminal diets: a review of the effect on rumen fermentation patterns. In: ALLTECH TECHN. PUBL **Biotechnology in the Feed Industry**. Nicholasville, KY, 1989.

WILLIAMS, P.E.V. ; TAIT, C. A . G. ; INNES, G. M. ; NEWBOLD, C. J. Effects of inclusion of yeast culture (*saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 3016, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on rabies. Eight report, **WHO Technical Report Series**, Geneva, n.824, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Gli oligoelementi nella nutrizione e nella salute dell'uomo. **Schede informative**. Geneva. 3-4/96, p. 116-120, 1996.

WRIGHT, A .J. ; MOWAT, D. N. ; MALLARD, B. A .. Supplemental chromium and bovine respiratory disease vaccines for stressed feeder calves. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, n.2, p.287-295, 1994.

WRIGHT, A . J. ; MOWAT, D. N. ; MALLARD, B. A .I. The influence of supplemental chromium and vaccines on the acute phase response of newly arrived feder calves. **Canadian Journal of Veterinary Reseach**, v.59, n. 4, p.311-315, 1995.

ZETIC, V. G. ; STEHLIK-TOMAS, V. ; GRBA, S. ; LUTILSKY, L. ; KOZLEK, D. Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. **J. Biosci.** v. 26, n. 2, p. 217-223, 2001.