

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TOBIAS FERNANDES FILHO

PERFIL IMUNOLÓGICO DE FRANGOS DE CORTE FRENTE A
IMUNOMODULADORES E SUA CORRELAÇÃO COM O PESO CORPORAL

CURITIBA

2013

TOBIAS FERNANDES FILHO

PERFIL IMUNOLÓGICO DE FRANGOS DE CORTE FRENTE A
IMUNOMODULADORES E SUA CORRELAÇÃO COM O PESO CORPORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica), área de concentração em Patologia Básica, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Caron

CURITIBA

2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**"PERFIL IMUNOLÓGICO DE FRANGOS DE CORTE, FRENTE A
IMUNOMODULADORES E SUA CORRELAÇÃO COM O
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO"**

Por

TOBIAS FERNANDES FILHO

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata (presidente)

Prof.ª Dr.ª Ana Vitória Fischer da Silva

Prof.ª Dr.ª Jovanir Inês Müller Fernandes

**Prof.ª Dr.ª Ida Cristina Gubert
Membro suplente**

Curitiba, 26 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional.

À minha namorada Bel pela paciência, companheirismo, carinho e compreensão.

Aos professores orientadores Zanata e Caron pelo suporte, direcionamento e questionamentos levantados durante as discussões, que muito contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Às professoras que participaram da banca de qualificação (Dr^a Ida Cristina Gubert e Dr^a Rosângela Locatelli Dittrich) e da banca de defesa (Dr^a Jovanir Inês Müller Fernandes e Dr^a Ana Vitória Fischer da Silva) que com suas avaliações críticas enriqueceram esta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia por constituírem um ambiente agradável de se trabalhar.

Aos parceiros da Imunova Análises Biológicas (Max, Celso e Breno) pelo suporte nas pesquisas e análises por citometria de fluxo.

Aos parceiros Seara-Marfrig, Ajinomoto - Nutrição Animal, Evonik Industries, Impextraco Latin America por proporcionarem condições para que fosse desenvolvido o experimento.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O uso de antibióticos profiláticos na avicultura é alvo de barreiras sanitárias e prejudica o comércio interno e externo de produtos oriundos de frangos de corte. Visando substituir a utilização dos antibióticos profiláticos e, ainda assim, proporcionar qualidade sanitária aos animais em criação comercial diminuindo contaminações e manifestações de doenças a administração de diversos tipos de imunomoduladores tem sido estudada. Neste trabalho avaliou-se o comportamento de células da resposta imunológica (linfócitos T CD4 e CD8 e seus subtipos, linfócitos B e monócitos e células apresentadoras de antígeno) de 210 frangos de corte Cobb500 frente aos imunomoduladores CpG-ODN, DNA bacteriano total e L-arginina em três diferentes concentrações. A imunomodulação decorrente da utilização dos três imunomoduladores apresentou respostas precoces, com alterações celulares já aos três dias de idade, e também aos 28 dias de idade, caracterizando dois momentos de resposta imunológica, variando conforme a dose de cada composto administrado. Conclui-se que a imunomodulação por CpG-ODN, DNA total e L-arginina deve ser considerada em futuros estudos na presença de infecções e vacinações bem como diferentes formas de administração, pois apresentou ser estratégia importante na indução de resposta imunológica competente.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, imunomoduladores, imunologia, frango.

ABSTRACT

The administration of prophylactic antibiotics in poultry is a current sanitary issue when considering consumption of poultry meat products worldwide. In order to find a replacement for the use of prophylactic antibiotics and still provide sanitary conditions with lower carcass contamination and no clinical disease outbreaks the administration of immunomodulators has been studied. In this work we evaluate the role of three different concentrations of CpG-ODN, whole bacterial DNA and L-arginine as immunomodulators in relation to peripheral blood leukocytes populations (T CD4 and CD8 lymphocytes and its subpopulations, B lymphocyte, monocytes and antigen-presenting-cells) of 210 Cobb500 chickens. Immunomodulation was observed at the very young age of three days and also at 28 days of age. The two different moments of immunological response vary according to the concentration of immunomodulator applied. In conclusion, the immunomodulation provided by CpG-ODN, whole bacterial DNA and L-arginine should be considered in future studies with infection and vaccination as well as with different routes of administration. The use of those immunomodulators showed to be an important strategy in developing a competent immunological response.

Key words: Flow Cytometry, immunomodulators, immunology, poultry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Linfócitos T CD4 gerais (CD4 ⁺ TCRvβ1 ⁻).....	pg. 86
Figura 02 - Linfócitos T CD4 de mucosa (CD4 ⁺ TCRvβ1 ⁺).....	pg. 87
Figura 03 - Linfócitos T CD8 de mucosa (CD4 ⁻ TCRvβ1 ⁺).....	pg. 88
Figura 04 - Linfócitos T CD8 não ativados (CD8α ⁺ CD28 ⁺).....	pg. 89
Figura 05 - Linfócitos T CD8 ativados (CD8α ⁺ CD28 ⁻).....	pg. 91
Figura 06 - Linfócitos T CD4 não ativados (CD8α ⁻ CD28 ⁺).....	pg. 91
Figura 07 - Linfócitos B (Bu-1 ⁺).....	pg. 93
Figura 08 - Monócitos fagocíticos (Kul-1 ⁺ MHCII ⁺).....	pg. 95
Figura 09 - APC não monócitos (Kul-1 ⁻ MHCII ⁺).....	pg. 96
Figura 10 - Monócitos supressores de resposta (Kul-1 ⁺ MHCII ⁻).....	pg. 98
Figura 11 - Evolução do peso médio vivo.....	pg. 98

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Ração experimental.....	pg. 25
Quadro 02 - Distribuição dos grupos experimentais.....	pg. 27
Quadro 03 - Marcadores moleculares e populações celulares obtidas em citometria de fluxo.....	pg. 30
Quadro 04 - Efeito do DNA total na modulação imune de linfócitos T CD4: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 102
Quadro 05 - Efeito do DNA total na modulação imune de linfócitos T CD8: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 103
Quadro 06 - Efeito do DNA total na modulação imune de monócitos e APC: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 103
Quadro 07 - Efeito do DNA total na modulação imune de linfócitos B: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 104
Quadro 08 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de linfócitos T CD4: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 104
Quadro 09 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de linfócitos T CD8: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 105
Quadro 10 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de monócitos e APC: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 106
Quadro 11 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de linfócitos B: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 106
Quadro 12 - Efeito da arginina na modulação imune de linfócitos T CD4: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 107
Quadro 13 - Efeito da arginina na modulação imune de linfócitos T CD8: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01).....	pg. 108

Quadro 14 - Efeito da arginina na modulação imune de monócitos e APC: diferenças com relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).....pg. 109

Quadro 15 - Efeito da arginina na modulação imune de linfócitos B: diferenças com relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).....pg. 109

Quadro 16 - Comparação de respostas das subpopulações de linfócitos T CD4 entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * $(p < 0,05)$ e ** $(p < 0,01)$pg. 110

Quadro 17 - Comparação de respostas das subpopulações de linfócitos T CD8 entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * $(p < 0,05)$ e ** $(p < 0,01)$pg. 112

Quadro 18 - Comparação de respostas das subpopulações de monócitos e outras células apresentadoras de antígeno entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * $(p < 0,05)$ e ** $(p < 0,01)$pg. 113

Quadro 19 - Comparação de respostas das subpopulações de linfócitos B entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * $(p < 0,05)$ e ** $(p < 0,01)$pg. 114

LISTA DE SIGLAS

TCR: Receptor de linfócitos T (*T cell receptor*)

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade.

IgA, IgG: Imunoglobulina do tipo A ou G, respectivamente.

CpG-ODN: Oligodeoxinucleotídeos com alta frequência de Citosinas e Guaninas.

NO: óxido nítrico

LPS: lipopolissacarídeo

IFN γ : Interferon-gama

TLR: Receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*)

PBS: Tampão salina fosfatado (*Phosphate buffered saline*)

BCR: Receptor de linfócitos B (*B cell receptor*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Sistema imunológico de aves de produção.....	14
1.2 Componentes da resposta imunológica.....	14
1.3 Valores citométricos e suas relações com parâmetros zootécnicos.....	17
1.4 Citometria de fluxo	18
1.5 Imunomoduladores.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Ração experimental.....	23
4.2 Arginina.....	24
4.3 Extração do DNA bacteriano.....	25
4.4 Sequência CpG.....	25
4.5 Animais.....	25
4.6 Administração dos imunomoduladores.....	27
4.7 Coleta de amostras.....	28
4.8 Isolamento de células mononucleares.....	28
4.9 Anticorpos.....	29
4.10 Citometria de fluxo.....	30

4.11 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Perfil imunológico celular do grupo DNA total.....	31
5.2 Perfil imunológico celular do grupo CpG-ODN.....	44
5.3 Perfil imunológico celular do grupo Arginina.....	54
6 DISCUSSÃO.....	66
6.1 DNA total.....	67
6.2 CpG-ODN.....	70
6.3 Arginina.....	72
6.4 Imunomodulação e peso corporal.....	76
7 CONCLUSÃO.....	76
8 PERSPECTIVAS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS.....	114
Certificado de aprovação no CEUA/UFPR.....	114
Protocolo de extração de DNA total.....	115
Análise de aminoácidos das rações basal (Batida 1 e 2), tratamentos arginina 1,77% (T8), 1,99% (T9) e 2,28% (T10).....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema imunológico de frangos de corte

Pouco se conhece sobre o estado imunológico de aves de produção, aparentemente saudáveis, que são constantemente imunizadas e passam por intensos processos de seleção de características interessantes do ponto de vista zootécnico. As populações de linfócitos do sangue periférico mostram-se como bons marcadores para avaliar a imunocompetência desses animais (Beirão, 2011). Sabe-se, por exemplo, que a razão CD4/CD8 é muito mais reduzida em aves criadas comercialmente do que naquelas criadas em ambientes controlados ou SPF, o que pode indicar menor imunocompetência, visto que o desenvolvimento de linfócitos CD8⁺ pode ser estimulado por infecções (Ewald *et al.*, 1996; Bridle *et al.*, 2006 *apud* Beirão, 2011).

Comprovadamente, a subpopulação de linfócitos T citotóxicos no baço de galinhas é maior em aves criadas em granjas avícolas comerciais do que aves que cresceram em laboratório (Erf *et al.*, 1998). A mesma condição é observada em aves estimuladas por antígenos (Parmentier *et al.*, 1995). De fato, a vacinação eleva a quantidade total de linfócitos T circulantes e a imunidade mediada por células (Timms e Alexander, 1977), mas em animais mais velhos o comportamento é inverso, reduzindo a população linfocitária total, com uma menor proporção CD4:CD8, por exemplo (Parmentier *et al.*, 1995). Mesmo assim, as aves possuem um sistema imunológico, de modo geral, mais competente na vida adulta (Bridle *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2004; Erf *et al.*, 1998).

1.2 Componentes da resposta imunológica

1.2.1 Linfócitos T e TCRs

As moléculas CD4 e CD8 estão presentes em dois subtipos diferentes de linfócitos T, linfócitos T auxiliares e reguladores e linfócitos T citotóxicos e natural killer (NK). A competência imune correlacionada com um número maior de células T CD4 representa uma resistência relacionada a patógenos extracelulares e resposta

dependente de anticorpos em um perfil imune Th2, assim como a patógenos intracelulares quando a resposta se desenvolve com um perfil Th1. As células T CD8 tem importância destacada em infecções de bactérias intracelulares e virais, que requerem uma resposta imunológica mediada por células (Fair *et al.*, 2008; Zekarias *et al.*, 2002). A população de linfócitos citotóxicos tem a molécula CD8 composta de um dímero de moléculas α e β , podendo ser expressos na forma CD8 $\alpha\alpha$ ou CD8 $\alpha\beta$ (Tregaskes *et al.*, 1995).

As populações de linfócitos T de aves podem ainda ser divididos em três outras subpopulações baseando-se na expressão de três diferentes tipos de receptores de linfócitos T (TCR), que são os TCR1 (ou TCR $\gamma\delta$), TCR2 (ou $\alpha\beta$ 1) e TCR3 (ou $\alpha\beta$ 2) (Lahti *et al.*, 1991). O TCR é a molécula responsável pelo reconhecimento de epítopos dos antígenos ligados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC, de classe I ou II) das células apresentadoras de antígeno profissionais ou infectadas. Os linfócitos T com os receptores TCR do tipo $\alpha\beta$ (TCR2 e TCR3) constituem o maior grupo de células efetoras em aves. Sabe-se que o TCR2 do tipo $\nu\beta$ 1 está presente em linfócitos com papel fundamental na estimulação para produção de IgA, protetor de mucosas (Cihak *et al.*, 1991).

1.2.2 CD28

O CD28 é uma proteína de sinalização celular que atua durante a apresentação de antígenos aos linfócitos T, tendo como seus contra-receptores as moléculas CD80 e CD86, expressas em linfócitos B ativados e nas células apresentadoras de antígeno profissionais (APC). A resposta de linfócitos T necessita desta ativação via CD28, gerando o segundo sinal, pois o primeiro sinal do contato do TCR com o peptídeo do antígeno apresentado no MHC não é capaz de ativar o linfócito T e gerar sua expansão clonal.

A não ocorrência desta sinalização pode também prejudicar a resposta de células B dependentes de linfócitos T (Linsley e Ledbetter, 1993), visto que a não ativação do linfócito T CD4 impede que o linfócito B reconheça o peptídeo apresentado por aquela célula, conseqüentemente, não havendo resposta humoral competente.

1.2.3 Linfócitos B

Os linfócitos B de aves tem funções bastante parecidas com as conhecidas dos linfócitos B de mamíferos. São células que dão origem a plasmócitos, secretoras de anticorpos e tem em sua superfície marcadores como Bu-1 e MHCII (Ewert *et al*, 1984).

Diferente dos mamíferos, a maturação de linfócitos B se dá em um órgão especializado chamado bolsa cloacal, localizado ao final do intestino grosso. O desenvolvimento dessas consiste em fases pré-bolsa, na bolsa e pós-bolsa (Toivanen e Toivanen, 1973). Aos 21 dias de idade a renovação de população de linfócitos B circulantes ainda é dependente da bolsa cloacal, após esse período outros órgãos como baço e medula óssea também respondem pela emigração de linfócitos B para a circulação sanguínea, com distintas especificidades migratórias para diferentes compartimentos da bolsa cloacal (córtex ou medula) e outros tecidos (Paramithiotis *et al*, 1996). A bolsa cloacal é o órgão linfóide primário das aves responsável pela maturação dos linfócitos B, cujo tamanho tem sido correlacionado com a capacidade imune do animal, por ser um órgão que reflete diretamente em sua morfologia a necessidade e a capacidade do animal de ativar sua resposta imunológica. Ao contrário da medula óssea, que tem o mesmo papel em mamíferos, a bolsa cloacal está em contato direto com a mucosa intestinal, podendo expandir-se com a proliferação de células em seu estroma sem qualquer restrição. Já foi demonstrado, por exemplo, que o estresse por aumento da densidade (concentração de aves) afeta diretamente o tamanho da bolsa cloacal (Heckert *et al.*, 2002).

1.2.4 Complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

O MHC, também chamado de complexo B nas aves, é composto por glicoproteínas de membrana essenciais para a apresentação de antígenos aos linfócitos T. As moléculas MHC de classe I estão presentes em todos os tipos celulares, inclusive em eritrócitos nucleados, e são apresentadores de peptídeos oriundos do processamento citoplasmático de patógenos intracelulares via proteossomo. As moléculas de MHC II são expressas por células apresentadoras de

antígenos com antígenos exógenos processados, como antígenos bacterianos ou fragmentos célula-vírus (Zekarias *et al.*, 2002).

Comparado ao MHC de mamíferos, a estrutura simples e compacta dos genes do MHC de galinhas tem correlações mais fortes com resistência e suscetibilidade a patógenos infecciosos (Kaufman *et al.*, 1999).

1.2.5 Monócitos

Também são considerados APC por possuírem MHCII em sua superfície quando ativos.

A resposta inicial de aumento de células positivas para marcação X (monócitos/macrófagos) e também para MHCII pode ser interpretada como monócitos ativados aderidos ao endotélio, ou em fase imediatamente anterior à adesão, em preparação para migrar para sítios de atração (Lee *et al.*, 2002). Frente à redução da expressão de MHCII na superfície celular de macrófagos estes passam a ser chamados de macrófagos inativados. É sabido que macrófagos inativados circulantes no sangue de frangos são capazes de bloquear a função dos demais linfócitos, e por isso são denominados supressores (Schaefer *et al.*, 1985; Bimczok *et al.*, 2007).

1.3 Valores citométricos e suas relações com parâmetros zootécnicos

Cheng e colaboradores (2001) demonstraram que aves que foram selecionadas para baixos parâmetros zootécnicos apresentavam proporções maiores de células citotóxicas circulantes em relação às aves que haviam sido selecionadas para apresentar altos parâmetros zootécnicos. Aparentemente, a população de células CD8 $\alpha^{\text{bright+}}$ (que é um subgrupo que expressa grandes quantidades da molécula CD8 α na superfície da sua membrana) também co-expressa a molécula β , ou seja, tem em sua membrana o dímero $\alpha\beta$ (Berndt *et al.*, 2006).

Aves apresentam uma alta proporção de células duplo-positivas circulantes, (CD4⁺CD8⁺) que, embora comuns em suínos, são extremamente raros na maioria dos mamíferos (Saalmüller *et al.*, 2001). Existem indícios de que estas células sejam um fenótipo ativado de células citotóxicas, e que estariam majoritariamente

destinadas a migrar para o tecido intestinal, onde agiriam contra infecções locais (Sullivan *et al.*, 2001; Gangadharan e Cheroutre, 2004). Estudos anteriores do nosso grupo já demonstraram esse efeito em infecções experimentais (dados não publicados).

É sabido que uma capacidade imune vigorosa representa, por si só, um custo metabólico ao animal que é incompatível com o ganho de peso apresentado por frango de corte (Buehler, 2008). Buehler (2008) também associou as respostas obtidas pela citometria de fluxo ao acompanhamento do peso vivo dos animais e pode correlacionar a caracterização dos subtipos das células imunes com o desempenho zootécnico para peso, inferindo se a variação das células imunes na presença de estímulo (imunomoduladores) interfere no crescimento dos animais. Isso permitiu entender como as respostas imunológicas influenciam na capacidade zootécnica do animal, e, de acordo com as células alteradas, quais as consequências da utilização dos imunomoduladores e como isso poderia contribuir para a resposta aos desafios sanitários presentes na avicultura.

Neste trabalho, além da citometria de fluxo, foi feita aferição do tamanho da bolsa cloacal bem como a relação bolsa cloacal:massa corporal dos animais para verificar se os imunomoduladores causam alterações de tamanho neste órgão linfóide, já que a mensuração de bolsa cloacal é feita rotineiramente em criações comerciais e poderia constituir em uma forma alternativa de avaliação.

1.4 Citometria de fluxo

A avaliação imunológica de frangos de corte é necessária para inferir o risco de doenças associadas a manejo intenso e para garantir a aplicação segura de agentes terapêuticos ou imunização profilática (Dietert *et al.*, 1994 *apud* Bridle *et al.*, 2006). A avaliação feita pela maior parte dos estudos voltados à imunofenotipagem de linfócitos aviários se foca em amostras do baço e timo, havendo, recentemente, alguns poucos estudos sobre as populações celulares circulantes em sangue periférico, de mais fácil obtenção (Bridle *et al.*, 2006; Fair *et al.*, 2008).

A citometria de fluxo como ferramenta para avaliar as subpopulações de linfócitos de aves é altamente sensível, e os anticorpos disponíveis comercialmente são bastante específicos, tornando a precisão da avaliação da imunocompetência

superior a outros métodos (Bridle *et al.*, 2006; Fair *et al.*, 2008). A fenotipagem das subpopulações de leucócitos no sangue é feita através de uma identificação das células usando-se anticorpos ligados a fluorocromos como sondas de proteínas expressas pelas células. Linfócitos expressam diferentes arranjos de moléculas em sua superfície, muitas das quais refletem diferentes estágios em suas diferenciações linhagem-específicas ou diferentes estados de ativação-inativação. Ao utilizar combinações de diferentes anticorpos é possível discriminar as populações de diferentes leucócitos, cada qual com diferentes funções no sistema imunológico (Fair *et al.*, 2008). Essa ferramenta tem sido extensivamente utilizada para entender a dinâmica das subpopulações de linfócitos em várias situações, como em aves que consumiram diferentes doses de micotoxinas, como aflatoxinas (Swamy *et al.*, 2004; Chowdhury *et al.*, 2005; Kamalavenkatesh *et al.*, 2005), em comparações entre linhagens de frangos de corte (Parmentier *et al.*, 1995; Erf *et al.*, 1998; Nestor *et al.*, 2001), na resposta a enxertos (Tsuji *et al.*, 1996) e na avaliação da expressão de moléculas em superfície celular (MHC, por exemplo) frente a infecções virais (Kaufman *et al.*, 1999; Hunt *et al.*, 2001).

Na elaboração de uma resposta imunológica competente pode haver alteração dos leucócitos em número apenas nos órgãos linfóides ou nas suas funções, neste caso não sendo evidenciadas alterações nos números de leucócitos circulantes (Parmentier *et al.*, 1995; Chowdhury *et al.*, 2005; Kamalavenkatesh *et al.*, 2005), mas sim na proporção destas células. Os marcadores celulares utilizados neste trabalho deram a condição de avaliar a função e a proporção, não o número total circulante.

1.5 Imunomoduladores

Imunomoduladores são substâncias que tem ampla função no sistema imunológico de forma direta com o objetivo de melhorar a resposta imunológica mediada por células, alterando o balanço entre citocinas pré e pró inflamatórias, também moderar a depleção de nutrientes tissulares (Grimble, 2001).

Neste estudo serão avaliadas as funções imunomoduladores desempenhados por três substâncias: arginina, CpG-ODN e DNA total bacteriano.

1.5.1 - Arginina

As aves não sintetizam esse aminoácido essencial, sendo necessária a adição na ração. Alguns estudos sugerem que a adição de arginina na ração contribui para uma melhor resposta imunológica de frangos de corte, além de cumprir o requisito mínimo para desenvolvimento e crescimento.

A imunonutrição é caracterizada pela modulação das atividades do sistema imunológico por nutrientes ou componentes específicos da ração ministrados em quantidades acima das normalmente encontradas na dieta (Grimble, 2001).

A arginina é um componente do ciclo da uréia e pode sofrer metabolização por duas vias: NO sintetase (produzindo óxido nítrico - NO) ou por arginase (produzindo uréia e ornitina). O NO proveniente da metabolização de L-arginina em L-citrulina via NO sintetase faz parte de um mecanismo citolítico importante em macrófagos, enquanto que as poliaminas obtidas da precursora ornitina via arginase são essenciais para proliferação celular (Zea *et al.*, 2004). Em humanos foi demonstrado que a falta de arginina bloqueia a proliferação de linfócitos T de sangue periférico por estagnação na fase 1 (G0 - G1) do ciclo celular (Rodriguez *et al.*, 2007), diminui a expressão da cadeia ζ de CD3 em células T da linhagem Jurkat (Rodriguez *et al.*, 2002) e interfere com a expressão desta mesma cadeia em células T humanas de sangue periférico ativadas (Zea *et al.*, 2004). O receptor de células T de cadeia ζ (CD3 ζ) é o principal elemento de transdução de sinal do TCR e um passo limitante na sua montagem é a sua expressão na membrana plasmática (Devés *et al.*, 2000 e Elmore, 2006). A deficiência de arginina também reduz a maturação precoce de células B na medula óssea de camundongos transgênicos na transição entre linfócitos pró e pré-célula B e diminui a proporção de células B nos linfonodos e fígado mas não altera a proliferação de linfócitos B maduros (de Jonge *et al.*, 2002). Em macrófago de aves, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a produção de nitrito é influenciada por arginina e pela concentração de lipopolissacarídeos, não havendo síntese de nitrito na ausência de arginina (Sung *et al.*, 1991; Bryk *et al.*, 2008).

A arginina tem efeito protetor sobre enterócitos suínos frente a danos induzidos por LPS por mecanismos envolvendo sinalização pela via de mTOR (o alvo humano para atividade de rapamicina) por meio da fosforilação de S6K1 e 4EBP1, bem como de TLR4 além do aumento do *turnover* de proteínas intracelulares (Tan *et al.*, 2010).

Neste contexto, há evidências que mTOR tem papel de supressão da ativação de NFκB (Mendes *et al.*, 2009).

1.5.2 - CpG-ODN

Sequências de oligodeoxinucleotídeos de CpG já se mostraram eficientes em induzir a proliferação de células B e secreção de imunoglobulinas, secreção monocítica de citocinas do perfil de resposta Th1 (IL-12, IFNα, IFNβ e IFNγ) e atividade lítica de células NK (Tokunaga *et al.*, 1992; Krieg *et al.*, 1995; Pisetsky *et al.*, 1995; Ballas *et al.*, 1996; Cowdery *et al.*, 1996; Jakob *et al.*, 1998; Sparwasser *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999; Behboundi *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001). Villanueva e colaboradores (2011) demonstraram que sequências de RNA de dupla fita estimulam a expressão gênica de TLR3 e TLR7 em esplenócitos de galinhas, culminando em aumento da expressão de IFNγ. Há evidências que mostram que CpG pode modular a resposta imunológica predominantemente para um perfil Th1 (Klinman *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998). Gomis e colaboradores (2003) demonstraram que a administração de CpG foi bastante efetiva quando realizada três dias antes de uma infecção experimental e a duração da proteção conferida pelo CpG foi de cerca de seis dias.

O CpG-ODN é capaz de estimular diretamente monócitos, macrófagos e células dendríticas a produzir interleucinas e citocinas como IFNα/β, IL-6, IL-12, GM-CSF, quimiocinas e TNF-α, que por sua vez estimulam células T e células NK a produzir citocinas adicionais, como IFNγ (Lacroix-Lamandé *et al.*, 2009). Cowdery e colaboradores (1996) observaram *in vivo* que o CpG de fonte de DNA bacteriano induz células NK a secretar IFNγ, que aumenta a atividade de células B. Na presença de CpG estas células também aumentam a expressão de receptores Fcγ e das moléculas co-estimulatórias como CD80/86 e MHCII (Krieg *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999). Assim, os efeitos causados pela administração de CpG-ODN tem manifestação em diferentes tipos celulares seja por estimulação direta ou indireta.

1.5.3 - DNA total

O DNA bacteriano possui sequências com alta frequência de bases citosina e guanina, o que estimula o sistema imunológico dos animais como já descrito em galinhas (He *et al.*, 2005) e humanos (Lacroix-Lamande *et al.*, 2009) via receptores TLR9. O TLR21 desempenha em aves o papel do TLR9 humano em reconhecer padrões CpG em DNAs virais ou bacterianos (Brownlie *et al.*, 2009), que ativam fatores de transcrição como o NF- κ B (Keestra *et al.*, 2010). Aves não possuem gene para expressão de TLR9 e uma inspeção mais detalhada revelou que TLR21 de galinhas (chTLR21) tem apenas 38% de similaridade em aminoácidos com o receptor TLR9 de mamíferos (Keestra *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e utilização de imunomoduladores tem sido objeto de estudo na avicultura por haver uma tendência mundial de banir o uso de medicamentos antimicrobianos profiláticos nas criações comerciais. Este estudo busca trazer melhor compreensão do impacto da utilização de imunomoduladores em diferentes concentrações no sistema imune celular de frangos de corte e inferir o potencial de CpG-ODN, DNA bacteriano total e L-arginina para proporcionar resposta imunológica competente frente a múltiplos desafios microbiológicos ou ambientais, aliados ao bom desempenho zootécnico, constituindo uma alternativa interessante a administração de medicamentos e minimizando perdas zootécnicas decorrentes de infecções.

Compreender o comportamento de células do sistema imune de frangos de corte frente a utilização dos imunomoduladores estudados pode constituir uma ferramenta para, por exemplo, avaliar programas de vacinação de acordo com as respostas celulares desejadas objetivando ampliar a cobertura vacinal e proteção sanitária das aves, definindo melhores momentos de aplicação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o comportamento de subpopulações de células leucocitárias do sangue periférico de frangos de corte criados em condição comercial frente a diferentes doses de três imunomoduladores e avaliar o impacto dos tratamentos no peso dos animais.

3.2 Objetivos específicos

1. Correlacionar o peso corporal dos frangos de corte com os diferentes marcadores imunológicos associados aos diferentes momentos da resposta imunológica;

2. Avaliar a interferência dos níveis de arginina, CpG-ODN e DNA total bacteriano na capacidade de resposta imunológica celular das aves.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ração experimental

Toda a ração do experimento foi fornecida pela Impextraco Latin America e administrada em única fase (inicial) para os frangos de corte no período de estudo. Não há diferença de composição entre as rações dos grupos Controle, DNA e CpG (quadro 01), somente diferentes inclusões de arginina no tratamento experimental Arginina.

Os níveis de arginina nas rações experimentais e na ração basal foram confirmados por análise de HPLC gentilmente conduzida pela Evonik Industries - AminoLab.

A composição de aminoácidos totais das rações dos tratamentos experimentais pode ser conferida no anexo 03 (item 10.3).

Quadro 01 - Ração experimental

INGREDIENTES	INCLUSÃO (%)
Milho moído	61,61%
Soja Micronizada	7,20%
Farelo de soja 45%	27,00%
Calcário 35%	1,15%
Fosfato Bicalcico	1,70%
Sal comum	0,50%
L-lisina	0,18%
DL-metionina	0,28%
Treonina	0,06%
Nuvimicro Aves ¹	0,10%
Nuvimix Corte Inicial ²	0,15%
Lerbek (anticoccidiano)	0,05%
Feedox (antioxidante)	0,02%

¹ Premix mineral: Sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco e iodato de cálcio.

² Premix vitamínico-mineral: Vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, pantotenato de cálcio, niacina, ácido fólico, biotina e selenito de sódio.

4.2 Arginina

O aminoácido L-arginina foi gentilmente cedido pela Ajinomoto - Divisão de Nutrição Animal Brasil, em quantidade suficiente para incrementar as rações experimentais em 0,50%, 0,75% e 1,00%.

4.3 Extração do DNA bacteriano total

O DNA bacteriano total foi extraído no Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi em parceria com o Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná a partir de *Escherichia coli* DH5 α não patogênica cultivada em meio LB (Luria-Bertani *broth*) pelo método de Raeder & Broda modificado (1985).

A extração foi realizada a partir das células obtidas da centrifugação do meio de cultura adicionando-se tampão de extração constituído de detergente SDS a 60°C. Após incubação a 04°C por dez minutos e centrifugação foi adicionada solução de clorofórmio e fenol saturado a fase aquosa. A fase aquosa obtida de nova centrifugação foi transferida para um novo tubo e adicionou-se uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico. A fase aquosa obtida de uma terceira centrifugação foi adicionada de isopropanol (2-propanol), precipitando o DNA genômico. Dispensando a fase aquosa e adicionando-se etanol 70% em água autoclavada, o pellet obtido por centrifugação foi ressuspensão com água ultrapura autoclavada e, em seguida, armazenado a -80°C. A concentração e integridade das soluções de DNA extraídas foram avaliadas por espectrofotometria de absorção ultravioleta (EUV) - NanoDrop® (ThermoScientific) e eletroforese em gel de agarose a 1,0% (EGA), respectivamente.

O protocolo completo de extração pode ser conferido no anexo 02 (item 10.2).

4.4 Sequência CpG

A sequência de CpG com 22 bases (TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT) foi adquirida comercialmente de University Core DNA Services - UCDNA (Universidade de Calgary, Canadá) com todas as bases fosforotioadas, o que garante estabilidade da sequência e proteção contra ação de nucleases.

4.5 Animais

Para compreender a dinâmica imune de frangos de corte, selecionados e destinados à produção de carne, 210 aves Cobb 500 (*Gallus gallus*) de ambos os sexos foram alojadas no biotério de aves da Universidade Federal do Paraná,

campus Centro Politécnico, no Setor de Ciências Biológicas, em baias simples individuais. Essas aves, divididas aleatoriamente em quatro grupos, foram mantidas conforme os protocolos de criação de aves comerciais de corte (lotação máxima de 14 aves/m²). Ao permitir que as aves se desenvolvam em condições de campo, diferenças de ganho de peso serão evidenciadas como ocorre normalmente, não sendo necessário qualquer desafio experimental (Heckert *et al.*, 2002). As condições de alojamento não representam fidedignamente situação encontrada a campo, mas entende-se que seja um ambiente experimental que propicie o alojamento similar.

As baias foram forradas com cepilho não autoclavado (camada de 10 cm), a ração fornecida *ad libitum* em comedouros do tipo cilíndrico pendular e água, também *ad libitum*, em bebedouro do tipo nipple. Quatro horas antes do alojamento o sistema de aquecimento composto de quatro lâmpadas incandescentes 100w/baia foi ligado para garantir um ambiente de conforto térmico para os pintinhos.

No momento do alojamento todos os animais foram pesados em balança digital C&F PGMT (Fernando Filizola Balanças, Brasil), identificados por anilhas metálicas numeradas sequenciais, distribuídos aleatoriamente entre os grupos de tratamento e submetidos a aplicação dos imunomoduladores. Não houve diferença de peso entre as aves dos diferentes tratamentos no momento do alojamento (Figura 11).

Os grupos tratados e suas subdivisões, bem como diferentes concentrações dos tratamentos, podem ser observados no Quadro 02.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o número do processo 23075.108888/2011-11 (ANEXO 1).

Quadro 02 - Distribuição dos grupos experimentais

GRUPO	SUBSTÂNCIA TESTADA	SUBGRUPO	DOSE ADMINISTRADA	NÍVEL ARGININA TOTAL
1	Controle	0	50 µL	1,30%
2	CpG-ODN	1	0,6 µg	1,30%
		2	6,8 µg	1,30%
		3	15 µg	1,30%
3	DNA total bacteriano	1	7,5 µg	1,30%
		2	36 µg	1,30%
		3	68 µg	1,30%
4	Arginina	1	0 µg	1,77% (+0,5%)
		2	0 µg	1,99% (+0,75%)
		3	0 µg	2,28% (+1,00%)

Valores de suplementação de arginina indicados entre parênteses.

4.6 Administração dos imunomoduladores

A administração de todos os imunomoduladores foi realizada no momento do alojamento após identificação e separação dos animais em grupos de tratamento.

O tratamento controle, com 21 aves, recebeu 2mL de solução salina estéril apirogênica (Medflex®, Segmenta Farmacêutica) via subcutânea na região cervical.

Os tratamentos CpG-ODN, com 63 aves subdivididas em três subgrupos, e DNA, também sendo 63 aves em três subgrupos, receberam 2mL da sequência CpG-ODN ou do DNA total diluídos em salina estéril apirogênica (Medflex®, Segmenta Farmacêutica) via subcutânea na região cervical, conforme dosagem específica de cada subgrupo.

O grupo Arginina, com 63 aves subdivididas em três subgrupos, recebeu ração acrescida de arginina conforme níveis específicos de cada subgrupos e também 2mL de solução salina estéril apirogênica (Medflex®, Segmenta Farmacêutica) via subcutânea na região cervical.

Os níveis aplicados foram estimados conforme referências: arginina (D'amato *et al*, 2010), DNA (Elkins *et al*, 1999) e CpG-ODN (Gomis *et al*, 2003).

4.7 Coleta de amostras

O sangue de sete animais por tratamento (incluindo subgrupos) dos animais foi coletado aos três, sete, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade com anticoagulante heparina sódica Hepamax® (Blausiegel, São Paulo, Brasil) e acondicionados em tubos Vacuteiner® (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) até o momento de processamento. Nos mesmos períodos todos os animais dos grupos foram pesados.

Aos três e sete dias de idade os animais amostrados tiveram seu sangue coletado por punção cardíaca, anestesiadas por profissional médico veterinário conforme recomendações (Tranquilli *et al.*, 2007) e eutanasiados para mensuração de órgãos linfóides (timo, baço e bolsa cloacal). A partir da idade de 14 dias a coleta de sangue já foi factível por veia jugular externa ou alar, não necessitando eutanásia e, portanto, não houve avaliação de órgãos linfóides a partir desta idade.

4.8 Isolamento de células mononucleares

O sangue coletado foi processado para separação de leucócitos por diferença de densidade utilizando Histopaque®1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Resumidamente, 2mL do sangue diluído 1:1 em PBS foi adicionado a 1mL de Histopaque®1077, centrifugado por 30 minutos a 400 x g a 22°C em centrífuga Eppendorf®5810R (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A camada de leucócitos na interfase da fase aquosa (*buffy coat*) foi transferida com pipeta Pasteur para tubo contendo 4mL de PBS e, novamente, centrifugado por sete minutos a 400 x g a 22°C. O sobrenadante foi descartado e o pelete resuspenso em 1mL de PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer.

4.9 Anticorpos

Todos os anticorpos foram adquiridos de Southern Biotechnology Associates (USA). Para identificar as moléculas em superfície dos leucócitos os seguintes anticorpos foram utilizados: camundongo anti-galinha CD4 (clone CT-4, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha CD8 α (clone CT-8, IgG1, conjugado a R-PE); camundongo anti-galinha MHC classe II (clone 2G11, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha TCR $\alpha\beta$ /V β 1 (clone TCR-2, IgG1, conjugado a R-PE); camundongo anti-galinha CD28 (clone AV7, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha Kul-01 (clone KUL01, IgG1, conjugado a R-PE) e camundongo anti-galinha Bu-1a (clone 21-1A4, IgG1, conjugado a R-PE).

Para determinar diferentes subpopulações leucocitárias e suas funções recorreu-se a duplas marcações a seguir: CD4/TCRv β 1, CD8 α /CD28, Kul-01/MHC II e Bu-1 como marcação única. 0,5mg/mL de cada anticorpo foi adicionado em 10⁶ células, por 30 minutos a a temperatura ambiente. Após marcação foi realizada fixação com 1mL de paraformaldeído 1% em PBS por 30 minutos. Então, as células foram centrifugadas a 1400 x g por sete minutos, o sobrenadante foi descartado e o pelete final foi resuspenso em PBS em tubo para análise em citômetro de fluxo.

O painel de marcações e as populações leucocitárias observadas podem ser vistas conforme quadro a seguir:

Quadro 03 - Marcadores moleculares e populações celulares obtidas em citometria de fluxo

Tipo celular	Marcadores	TCRvb1⁺	TCRvb1⁻
Linfócitos T	CD4 ⁺	Linfócitos T CD4 de mucosa	Linfócitos T CD4 gerais
	CD4 ⁻	Linfócitos T CD8 de mucosa	-
	Marcadores	CD28⁺	CD28⁻
	CD8 ⁺	Linfócitos T CD8 não ativados	Linfócitos T CD8 ativados
	CD8 ⁻	Linfócitos T CD4 não ativados	-
Tipo celular	Marcadores	Bu-1⁺	
Linfócitos B	Bu-1 ⁺	Linfócito B	
Tipo celular	Marcadores	MHCII⁺	MHCII⁻
Monócitos e APC	Kul-01 ⁺	Monócitos fagocíticos	Monócitos supressores
	Kul-01 ⁻	APC não monócitos	-

4.10 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson) e as fluorescência dos anticorpos foram detectadas nos canais FL1 (nm 530/30) para FITC, e FL2 (nm 585/42) para PE. Foram analisados 50.000 eventos na seleção (*gate*) de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral - FSC e SSC). Os dados foram analisados com o *software* CellQuest (Becton Dickinson).

4.11 Análise estatística

Os dados foram submetidos a ANOVA segundo modelo para experimento fatorial 3x3+1 em cada avaliação. Análise preliminar descritiva foi conduzida para eliminar eventuais observações discrepantes. Após ANOVA a significância dos efeitos foram avaliadas com relação ao grupo controle por meio de contrastes entre médias. Em todas as análises o nível de significância nominal foi de 5%.

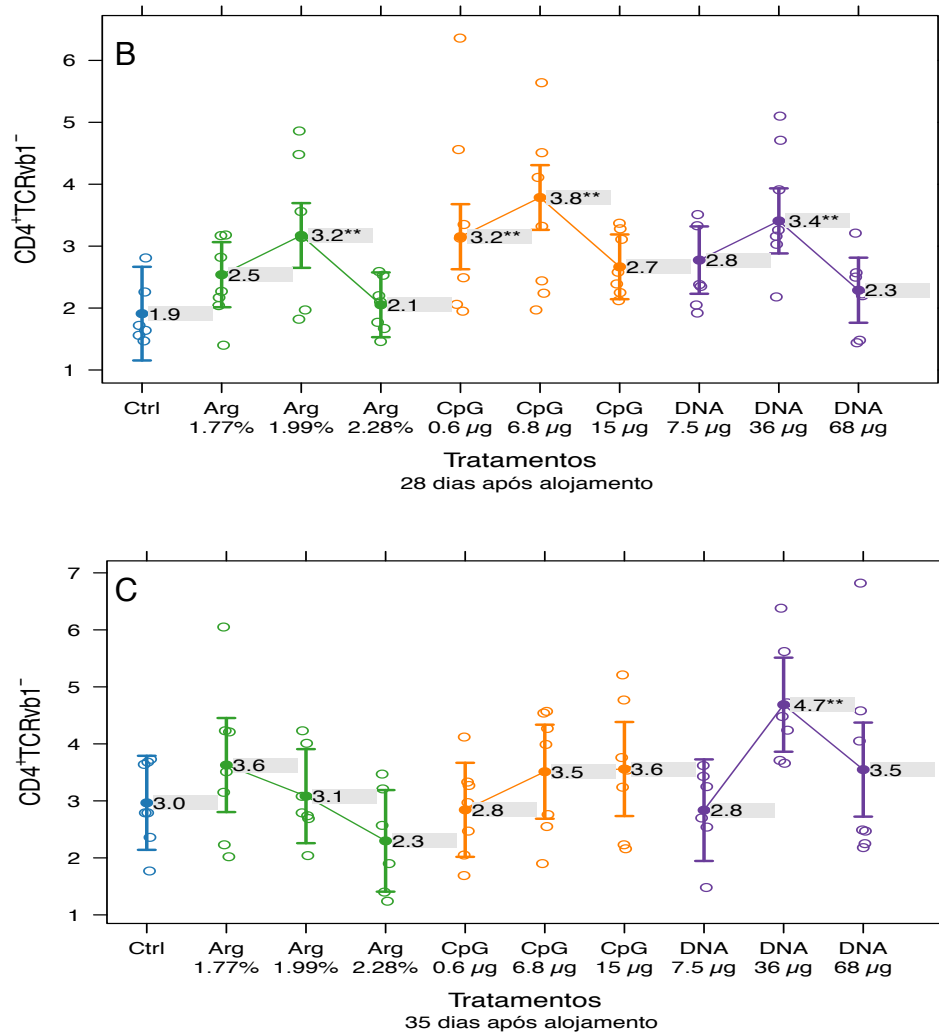
Todas as análises foram processadas no software R versão 2.15.2 (R Core Team - 2012, Viena, Austria).

5. RESULTADOS

5.1 Perfil imunológico celular do grupo DNA total

5.1.1 Linfócitos T CD4 gerais

Aos 28 e 35 dias de idade o grupo que recebeu 36 μ g de DNA total apresentou quantidade superior de linfócitos T CD4 ($p < 0,01$) (Figura 1B, C).

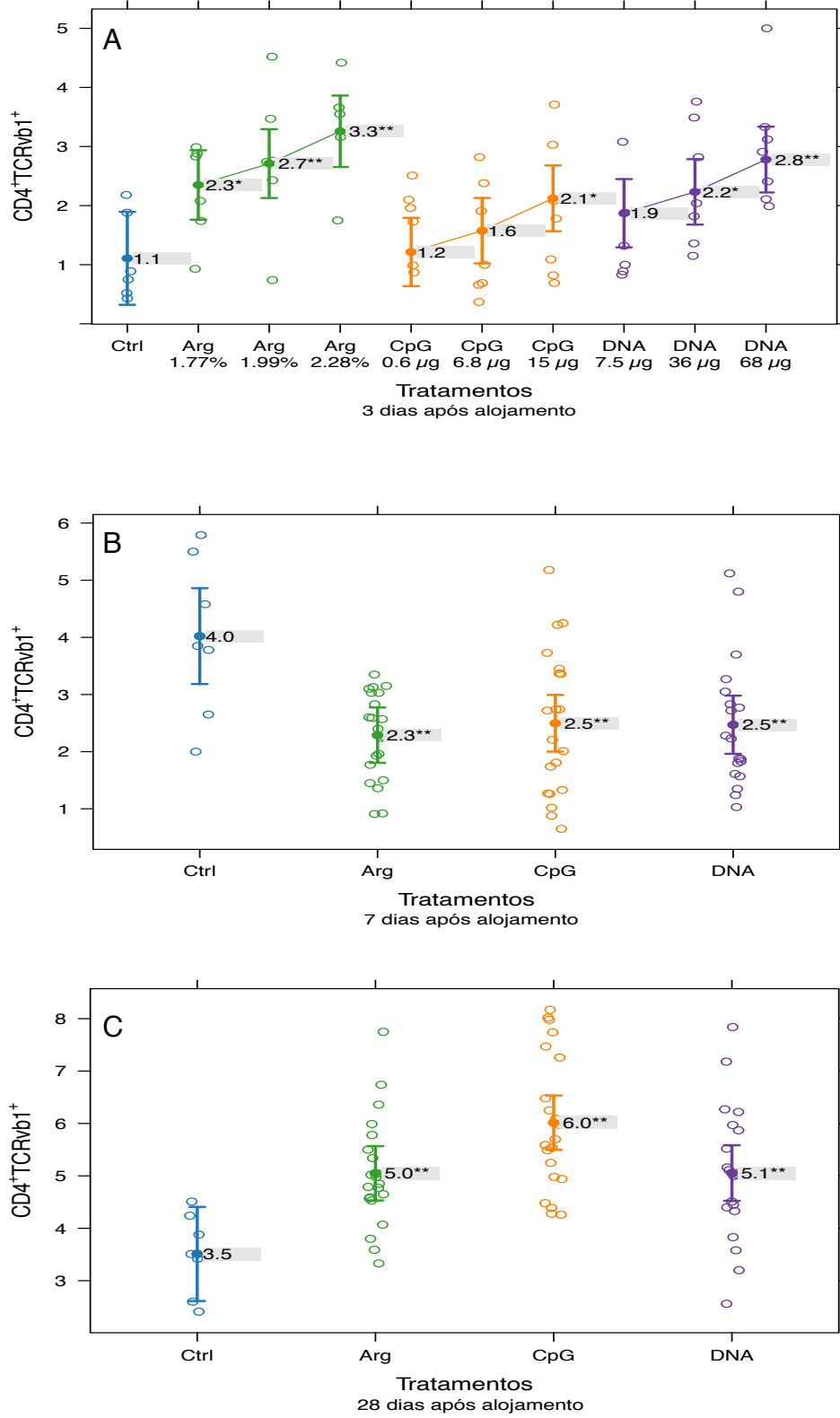
Figura 01 - Linfócitos T CD4 gerais (CD4⁺TCR ν β 1⁻)

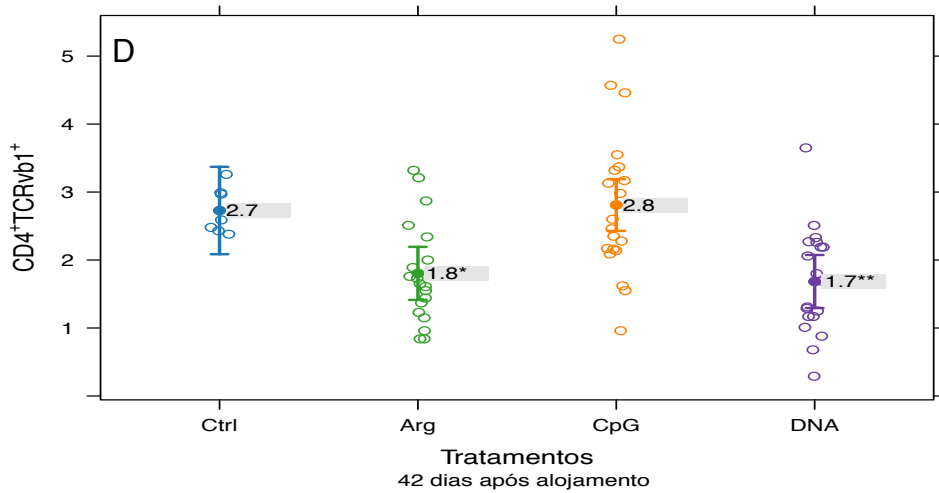
Linfócitos T CD4 gerais (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). B) aos 28 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.2 Linfócitos T CD4 de mucosa

Aos três dias de idade foi observada maior quantidade de linfócitos T CD4 de mucosa nos grupos que receberam 36 μ g ($p < 0,05$) e 68 μ g ($p < 0,01$) de DNA total (Figura 2A). Aos sete dias de idade todos os grupos que receberam DNA total apresentaram menor quantidade circulante destas células ($p < 0,01$) (Figura 2B), situação que se inverteu aos 28 dias de idade ($p < 0,01$) (Figura 2C) e, aos 42 dias, foi observada novamente menor quantidade destas células ($p < 0,01$) (Figura 2D).

Figura 02 - Linfócitos T CD4 de mucosa (CD4⁺TCR ν β 1⁺)



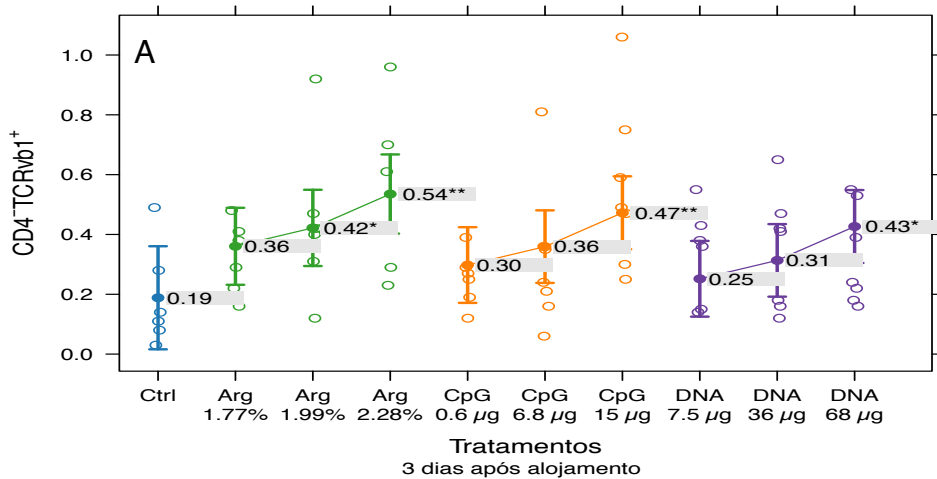


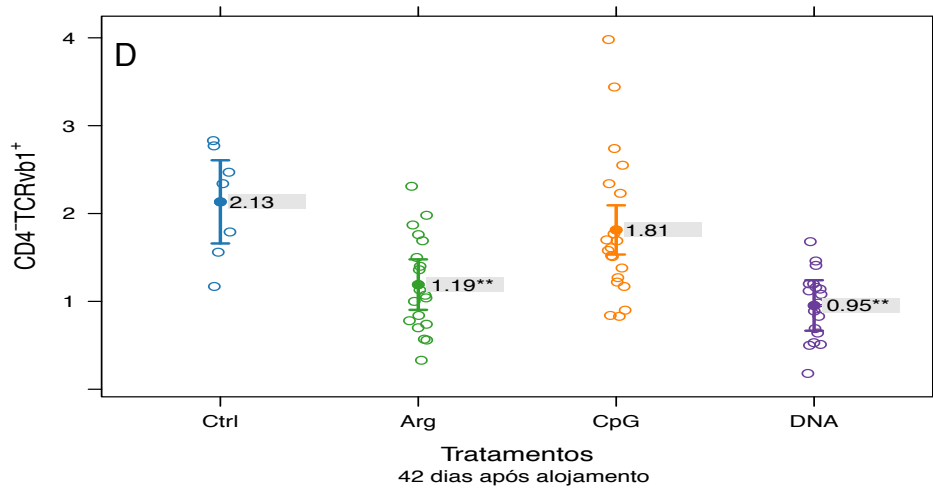
Linfócitos T CD4 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos sete dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.3 Linfócitos T CD8 de mucosa

O grupo que recebeu 68 μ g de DNA total apresentou maior quantidade destas células aos três dias de idade ($p < 0,05$) (Figura 3A) e aos 42 dias de idade todos os grupos tratados com DNA total apresentaram menor quantidade de linfócitos T CD8 de mucosa ($p < 0,01$) (Figura 3D).

Figura 03 - Linfócitos T CD8 de mucosa (CD4-TCRvβ1⁺)



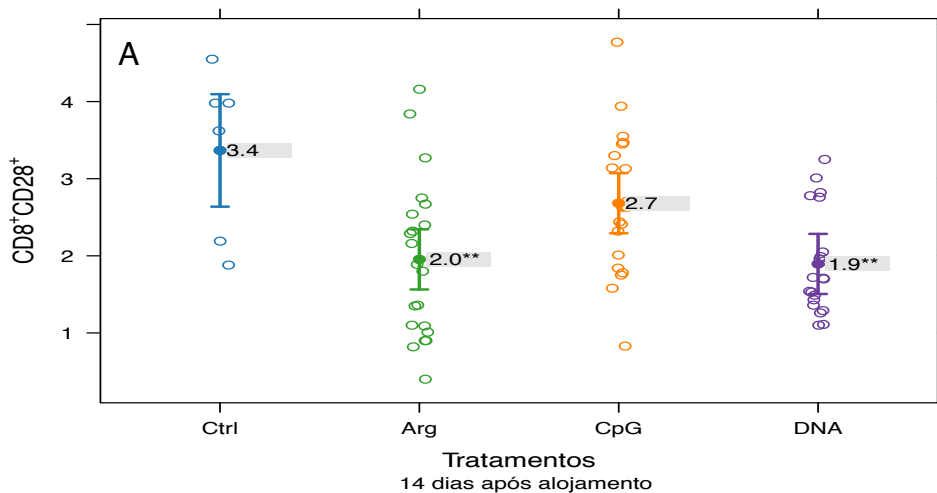


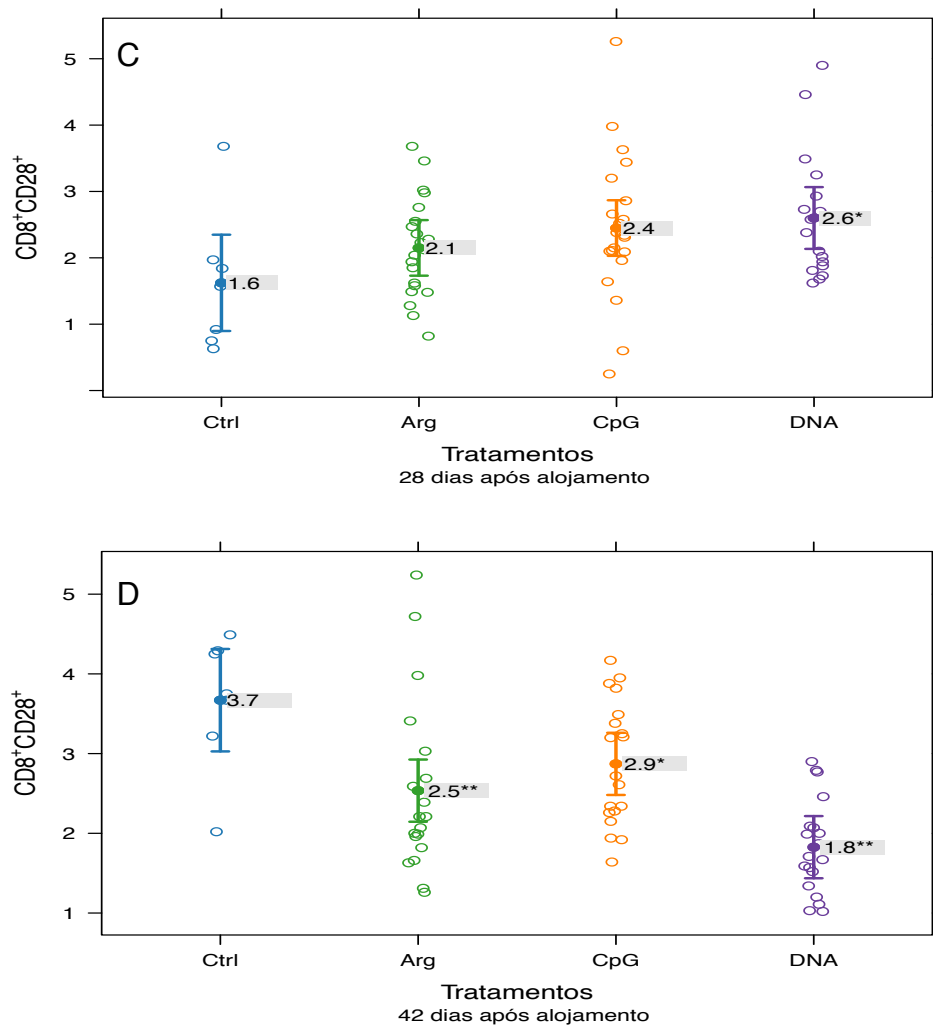
Linfócitos T CD8 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.4 Linfócitos T CD8 não ativados

Aos 14 dias de idade todos os grupos que receberam DNA total apresentaram quantidade destas células inferiores as do grupo controle ($p < 0,01$) (Figura 4A). Aos 28 dias todos os grupos tratados apresentaram maior quantidade de células circulantes ($p < 0,05$) (Figura 4C) e, aos 42 dias, a quantidade destas células apresentou-se menor em todos os grupos tratados ($p < 0,01$) (Figura 4D).

Figura 04 - Linfócitos T CD8 não ativado ($CD8\alpha^+CD28^+$)

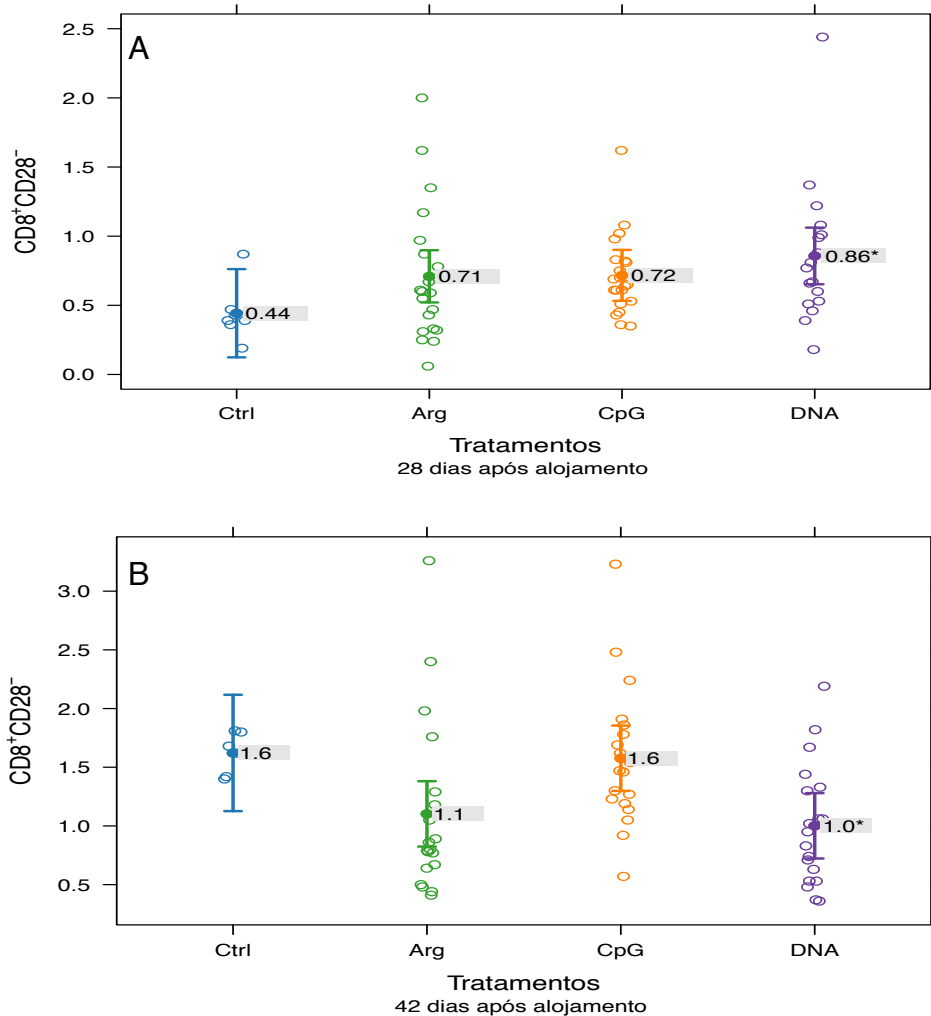




Linfócitos T CD8 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 14 dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.5 Linfócitos T CD8 ativados

Aos 28 dias de idade a quantidade destas células foi maior em todos os grupos tratados ($p < 0,05$) (Figura 5A), mas aos 42 dias foi menor ($p < 0,05$) que o grupo controle (Figura 5B).

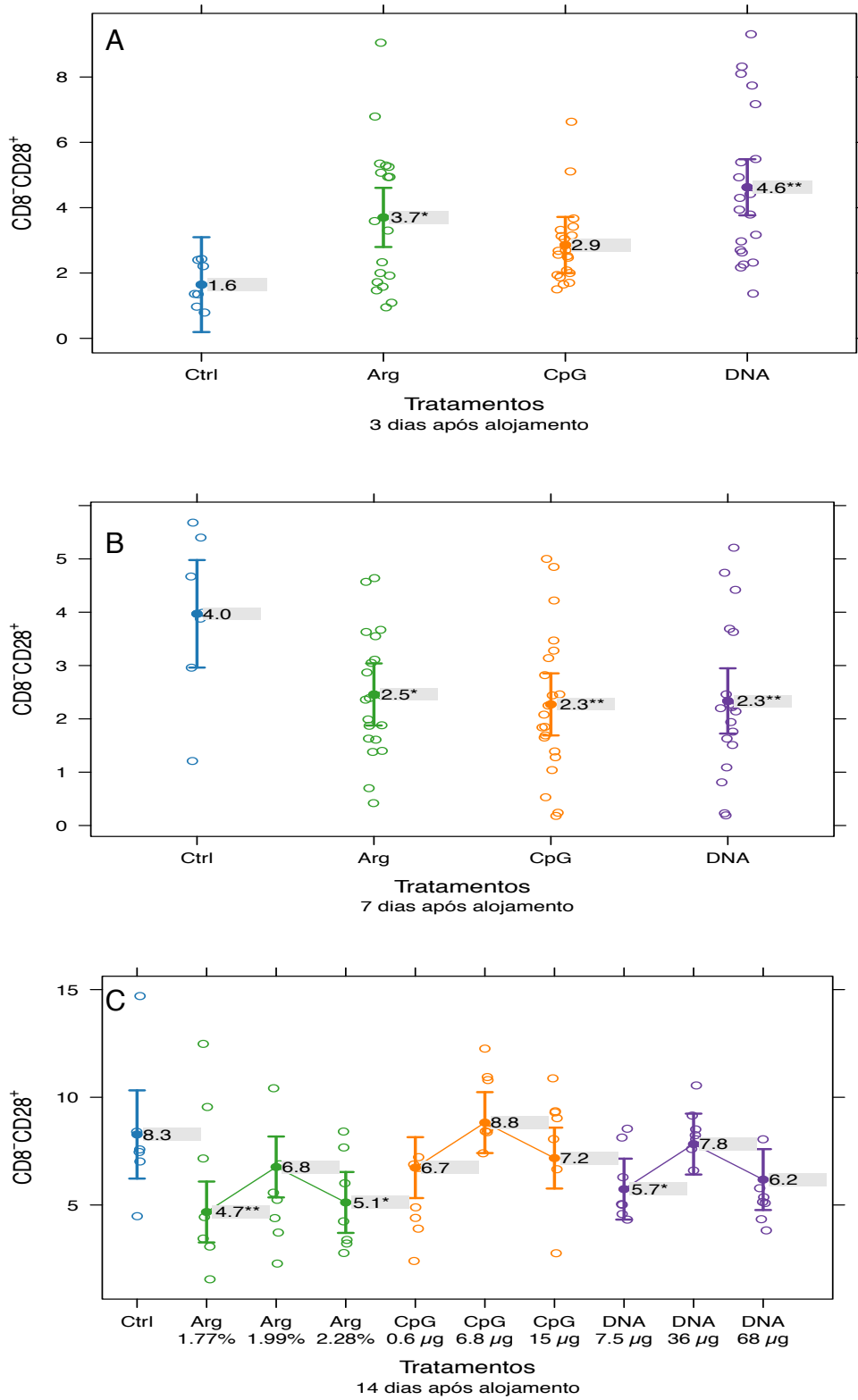
Figura 05 - Linfócitos T CD8 ativados (CD8 α^+ CD28 $^-$)

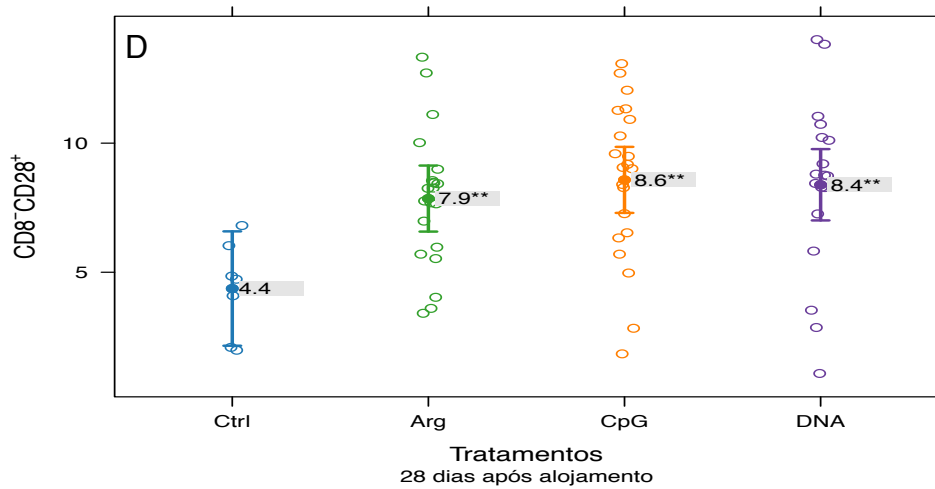
Linfócitos T CD8 ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 28 dias de idade. B) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.6 Linfócitos T CD4 não ativados

A quantidade destas células é maior nos grupos tratados em relação ao grupo controle aos três ($p < 0,01$) (Figura 6A) e 28 dias de idade ($p < 0,01$) (Figura 6D). Aos sete dias de idade todos os grupos tratados com DNA total apresentaram menor quantidade celular ($p < 0,01$) (Figura 6B) e aos 14 dias de idade somente o grupo que recebeu 7,5 μ g de DNA foi observado com menor quantidade circulante dessas células ($p < 0,05$) (Figura 6C).

Figura 06 - Linfócitos T CD4 não ativado (CD8 α -CD28 $^{+}$)



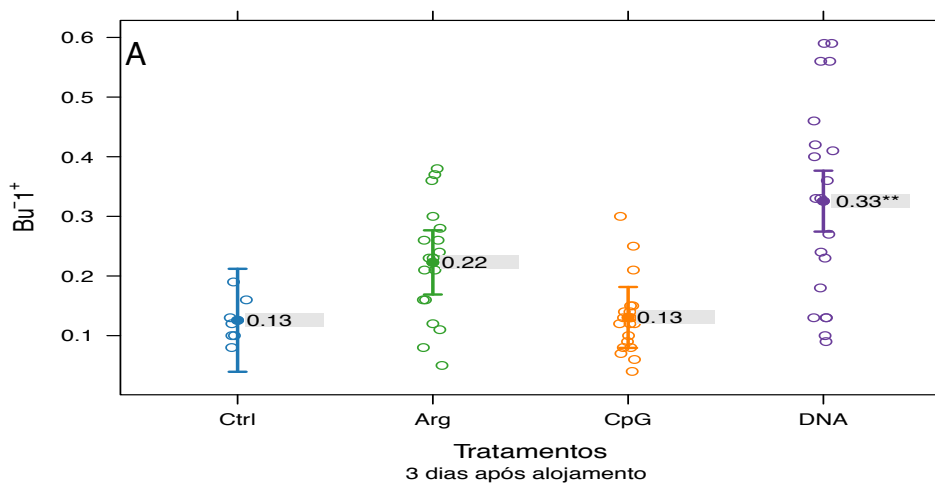


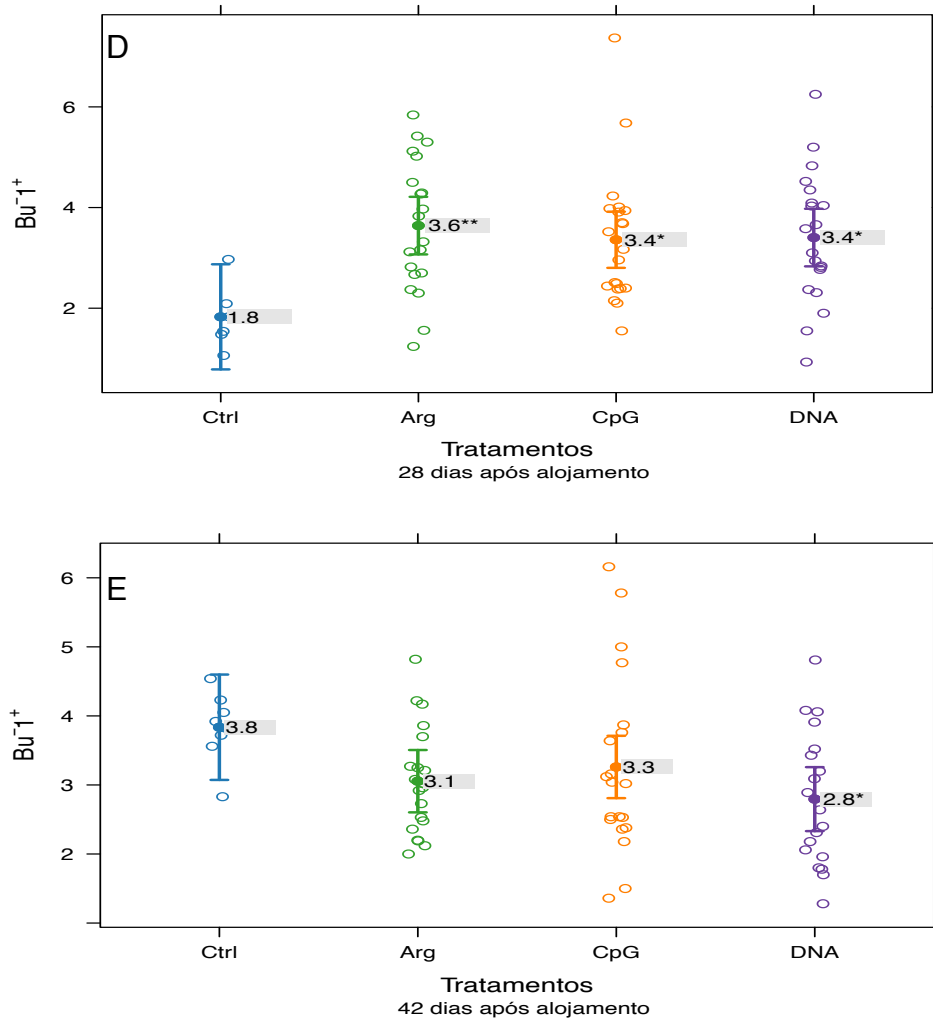
Linfócitos T CD4 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos sete dias de idade. C) aos 14 dias de idade. D) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.7 Linfócitos B

Aos três dias de idade todos os grupos tratados apresentaram maior quantidade de linfócitos B circulantes ($p < 0,01$) (Figura 7A), bem como aos 28 dias ($p < 0,05$) (Figura 7D). Aos 42 dias de idade os grupos tratados apresentaram menor quantidade de células ($p < 0,05$) (Figura 7E).

Figura 07 - Linfócitos B (Bu-1⁺)

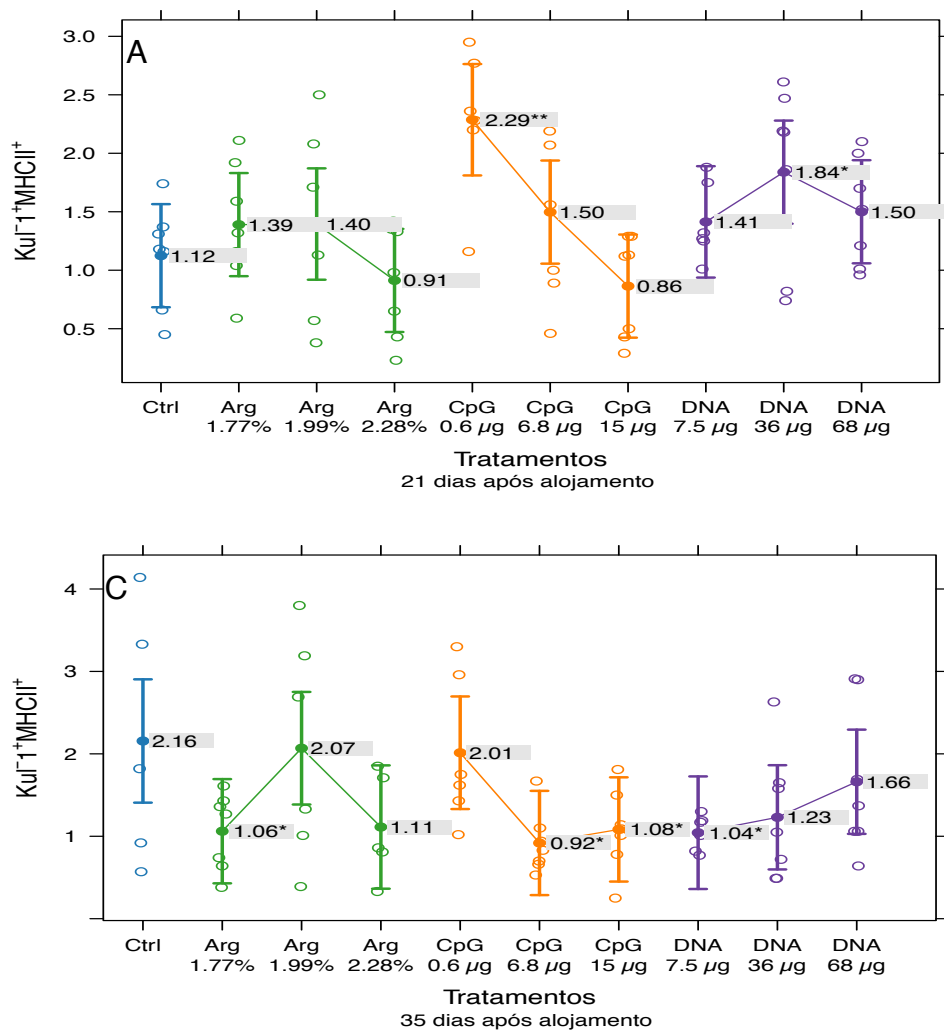




Linfócitos B (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. D) aos 28 dias de idade. E) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.8 Monócitos fagocíticos

Aos 21 dias de idade o grupo que recebeu 36 μ g de DNA total apresentou maior quantidade destas células circulantes ($p < 0,05$) (Figura 8A). Aos 35 dias de idade o grupo que recebeu 7,5 μ g de DNA total apresentou menor quantidade destas células circulantes ($p < 0,05$) (Figura 8C).

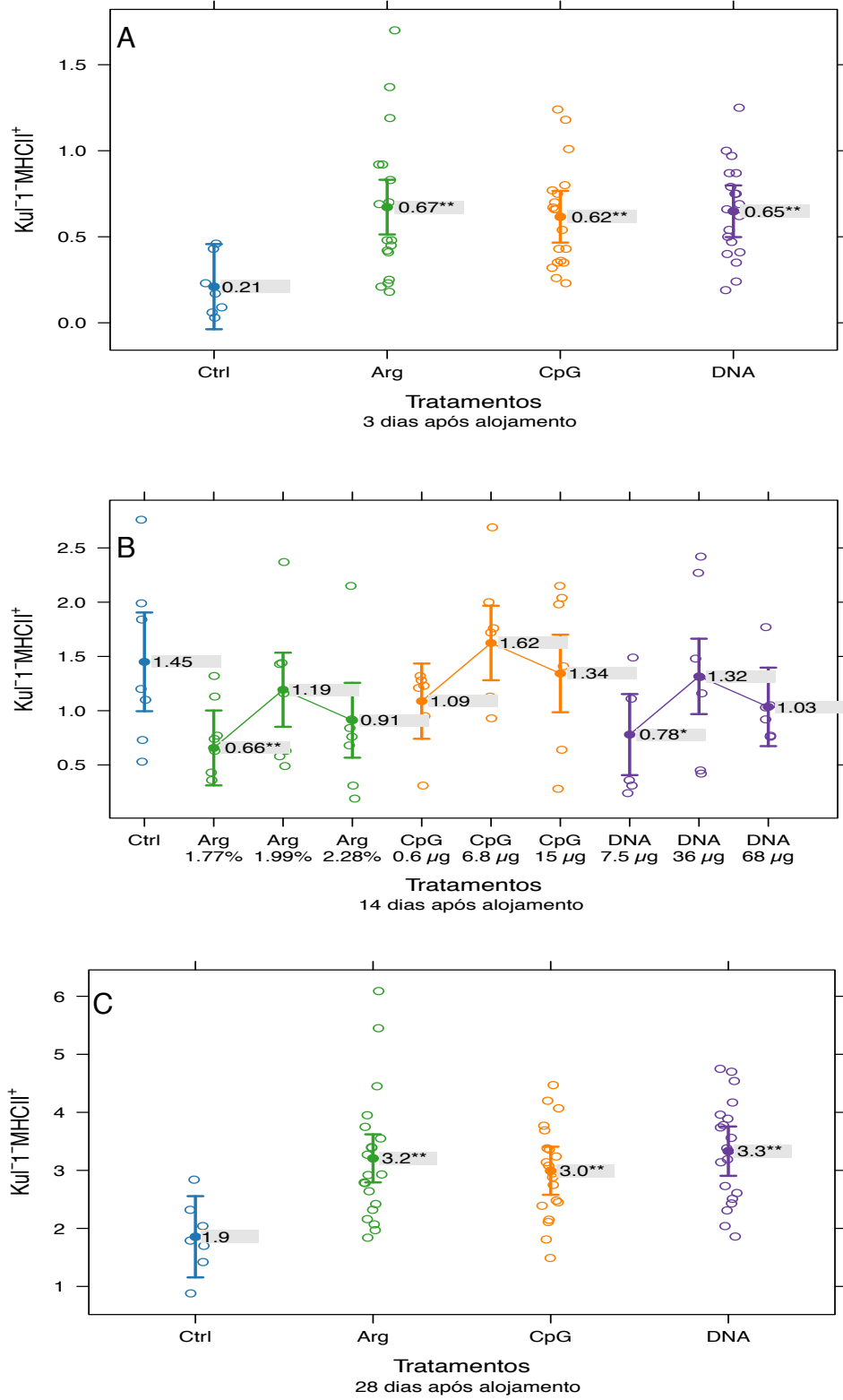
Figura 08 - Monócitos fagocíticos (Kul-01⁺MHCII⁺)

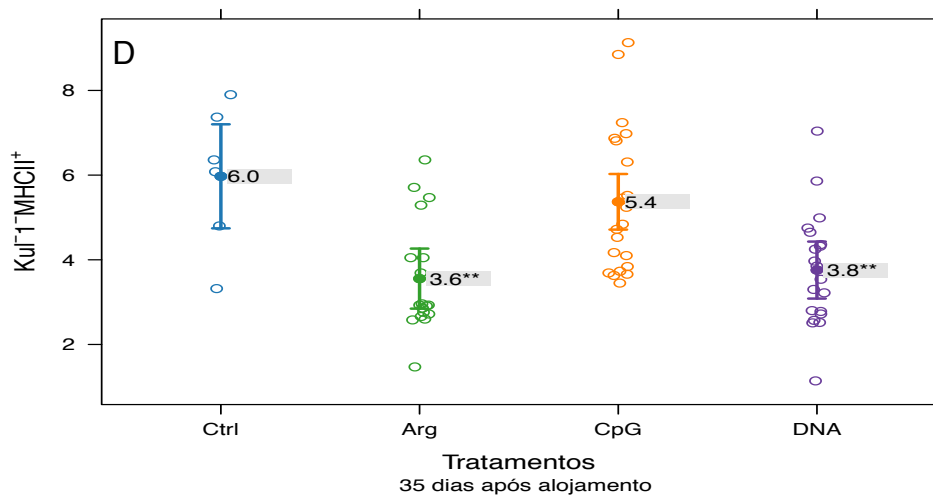
Monócitos fagocíticos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 21 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.9 APC não monócitos

Aos três e 28 dias de idade todos os grupos tratados com DNA total apresentaram maior quantidade de APCs circulantes ($p > 0,01$) (Figuras 9A e 9C, respectivamente). Houve redução da quantidade desta célula circulante aos 14 dias de idade no grupo que recebeu 7,5µg de DNA total ($p < 0,05$) (Figura 9B) e em todos os grupos tratados aos 35 dias ($p < 0,01$) (Figura 9D).

Figura 09 - APC não monócitos (KuI⁺MHCII⁺)





APC não monócitos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 14 dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 35 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.1.10 Monócitos supressores

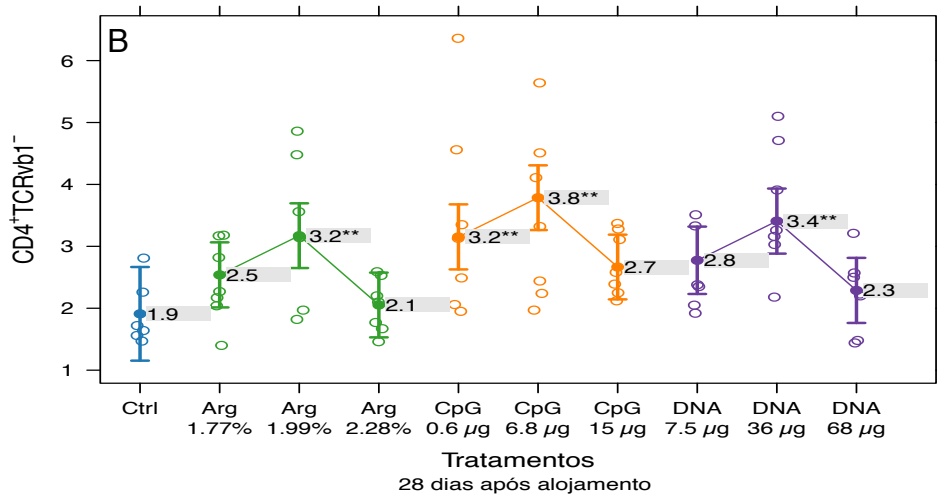
A população de monócitos supressores de resposta circulantes não apresentou diferenças em nenhum grupo tratado com relação ao grupo controle em nenhum das sete idades de coleta.

5.2 Perfil imunológico celular do grupo CpG-ODN

5.2.1 Linfócitos T CD4 gerais

Aos 28 dias os grupos que receberam 0,6 μ g e 6,8 μ g, mas não 15 μ g, apresentaram maior quantidade destas células que o grupo controle ($p < 0,01$) (Figura 1B).

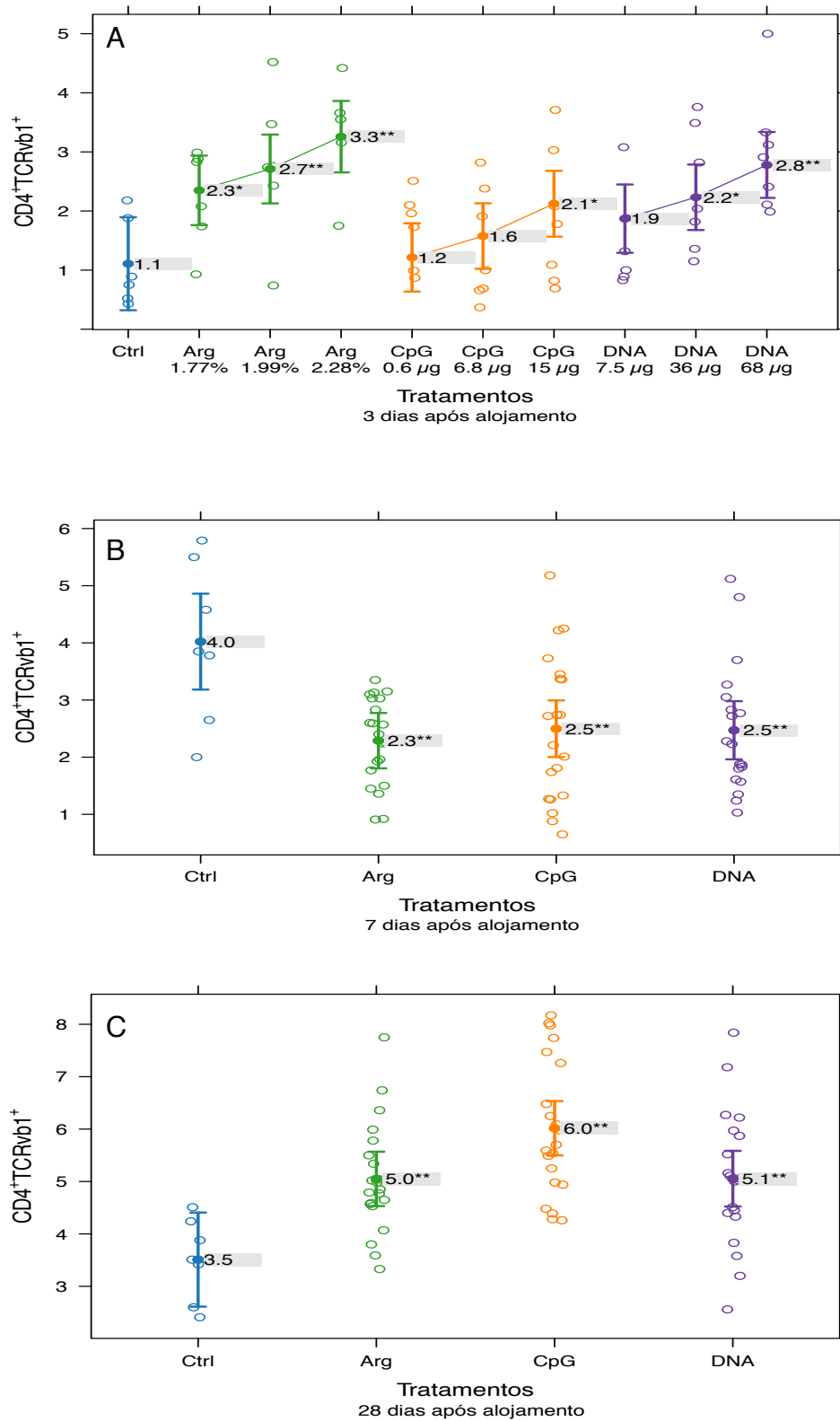
Figura 01 - Linfócitos T CD4 gerais ($CD4^+TCR\beta1^-$)



Linfócitos T CD4 gerais (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). B) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

5.2.2 Linfócitos T CD4 de mucosa

Aos três dias de idade somente o grupo que recebeu 15 μ g apresentou quantidade superior destas células circulantes com relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 2A). Aos sete dias de idade a situação se inverteu, quando todos os grupos tratados com CpG-ODN apresentaram grande redução da quantidade circulante de linfócitos T CD4 de mucosa ($p < 0,01$) (Figura 2B). Aos 28 dias os três grupos tratados apresentaram quantidade superior ao grupo controle ($P < 0,01$) (Figura 2C).

Figura 02 - Linfócitos T CD4 de mucosa (CD4⁺TCR ν β 1⁺)

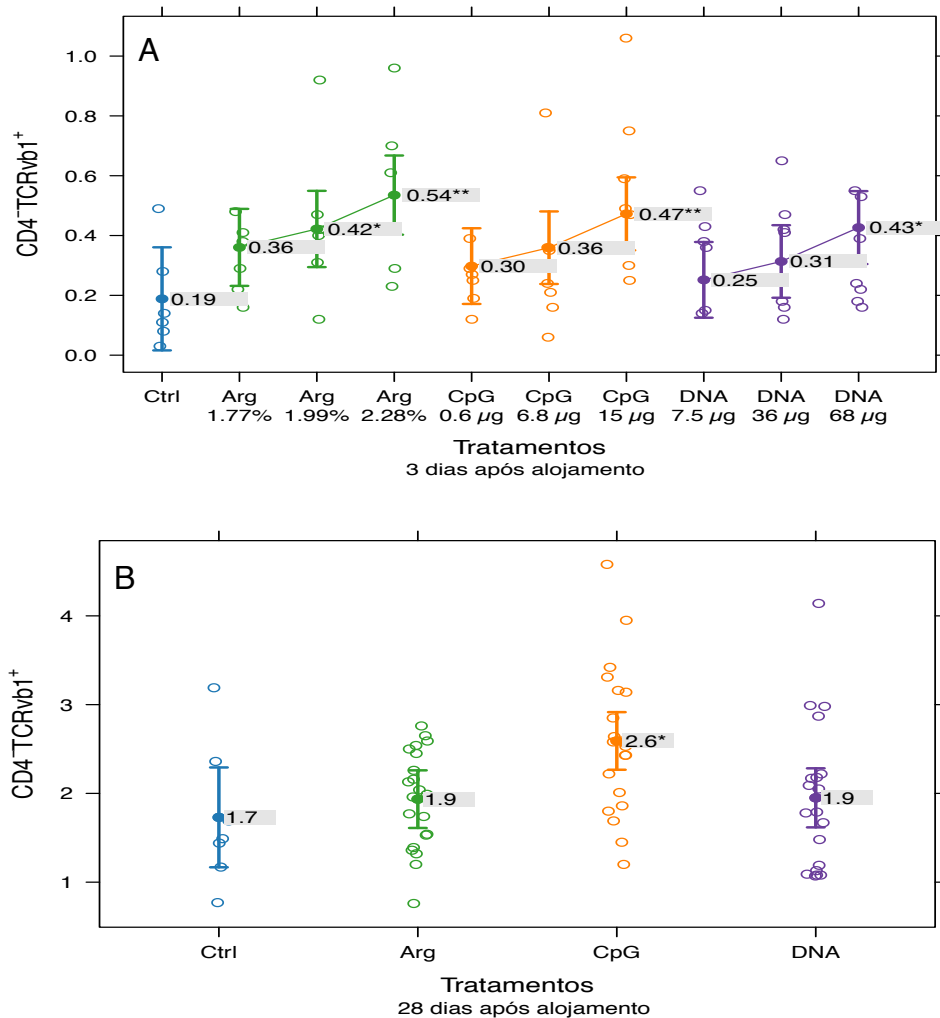
Linfócitos T CD4 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade.

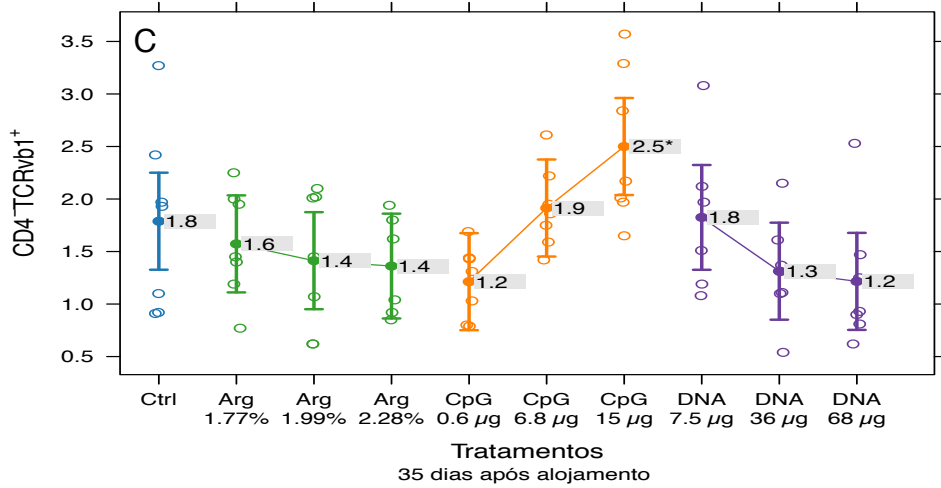
B) aos sete dias de idade. C) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.2.3 Linfócitos T CD8 de mucosa

O grupo que recebeu $15\mu\text{g}$ de CpG-ODN apresentou quantidade superior destas células circulantes em relação ao grupo controle aos três ($p < 0,01$) e 35 dias de idade ($p < 0,05$) (Figuras 3A e C, respectivamente). Aos 28 dias de idade todos os grupos tratados com CpG-ODN apresentaram maior quantidade destas células circulantes que o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 3B).

Figura 03 - Linfócitos T CD8 de mucosa ($\text{CD4}^+\text{TCR}\nu\beta 1^+$)



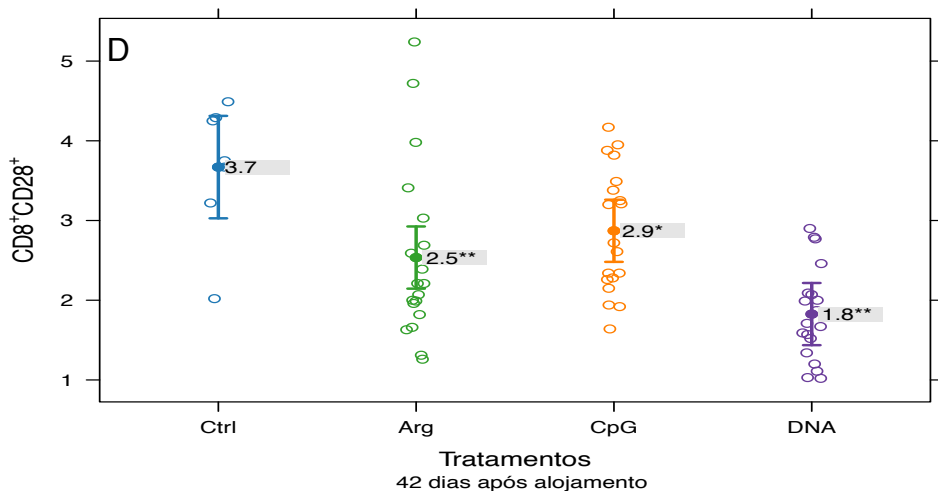


Linfócitos T CD8 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 28 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.2.4 Linfócitos T CD8 não ativados

Os grupos tratados com CpG-ODN apresentaram menor quantidade destas células com relação ao grupo controle aos 42 dias de idade ($p < 0,05$) (Figura 4D).

Figura 04 - Linfócitos T CD8 não ativado (CD8 α^+ CD28 $^+$)



Linfócitos T CD8 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

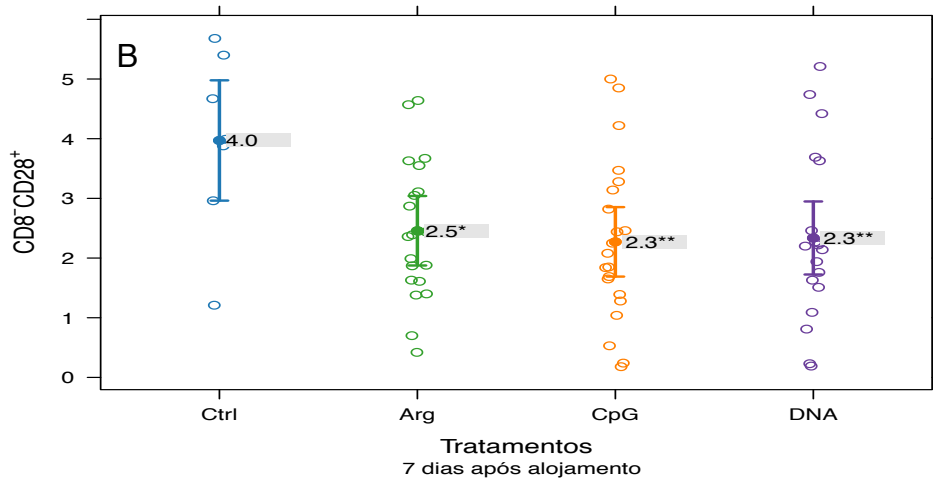
5.2.5 Linfócitos T CD8 ativados

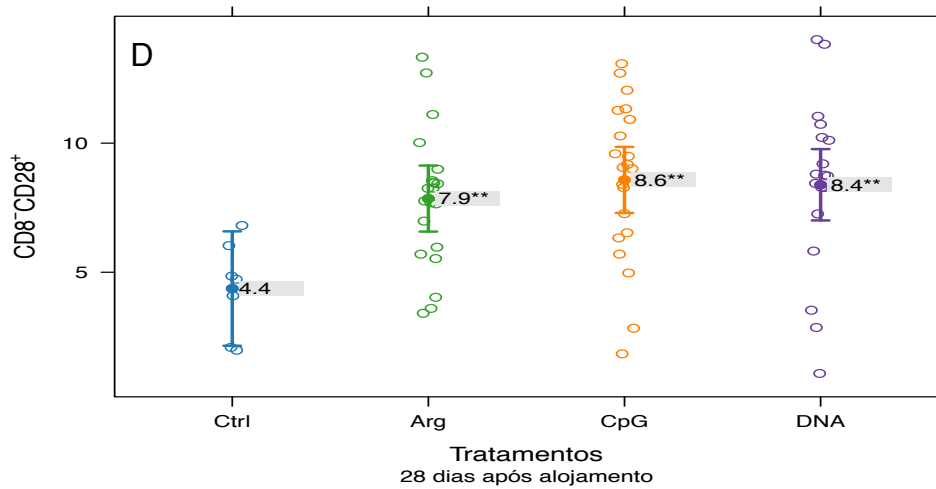
A população de linfócitos T CD8 ativados circulantes não apresentou diferenças em nenhum grupo tratado com relação ao grupo controle em nenhum das sete idades de coleta.

5.2.6 Linfócitos T CD4 não ativados

Aos sete dias de idade todos os grupos CpG-ODN apresentaram menor quantidade circulante destas células ($p < 0,01$) e aos 28 dias de idade a relação é inversa, quando os grupos tratados com CpG-ODN apresentaram maior quantidade dessas células em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$) (Figuras 6B e D, respectivamente).

Figura 06 - Linfócitos T CD4 não ativado ($CD8\alpha^-CD28^+$)



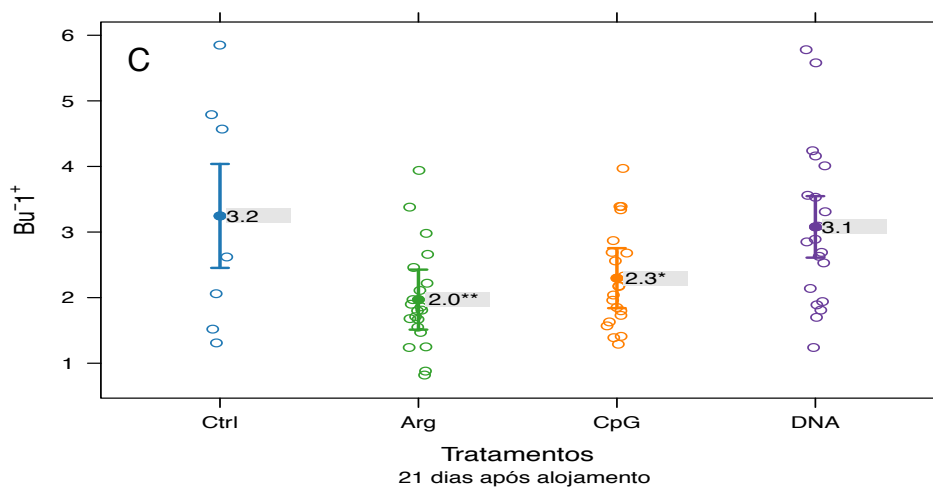


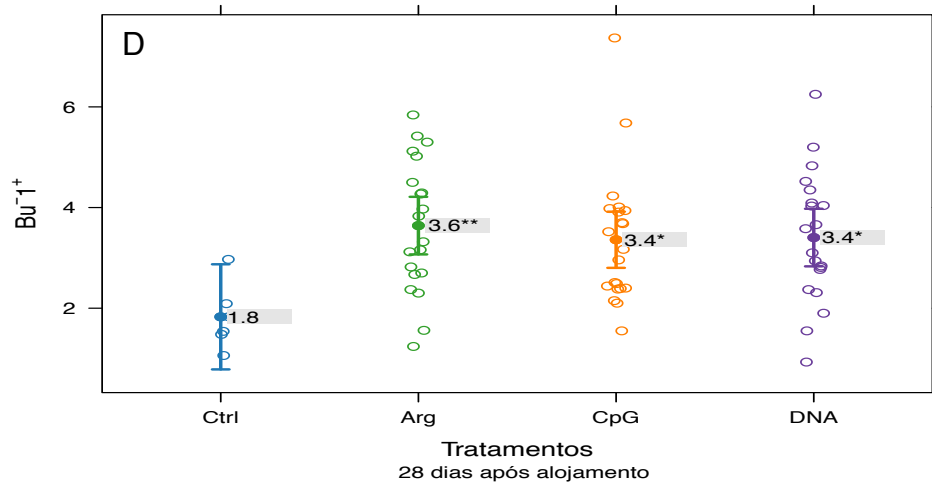
Linfócitos T CD4 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). B) aos sete dias de idade. D) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.2.7 Linfócitos B

Aos 21 dias todos os grupos tratados apresentaram menor quantidade de linfócitos B circulantes que o grupo controle ($p < 0,05$) e aos 28 dias a relação foi inversa, ocorrendo aumento dos níveis nos grupos tratados em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figuras 7C e D, respectivamente).

Figura 07 - Linfócitos B (Bu-1⁺)

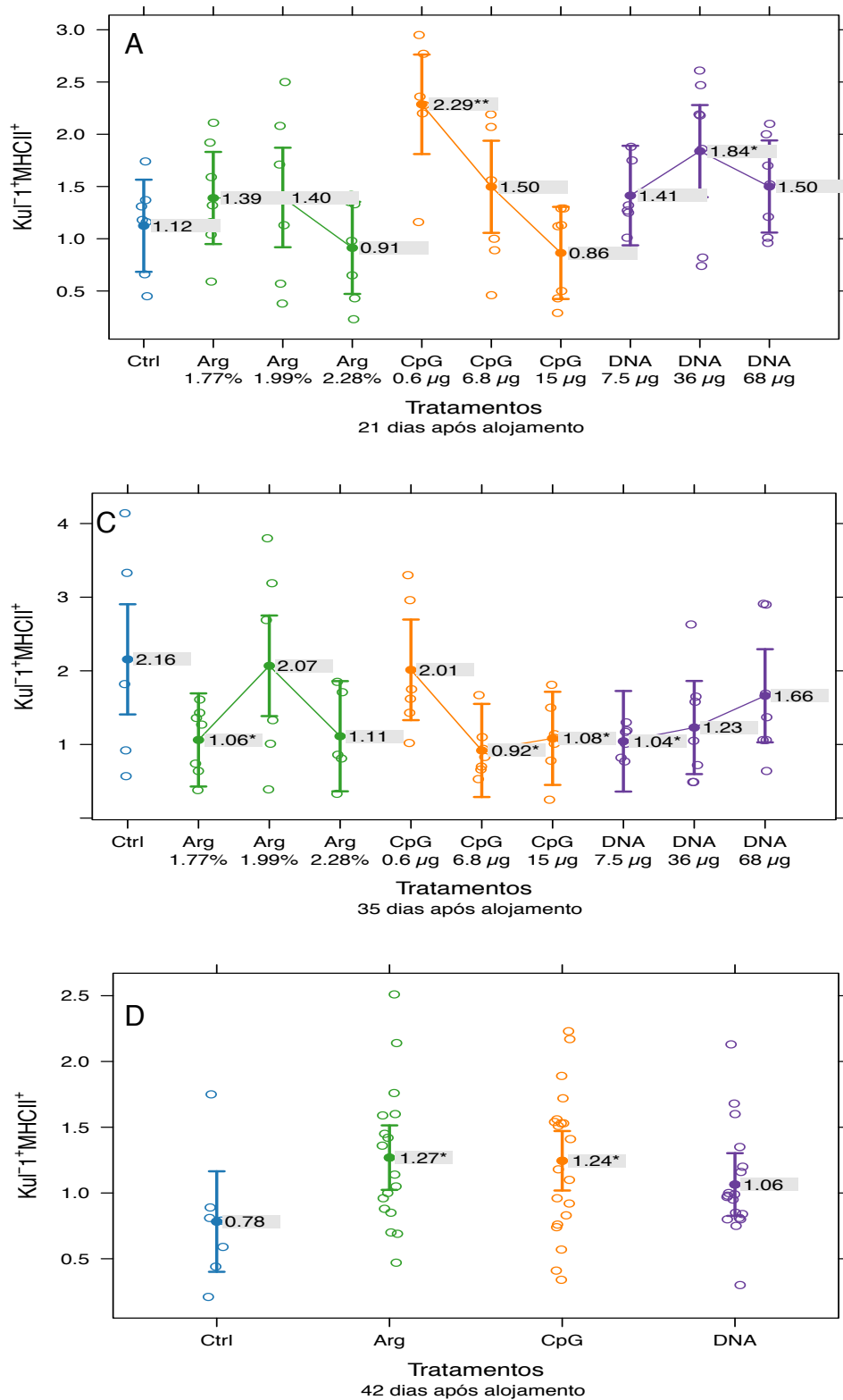




Linfócitos B (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). C) aos 21 dias de idade. D) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.2.8 Monócitos fagocíticos

Aos 21 dias de idade o grupo que recebeu 0,6 μ g de CpG-ODN apresentou maior quantidade destas células circulantes comparando-se ao grupo controle ($p < 0,01$) (Figura 8A). Aos 35 dias de idade tanto o grupo que recebeu a dose intermediária (6,8 μ g) quanto o que recebeu a maior dose (15 μ g) de CpG-ODN apresentaram menor quantidade destas células circulantes quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 8C). Aos 42 dias todos os grupos tratados com CpG-ODN apresentaram maior quantidade de monócitos fagocíticos circulantes ($p < 0,05$) (Figura 8D).

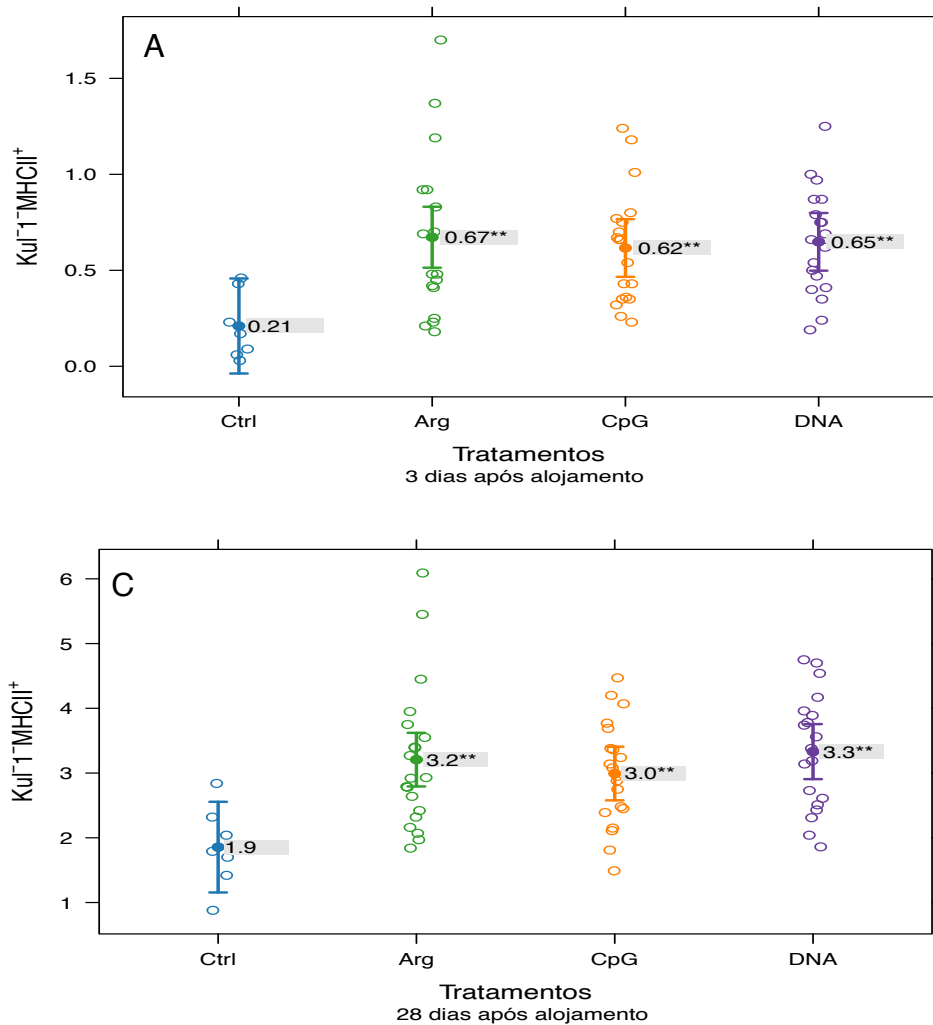
Figura 08 - Monócitos fagocíticos (Kul-01⁺MHCII⁺)

Monócitos fagocíticos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 21 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.2.9 APC não monócitos

Aos três e 28 dias de idade todos os grupos tratados com CpG-ODN apresentaram maior quantidade de APCs que o grupo controle ($p < 0,01$) (Figura 9A e C, respectivamente).

Figura 09 - APC não monócitos ($Kul1^{+}MHCII^{+}$)

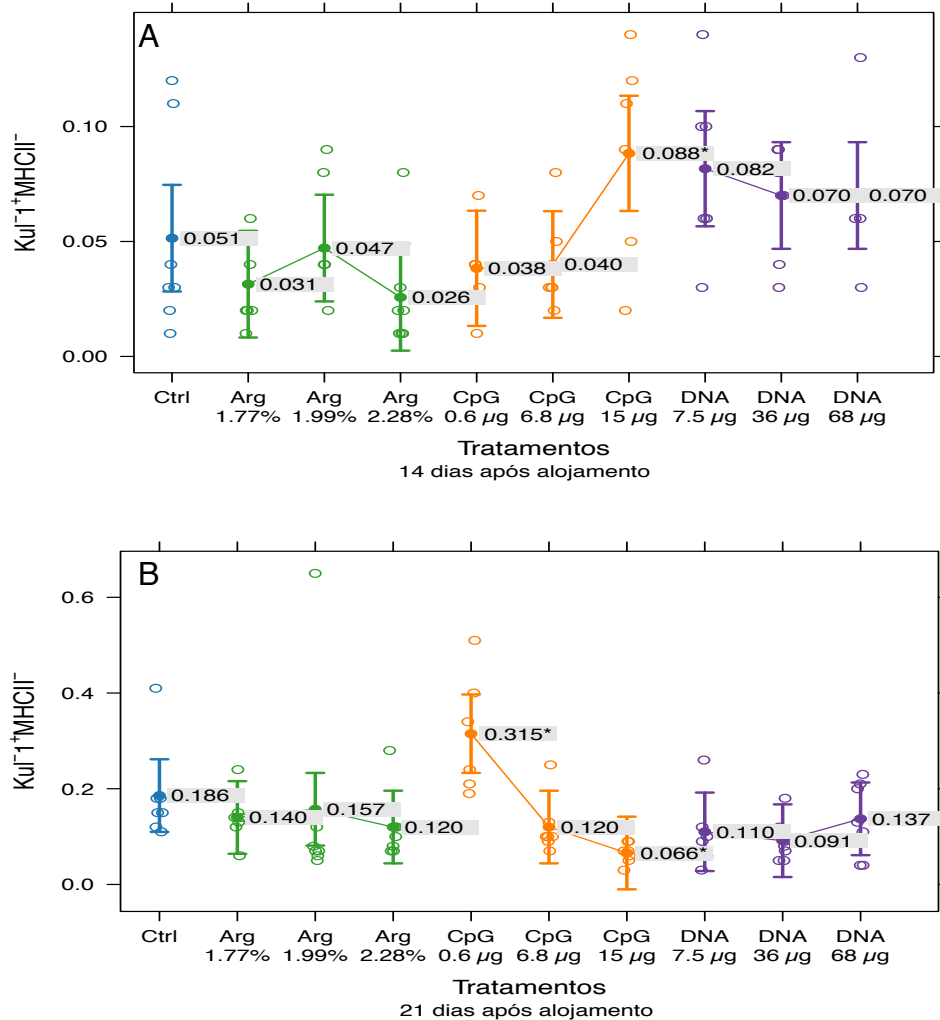


APC não monócitos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. C) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

5.2.10 Monócitos supressores

Aos 14 dias de idade o grupo tratado com 15µg de CpG-ODN apresentou maior quantidade destas células em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), mas aos 21 dias de idade a quantidade observada foi menor ($p < 0,05$) (Figura 10A e B, respectivamente). O grupo que recebeu 0,6µg apresentou maior quantidade de monócitos supressores circulantes com relação ao grupo controle aos 21 dias de idade ($p < 0,05$) (Figura 10B).

Figura 10 - Monócitos supressores de reposta ($Kul-01^+MHCII^-$)



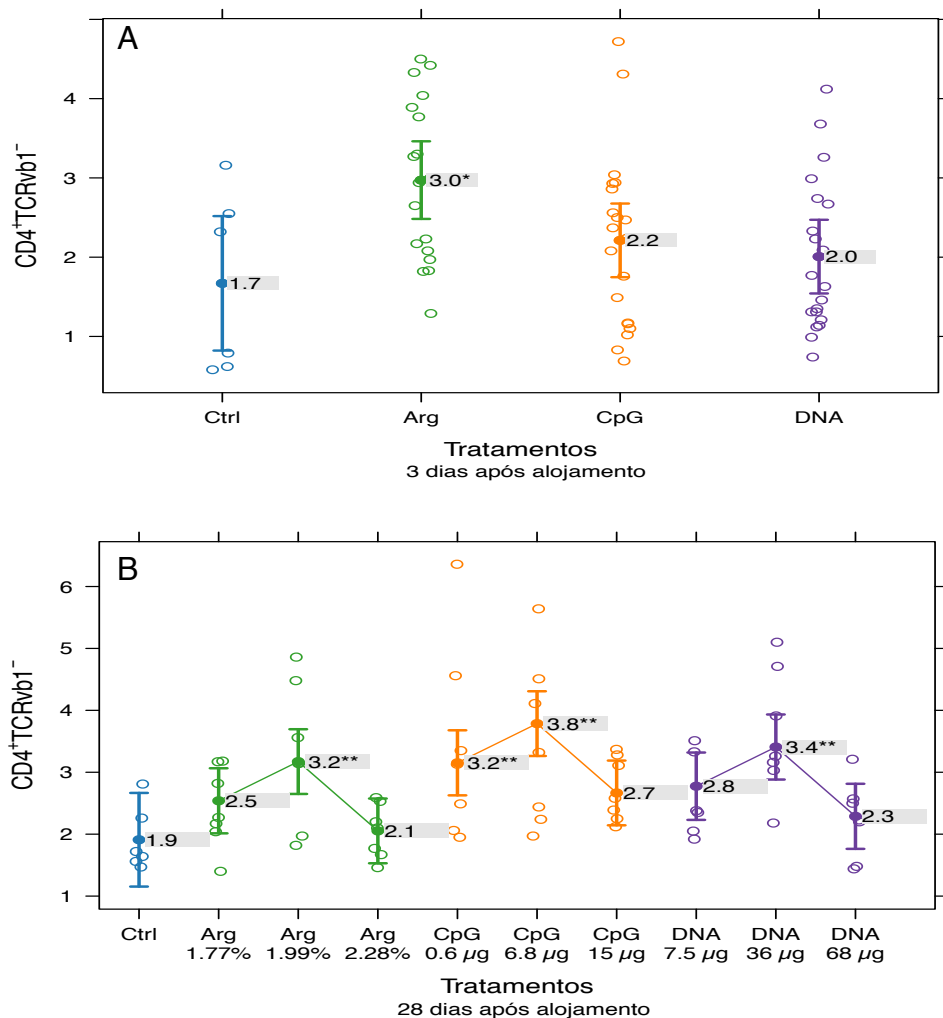
Monócitos supressores (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 14 dias de idade. B) aos 21 dias de idade. Diferenças expressas como * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

5.3 Perfil imunológico celular do grupo Arginina

5.3.1 Linfócitos T CD4 gerais

Todos os grupos tratados apresentaram aos 3 dias de idade quantidade superior em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 1 A). Aos 28 dias de idade o grupo que recebeu ração com 1,99% de arginina apresentou quantidade circulante superior destas células ($p < 0,01$) (Figuras 1 B).

Figura 01 - Linfócitos T CD4 gerais ($CD4^+TCR\beta1^-$)



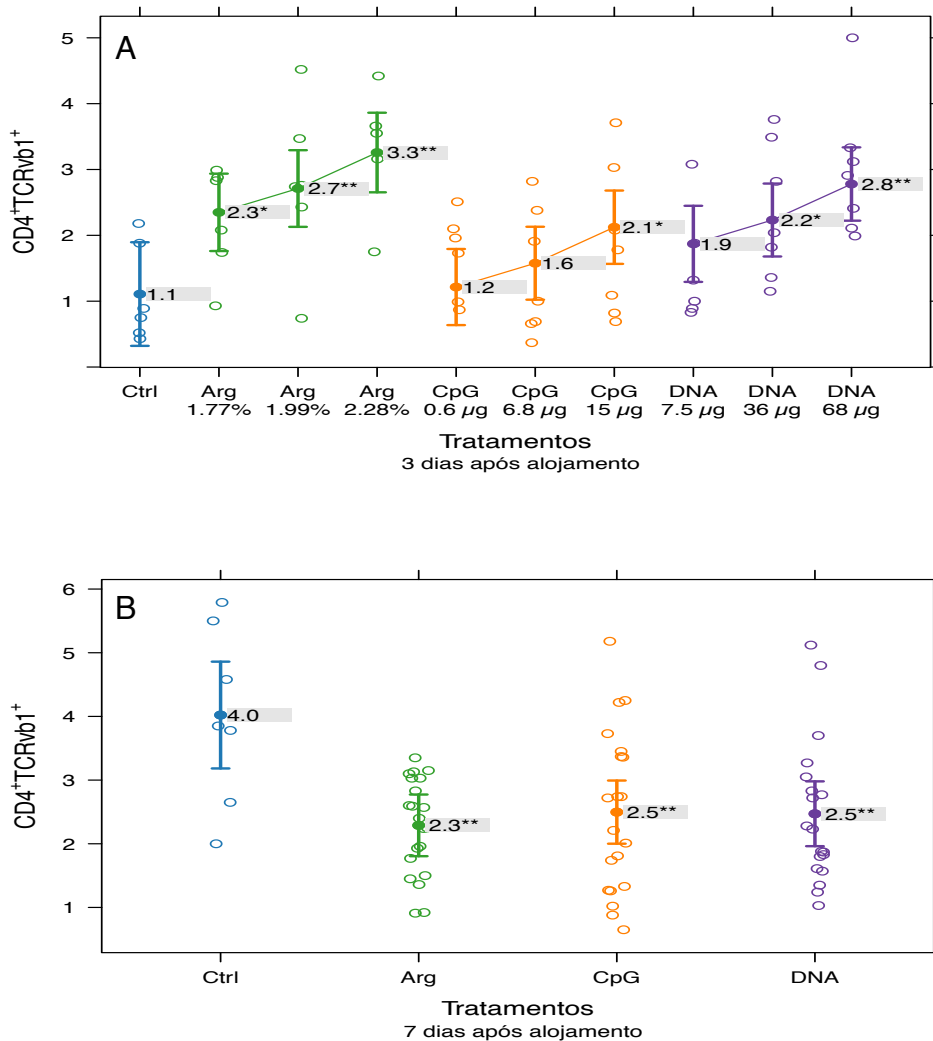
Linfócitos T CD4 gerais (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como * $(p < 0,05)$ e ** $(p < 0,01)$.

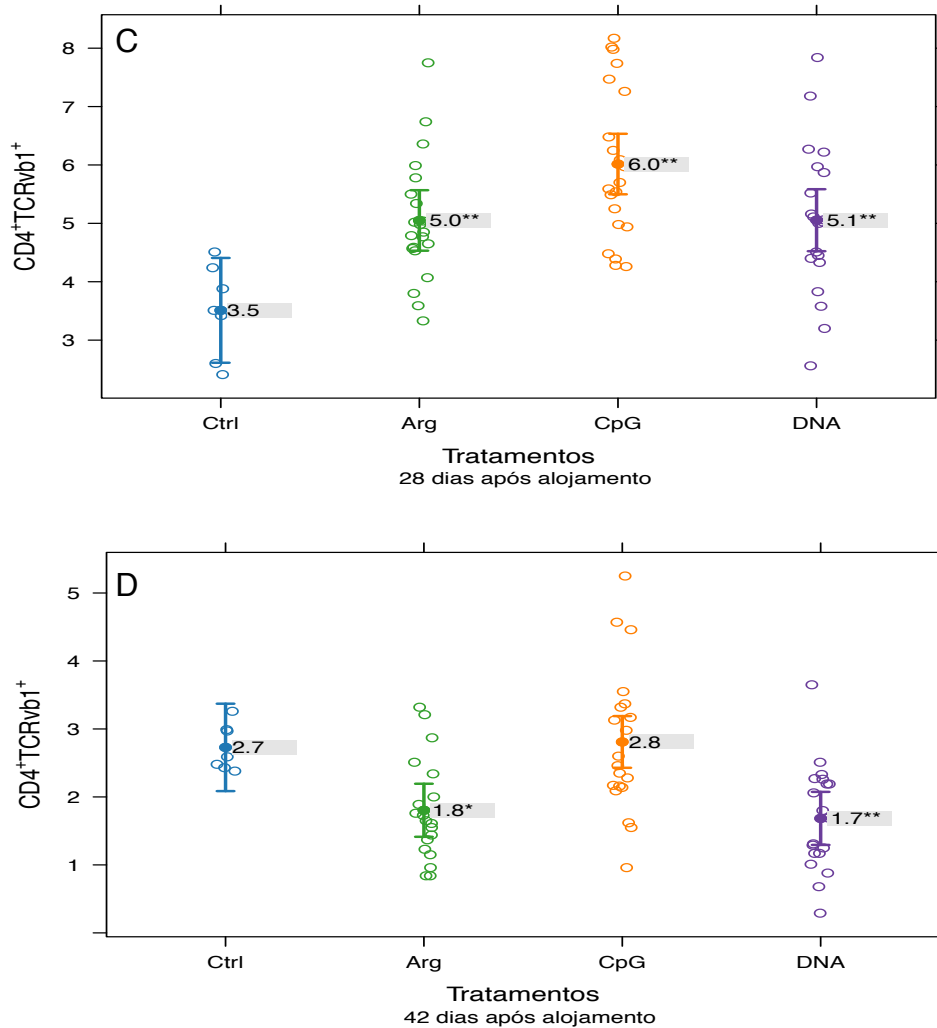
5.3.2 Linfócitos T CD4 de mucosas

Aos 3 dias de idade houve um aumento na quantidade circulante de linfócitos T CD4 de mucosas em todos os grupos que receberam arginina na ração na concentração de 1,77% ($p < 0,05$), 1,99% ($p < 0,01$) e 2,28% ($p < 0,01$). Aos 7 dias de idade a quantidade foi menor em todos os grupos tratados ($p < 0,01$) (Figuras 2A e B, respectivamente).

Um novo aumento ocorreu aos 28 dias de idade em todos os grupos tratados ($p < 0,01$) e aos 42 dias de idade a quantidade foi menor ($p < 0,05$) (Figuras 2C e D, respectivamente).

Figura 02 - Linfócitos T CD4 de mucosa ($CD4^+TCR\beta 1^+$)

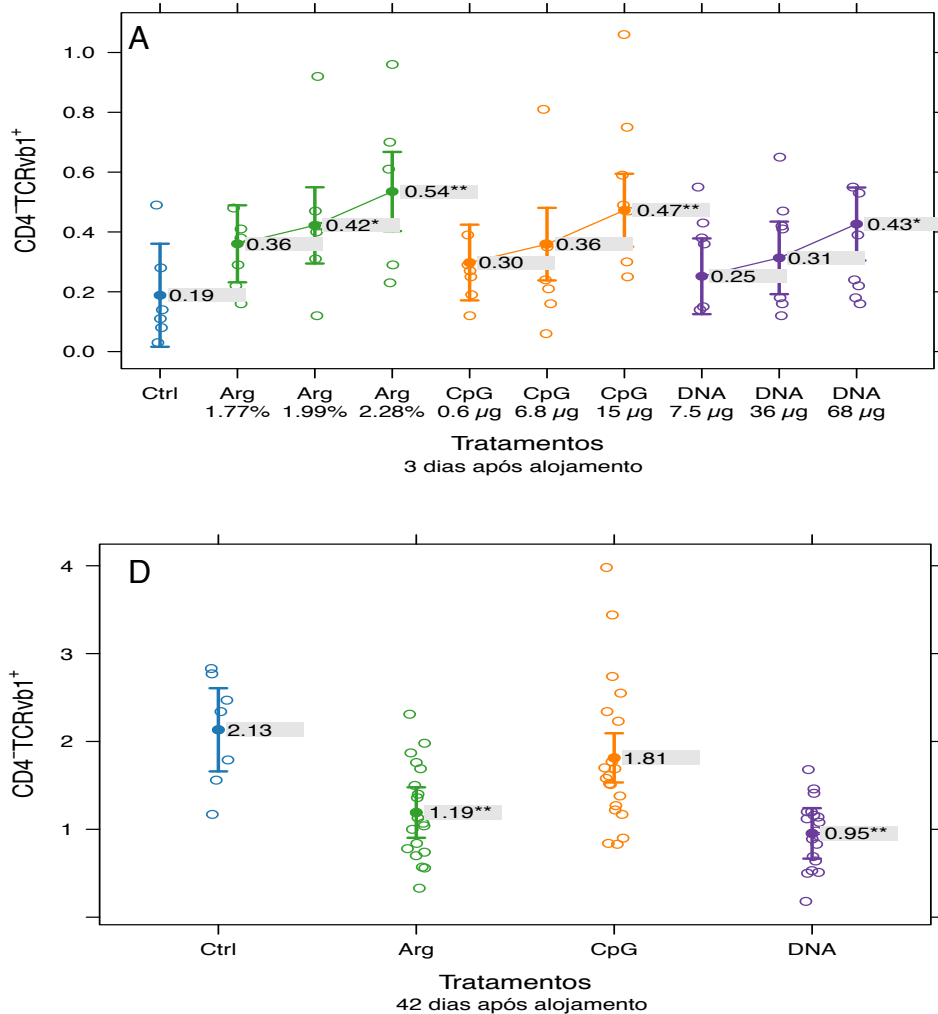




Linfócitos T CD4 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos sete dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.3.3 Linfócitos T CD8 de mucosa

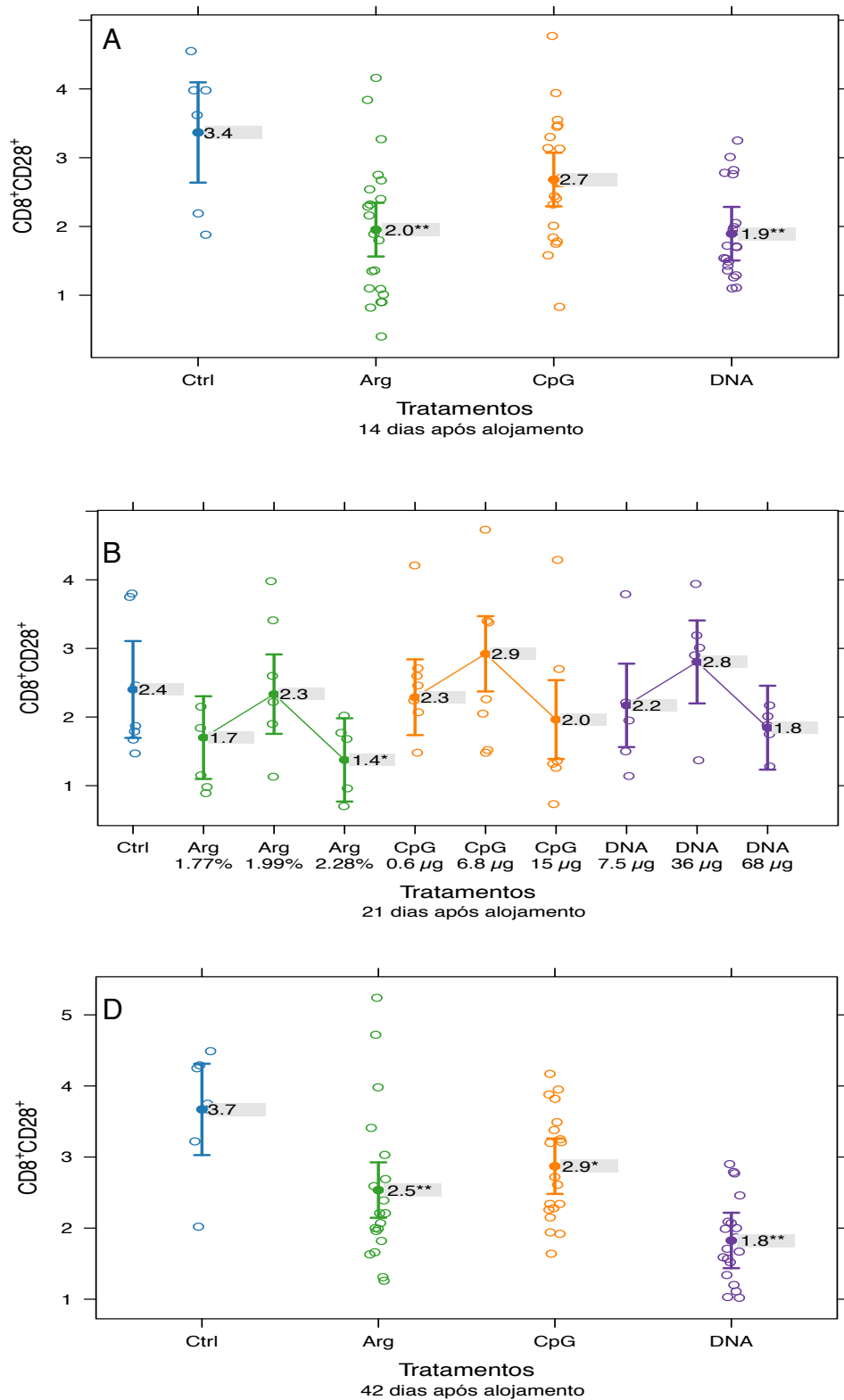
Aos três dias de idade os grupos com nível total de arginina na ração de 1,99% e 2,28% apresentaram maior quantidade circulantes destas células ($p < 0,05$ e $< 0,01$, respectivamente). Aos 42 dias de idade todos os grupos apresentaram menor quantidade ($p < 0,01$) (Figuras 3A e D, respectivamente).

Figura 03 - Linfócitos T CD8 de mucosa (CD4-TCR $\nu\beta 1^+$)

Linfócitos T CD8 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.3.4 Linfócitos T CD8 não ativados

Aos 14 e 42 dias de idade todos os grupos tratados apresentaram menor quantidade de células circulantes ($p < 0,01$) (Figuras 4A e D, respectivamente). O grupo que recebeu ração com maior concentração de arginina (2,28%) mostrou menor quantidade circulante também aos 21 dias ($p < 0,05$) (Figura 4B).

Figura 04 - Linfócitos T CD8 não ativado ($CD8\alpha^+CD28^+$)

Linfócitos T CD8 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 14 dias de idade. B) aos 21 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.3.5 Linfócitos T CD8 ativados

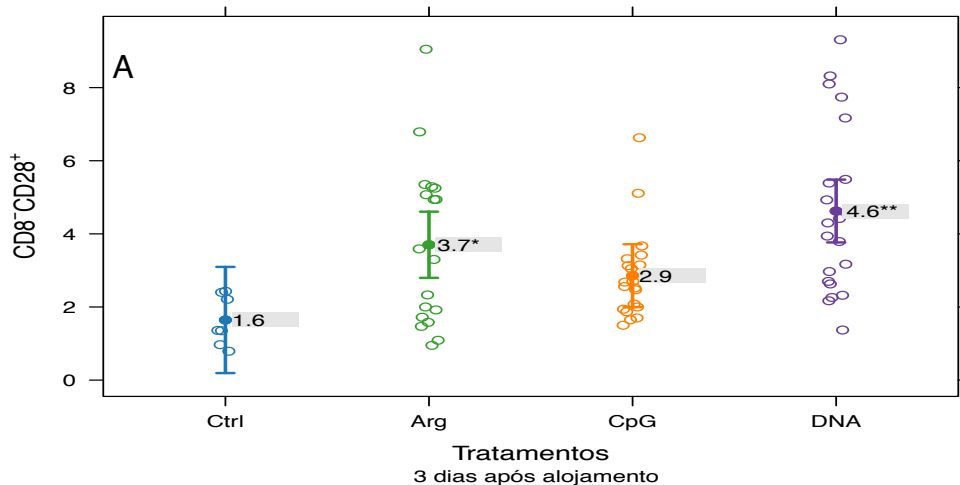
A população de linfócitos T CD8 ativados circulantes não apresentou diferenças em nenhum grupo tratado com relação ao grupo controle em nenhum das sete idades de coleta.

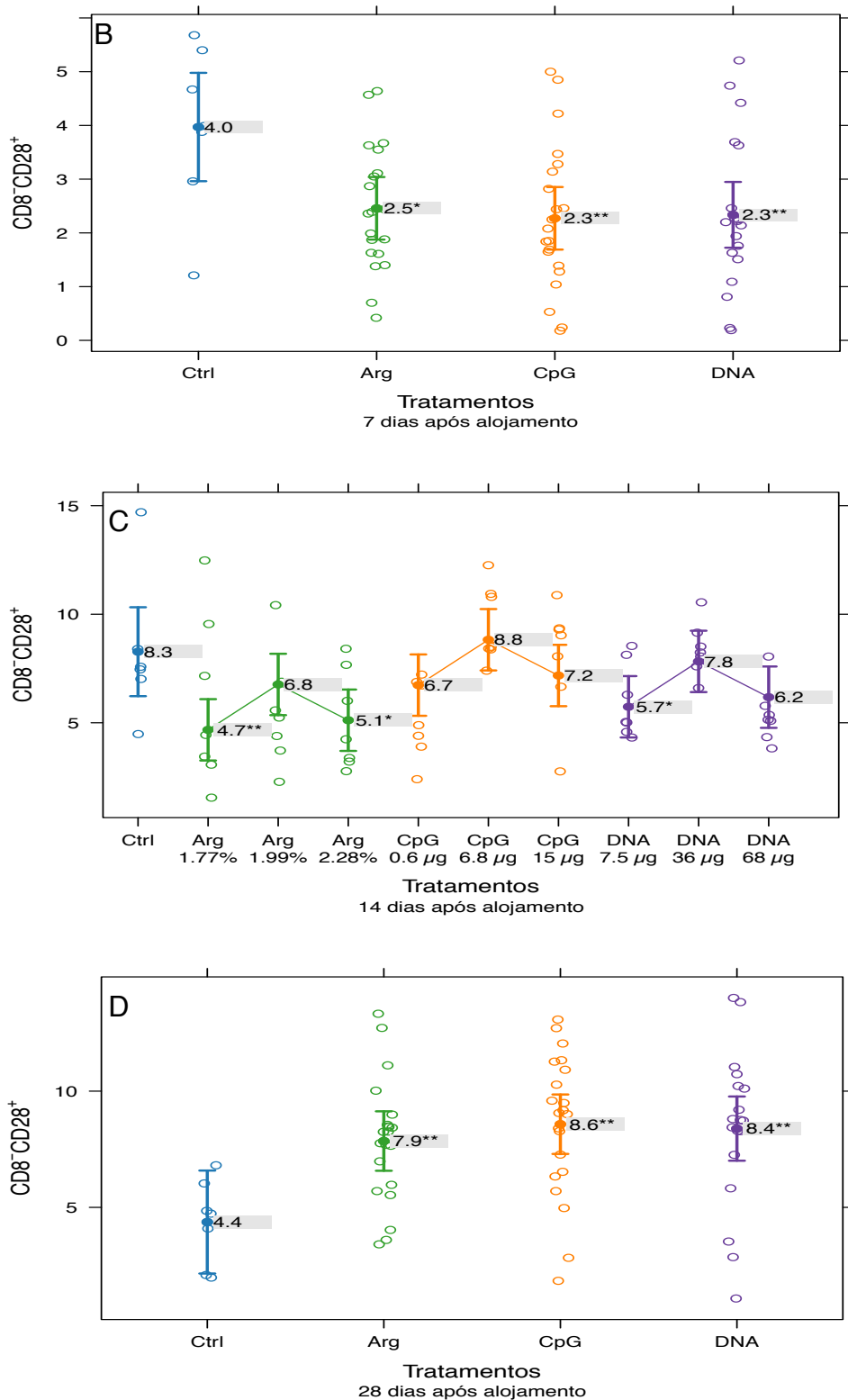
5.3.6 Linfócitos T CD4 não ativados

Aos três dias de idade houve um aumento nestas células em todos os grupos tratados ($p < 0,05$). Aos sete dias a quantidade de células foi menor ($p < 0,05$) (Figuras 6A e B, respectivamente).

Aos 14 dias de idade ambos os grupos tratados com nível de arginina total na ração de 1,77% e 2,28% manifestaram menor quantidade circulante destas células ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Aos 28 dias de idade todos os grupos tratados apresentaram maior quantidade circulante destas células ($p < 0,01$) (Figuras 6C e D, respectivamente).

Figura 06 - Linfócitos T CD4 não ativado ($CD8\alpha^-CD28^+$)



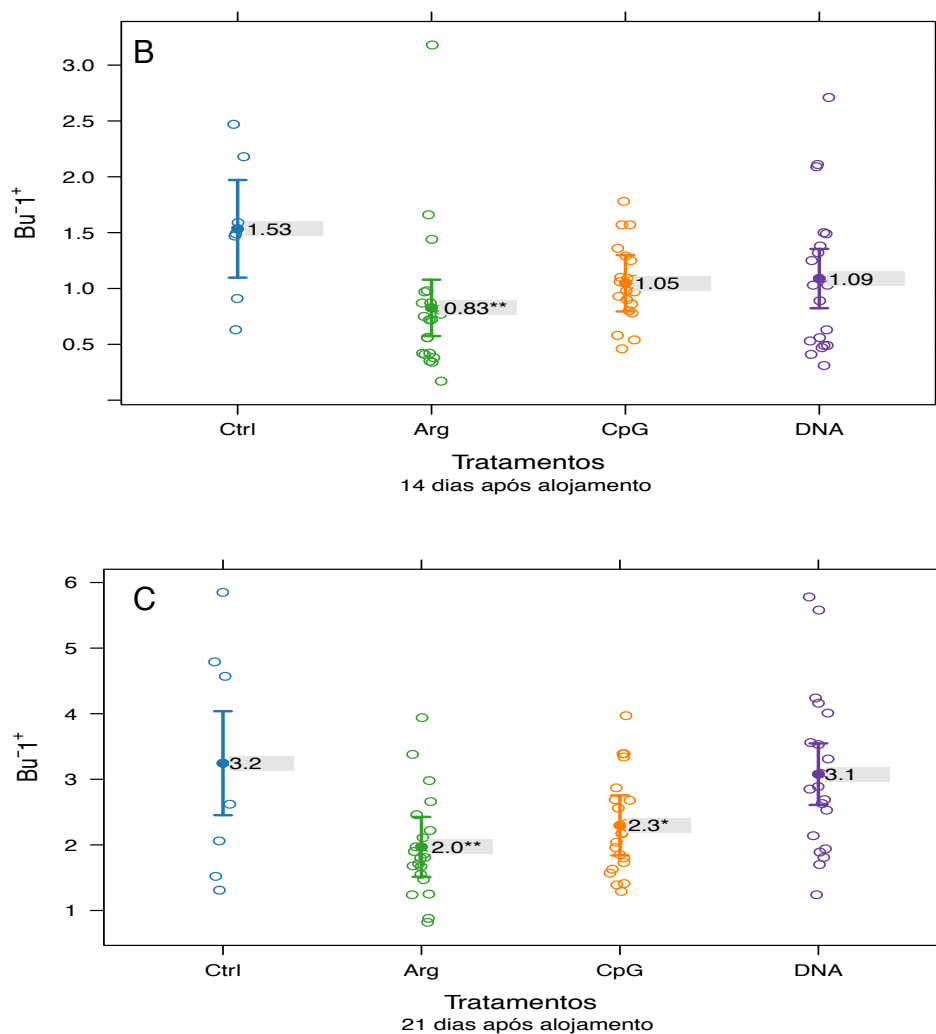


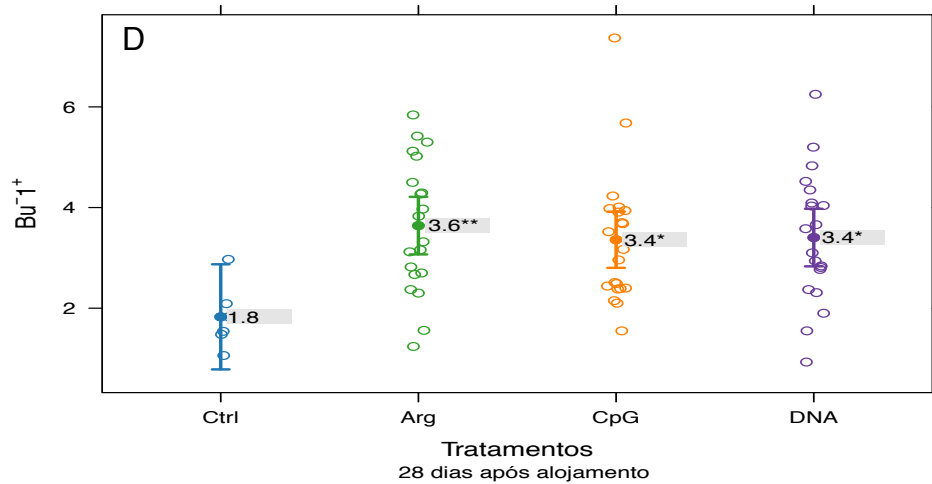
Linfócitos T CD4 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos sete dias de idade. C) aos 14 dias de idade. D) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.3.7 Linfócito B

Os níveis celulares se mantiveram abaixo do controle em todos os grupos tratados aos 14 e 21 dias de idade ($p < 0,01$). Aos 28 dias todos os grupos tratados apresentaram maior nível desta célula ($p < 0,01$) (Figuras 7B, C e D, respectivamente).

Figura 07 - Linfócitos B ($Bu-1^+$)



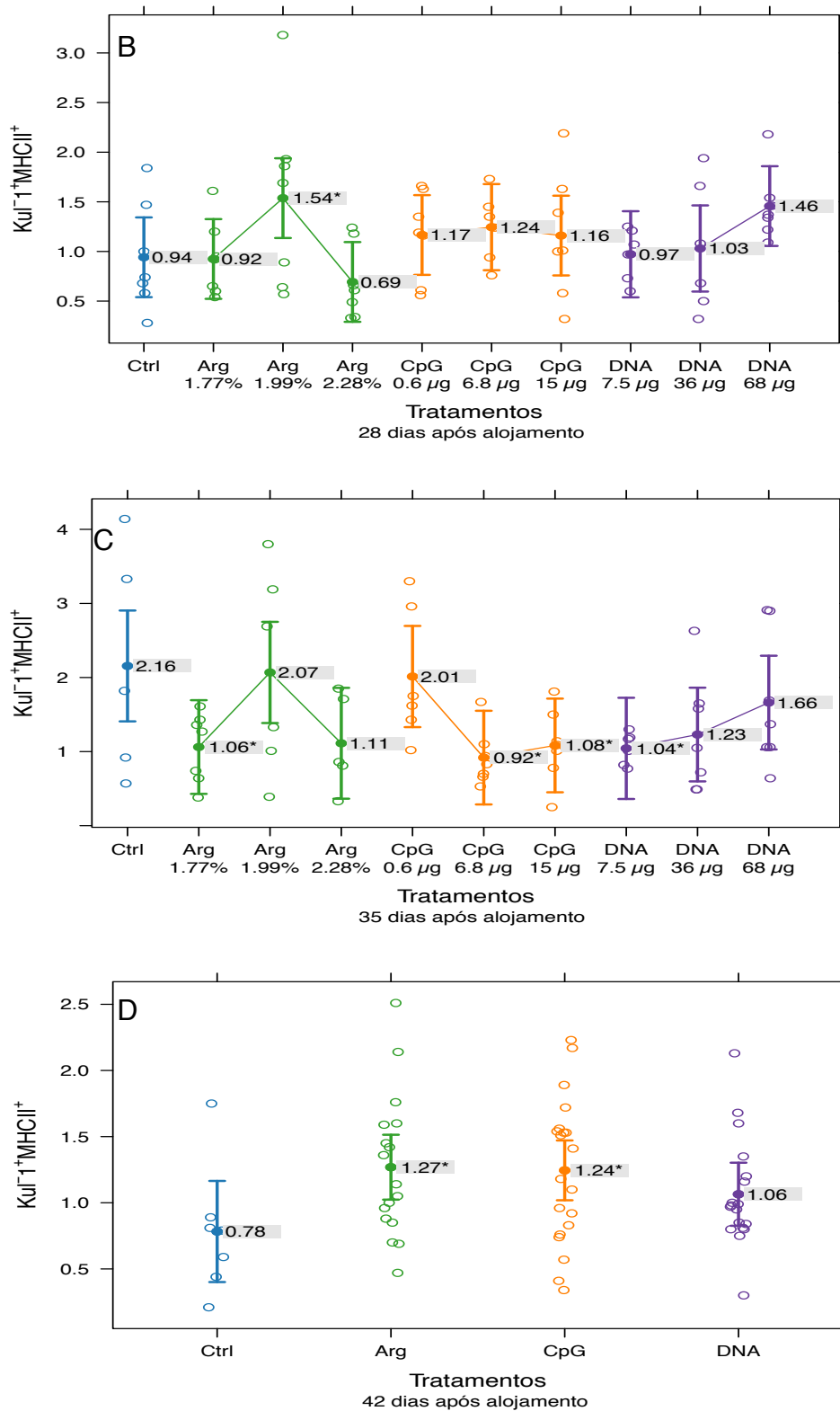


Linfócitos B (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). B) aos 14 dias de idade. C) aos 21 dias de idade. D) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.3.8 Monócitos fagocíticos

Aos 28 dias de idade o grupo que recebeu 1,99% de arginina na alimentação apresentou maior quantidade circulante destas células ($p < 0,05$), comportamento diferente do grupo que recebeu 1,77% de arginina na alimentação, que apresentou, aos 35 dias, menor quantidade circulante destas células ($p < 0,05$) (Figuras 8B e C, respectivamente).

Aos 42 dias de idade todos os grupos tratados apresentaram maior nível destas células ($p < 0,05$) (Figura 8D).

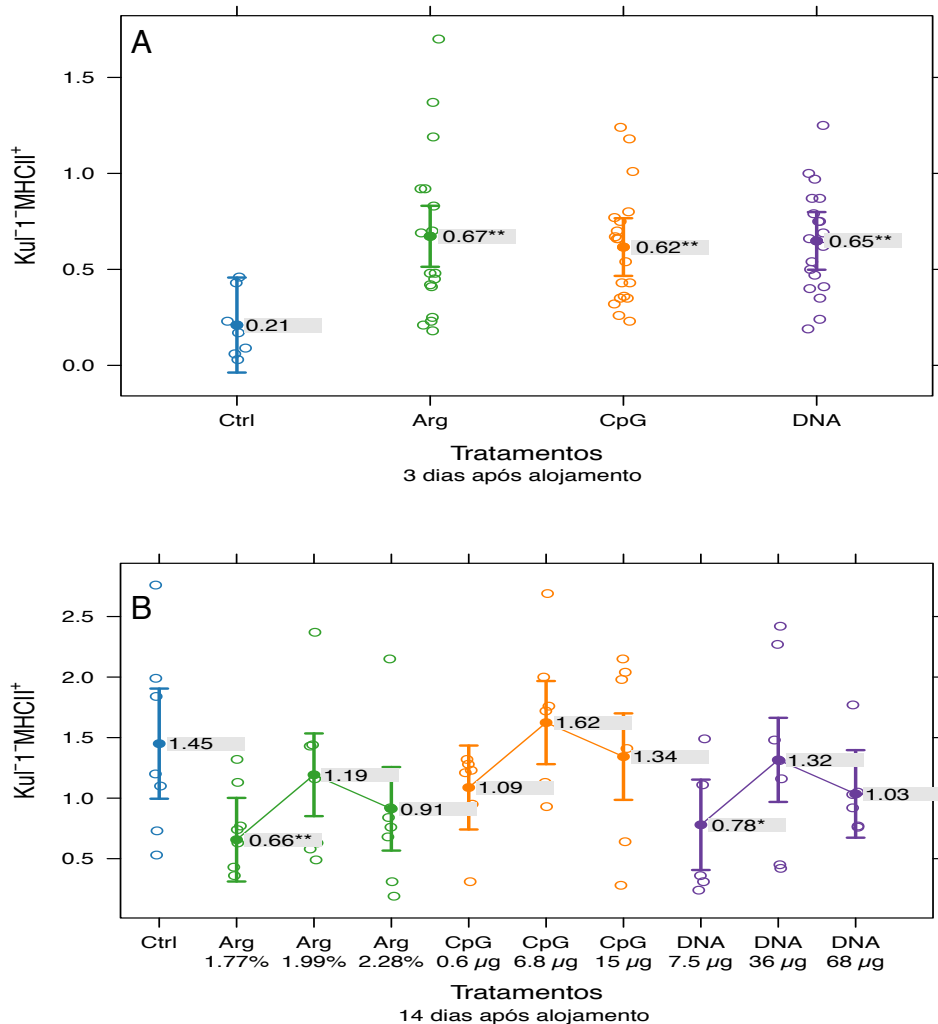
Figura 08 - Monócitos fagocíticos (Kul-01⁺MHCII⁺)

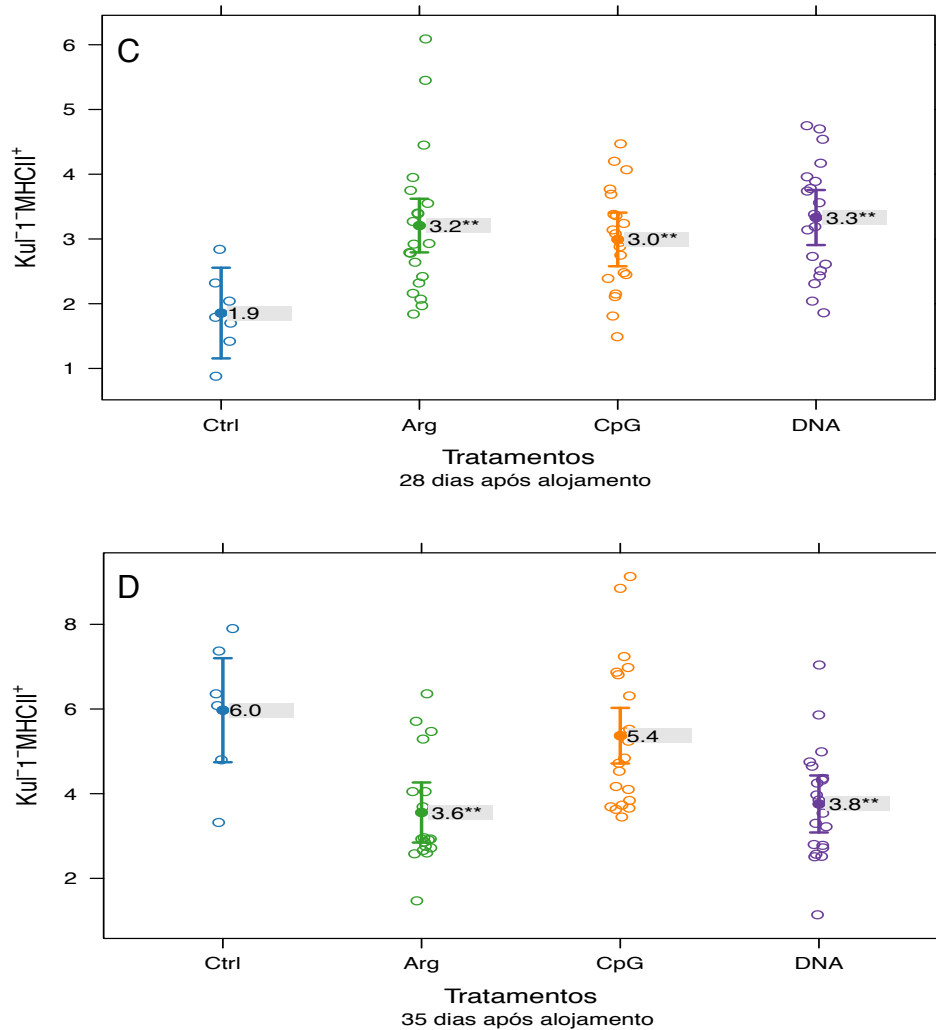
Monócitos fagocíticos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). B) aos 28 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.3.9 APC não monócitos

Aos três e 28 dias de idade todos os grupos tratados apresentaram maior quantidade destas células circulantes ($p < 0,01$). Já aos 14 dias de idade, o grupo que recebeu 1,77% de arginina na alimentação apresentou menor quantidade celular ($p < 0,01$), comportamento semelhante ao observado aos 35 dias de idade, em que todos os grupos tratados apresentaram menor quantidade ($p < 0,01$) (Figuras 9A, C, B e D, respectivamente).

Figura 09 - APC não monócitos (KuI-01-MHCII⁺)





APC não monócitos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 14 dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 35 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

5.3.10 Macrófagos supressores

A população de macrófagos supressores de resposta circulantes não apresentou diferenças em nenhum grupo tratado com relação ao grupo controle em nenhum das sete idades de coleta.

5.4 Variação do peso vivo

Não foi observada nenhuma diferença no peso vivo dos animais dos grupos tratados com relação ao controle em nenhum momento do período experimental (Figura 11).

5.5 Mensuração de órgãos linfoides

Não foi observada nenhuma alteração em tamanho ou peso dos órgãos timo, baço e bolsa cloacal dos grupos tratados com relação ao controle aos três e sete dias de idade. Também não foi encontrada nenhuma relação entre o peso ou tamanho dos órgãos e os parâmetros imunes observados na citometria de fluxo (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

Os imunomoduladores testados influenciaram na imunomodulação em frangos de corte e as populações celulares variaram em intensidade, duração, momento e tipo de resposta, indicando um efeito dose-dependente em alguns casos para alguns tipos celulares. A complementariedade de respostas, ou seja, diferentes tipos celulares respondendo a um mesmo tratamento pode ser notada em todos os grupos tratados. Isto indica que a ação dos imunomoduladores mesmo sendo forte a um tipo específico de célula, o sistema imunológico como um todo acaba sendo afetado visto que as células de defesa se comunicam e se influenciam mutuamente.

Os resultados obtidos apontam o papel destes imunomoduladores na alteração dos parâmetros imunes e evidenciam quais elementos do sistema imunológico participam do mecanismo de ação destas moléculas.

Muitos dos dados nos mostram uma tendência dose-dependente que alguns imunomoduladores causam no sistema imunológico. Por exemplo, a população CD4⁺TCR γ β 1⁺ aos três dias de idade mostra ser influenciada, em diferentes intensidades, a doses crescentes de todos os imunomoduladores testados, tendo aquele grupo de maior dose apresentando maior quantidade celular circulante que o grupo de menor dose dentro do mesmo grupo. Em alguns casos, a dose intermediária culmina em

maior ou menor quantidade de células circulantes, contrapondo as outras duas doses.

A relação dose-dependente não segue um padrão comum a todas as células, mesmo dentro do mesmo grupo. A avaliação da dose mais efetiva deve levar em consideração todas as variações pontuais, porque a dose pode variar dependendo do tipo de resposta pretendida.

Os diferentes efeitos dose-dependentes podem ser verificados também em CD4⁺TCRvβ1⁺ 35 dias (Figura 3C), CD4⁺TCRvβ1⁺ 3 dias (Figura 2A), CD4⁺TCRvβ1⁻ 28 e 35 dias (Figuras 1B e C, respectivamente), CD8α⁺CD28⁺ 14 dias (Figura 6C), CD8α⁺CD28⁺ 21 dias (Figura 4B), Kul-1⁺MHCII⁻ 14 dias, notadamente grupo Arginina (Figura 10A), e 21 dias (Figura 10B), Kul-1⁺MHCII⁺ 21, 28 e 35 dias (Figuras 8A, B e C, respectivamente), Kul-1⁻MCHII⁺ 14 dias (Figura 9B).

Os quadros 04 a 15 resumem as diferenças significativas entre os grupos controle e que receberam um dos três tratamentos, nas três doses, para as diferentes populações celulares analisadas. Já os quadros 15 a 18 mostram as diferenças dos mesmos tipos celulares entre os diferentes grupos tratados. Todos os quadros (04 a 19) servem de auxílio para melhor visualizar as dinâmicas das alterações das populações ao longo do tempo.

Devido as particularidades de respostas imunes a discussão será conduzida tratando individualmente cada imunomodulador e seu papel na interação com as células do sistema imunológico aviário nos momentos observados.

6.1 DNA total

Os dados mostram que a imunomodulação decorrente da administração de DNA total ocorre em dois períodos, sendo um mais precoce (três e sete dias de idade) e outro mais tardio (28 e 35 dias de idade).

A resposta precoce, já aos três dias de idade, chama a atenção, em todas as doses, pelo aumento da circulação de linfócitos T CD4 não ativados - devido ao pouco tempo de vida neste momento, provavelmente trata-se de linfócitos T CD4 virgens (Figura 04 A), APC não monócitos (Figura 09 A), linfócitos B (Figura 07 A) e linfócitos T CD4 destinados à mucosa nas doses de 36μg (p<0,05) e 68μg (p<0,01) - Figura 2 A.

O aumento destas células na circulação sugere que, muito precocemente, o animal tem uma maior capacidade de resposta inata mediada por APC e linfócitos B (mediante TLRs e antígenos não dependentes de ligação via BCR) e também de elementos participantes da resposta adaptativa como linfócitos T CD4 de mucosa. Sabe-se que linfócitos B expressam TLRs e respondem à estimulação destes receptores com proliferação, produção de citocinas e indução da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células, tais como CD80/86 (Pasare e Medzhitov, 2003). Assim, são capazes de estimular a resposta em outras células de resposta imunológica. O aumento de linfócitos B mediante estimulação do sistema imunológico por padrão de DNA bacteriano foi descrito por Hasegawa e colaboradores (2003), acreditando que a proliferação e ativação policlonal de linfócitos B poderia levar a um quadro de doença autoimune pelo aumento da produção de auto-anticorpos bem como pelo aumento da resistência dos linfócitos B à apoptose. Importante ressaltar que a grande maioria dos patógenos que representam perigo à avicultura tem as mucosas como local de replicação e penetração, principalmente mucosa intestinal. Portanto, a maior quantidade de linfócitos T CD4 destinados à proteção de mucosa já aos três dias de idade é de extrema importância no estabelecimento e desenvolvimento da resposta imunológica, visando uma resposta efetiva (atenuação e eliminação do patógeno) e mais rápida. Este aumento não foi visto no grupo que recebeu 7,5µg de DNA total, portanto, essa dose se mostrou ineficaz para este parâmetro nas condições testadas.

Aos sete dias de idade houve uma menor quantidade de linfócitos T CD4 de mucosa e virgens ou de memória em todos os grupos tratados com relação ao controle (Figuras 02 B e 04 B, respectivamente). A menor quantidade é uma resposta inversa do ocorrido aos três dias de idade, portanto, conclui-se que a resposta de aumento natural destas células no grupo controle foi antecipado pelo tratamento dos sete para os três dias de idade.

Aos 14 dias de idade todos os grupos tratados apresentaram menores quantidades de linfócitos T CD8 não ativados (Figura 04 A) e o grupo que recebeu 7,5µg de DNA total apresentou também menor quantidade de linfócitos T CD4 não ativados (Figura 04 C), bem como APC não monócitos (Figura 09 B). A resposta individual de diminuição da quantidade circulante de APC no grupo de menor dose

de DNA total naquele momento poderia indicar um maior risco de resposta imunológica inata caso ocorresse alguma infecção aos 14 dias, período considerado ainda precoce. A interpretação é difícil neste caso porque não houve nenhum tipo de alteração complementar em nenhum outro tipo celular nos outros grupos. Já a menor quantidade de linfócitos T não ativados que ocorreu em todos os grupos (linfócitos T CD8) e no que recebeu a menor quantidade de DNA total (linfócitos T CD4) sugere que não houve necessidade de recrutamento de células imaturas, portanto, não efetoras, para montar uma resposta imunológica aos desafios do ambiente naquele momento, como ocorreu com o grupo controle.

O período dos 28 dias de idade foi onde ocorreram alterações na maioria das células analisadas. Com exceção dos monócitos supressores de resposta e fagocíticos, todas as outras células tiveram maior quantidade circulante em relação ao grupo controle. Somente os linfócitos T CD4 gerais tiveram maior quantidade circulante em apenas um grupo: 36µg de DNA total (Figura 01 B). Em todos os outros tipos celulares alterados não houve interação entre a resposta e a concentração utilizada, ou seja, o efeito não dependeu da quantidade de DNA total administrado no primeiro dia. As quantidades de linfócitos T CD8 não ativados e ativados foi maior. Entende-se que, durante a ativação linfocitária, existe uma expansão clonal gerando linfócitos efetores e de memória específica. Embora não possamos afirmar com certeza que o aumento de linfócitos T CD8 α^+ CD28 $^+$ (não ativados) corresponda a expansão clonal de linfócitos de memória, esta hipótese pode ilustrar o observado. Isto também demonstra que o grupo tratado foi capaz de montar uma resposta celular aos desafios ambientais neste período de forma mais eficiente que o grupo controle.

O efeito do aumento na quantidade circulante de linfócitos T CD4 gerais observado aos 28 dias no grupo tratado com 36µg de DNA total persistiu aos 35 dias (Figura 01 C). Neste período, foi observada menor quantidade de APC circulante, mostrando que a administração de DNA total foi capaz de antecipar esta resposta dos 35 para os 28 dias para este parâmetro (Figuras 09 D e C, respectivamente). Chama-se atenção para a diminuição da quantidade circulante de monócitos fagocíticos somente no grupo com 7,5µg de DNA total (Figura 08 C). Este grupo também mostrou imunomodulação inversa às demais doses com menores quantidades de APC aos 14 e 35 dias de idade (Figura 09 B e D, respectivamente).

Tendo em vista que, em alguns casos, a menor quantidade circulante de células do sistema imunológico inato pode acarretar na deficiência de resposta rápida contra agentes invasores e, como a dose de 7,5µg de DNA total apresentou as menores quantidades circulantes, não deve ser considerada como dose a ser utilizada em futuros estudos. Em contrapartida, a dose de 36µg conferiu maior quantidade circulante das populações celulares estudadas, portanto, mais indicada para promover proteção imune tendo em vista a modulação das populações celulares. A dose de 36µg ainda deve ser preferível a de 68µg, cujo comportamento do perfil celular foi semelhante mas representa o emprego desnecessário de maior quantidade de insumo para obter a mesma ação.

6.2 CpG-ODN

Assim como observado nos grupos tratados com DNA total a imunomodulação causada pela administração de CpG-ODN apresentou duas fases distintas de modulação, uma precoce aos três dias e uma tardia, aos 28 dias de idade.

O efeito precoce foi detectado em linfócitos T CD4 e T CD8 de mucosa no grupo que recebeu 15µg (Figuras 02 A e 03 A, respectivamente) e em APC não monócitos em todos os grupos independentemente da dose (Figura 09 A). Lacroix-Lamandé e colaboradores (2009) observaram que camundongos inoculados oralmente com CpG tiveram aumento de células CD4 e CD8 em linfonodos mesentéricos após 24 horas da administração de 20µg/g, bem como aumento de neutrófilos, células dendríticas e linfócitos B na mucosa intestinal. Como abordado na análise do grupo DNA total, o aumento da quantidade circulante de linfócitos T CD4 de mucosa representou uma antecipação da resposta do sétimo para o terceiro dia com relação ao grupo controle (Figuras controle 3 e 7 dias com os tratamentos).

A população de monócitos supressores aparece aumentada no grupo CpG-ODN 15µg aos 14 dias de idade (Figura 10 A), dado interessante não observado no grupo DNA ou em outras doses de CpG-ODN. Por não ter havido nenhum tipo de alteração em população de monócitos fagocíticos ou linfócitos T nos momentos anteriores e imediatamente posteriores a esse, entende-se que esta resposta seja um caso isolado e de difícil correlação para a resposta imunológica observada em outras células.

Aos 21 dias de idade a população circulante de linfócitos B apareceu em menor quantidade independentemente da dose de tratamento (Figura 07 C). A menor quantidade de linfócitos B poderia representar uma migração de células para órgãos linfóides como o baço, por exemplo. O movimento de migração (*homing*) ao 21 dias poderia representar um aumento da necessidade de linfócitos B para responder aos desafios ambientais. Interessante que essa aparente deficiência foi compensada aos 28 dias, quando as quantidades de linfócitos B circulantes ficaram acima do grupo controle independente da dose dos tratamentos (Figura 07 D).

Também aos 21 dias de idade as populações de monócitos fagocíticos e supressores estavam em maior número no grupo CpG-ODN 0,6µg (Figuras 08 A e 10 B, respectivamente). A modulação das populações de monócitos pelo grupo 0,6µg também parecem ser um efeito isolado, não havendo nenhuma resposta anterior ou posterior que manifeste um efeito de correlação com outros componentes do sistema imunológico. Novos experimentos deverão ser conduzidos para confirmar este resultado.

A administração de CpG-ODN induz o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias como o MHCII em populações como linfócitos B e células dendríticas (Krieg, 2002; Pasare e Medzhitov, 2003) e, aos 28 dias de idade, como também ocorreu no grupo DNA total, todas as células avaliadas inclusive APC e linfócitos B tiveram maior quantidade circulante em sangue periférico, com exceção de linfócitos T CD8 não ativados e dos ativados, de monócitos supressores e fagocíticos e de linfócitos T CD4 gerais no grupo 15µg CpG. Este é um período que corresponde a resposta tardia a uma administração de CpG-ODN que ocorreu unicamente no momento do alojamento.

Aos 35 dias, semelhante ao grupo que recebeu 7,5µg de DNA total, os grupos que receberam as doses 6,8 e 15µg de CpG-ODN apresentaram menor quantidade circulante de monócitos fagocíticos (Figura 08 C) e o grupo 15µg CpG-ODN apresentou aumento na quantidade de linfócitos citotóxicos de mucosa (Figura 03 C).

Diferente do que ocorre com o grupo de DNA total, não existe uma dose de CpG-ODN estabelecida como sendo mais efetiva na resposta imunológica. Por exemplo, utilizando-se 15µg CpG-ODN tem-se efeito de resposta precoce aos três dias de idade principalmente em linfócitos T CD4 e CD8 de mucosa e APC,

importantes para proteção de locais comuns de replicação e colonização de patógenos e para resposta inata. Mas, aos 35 dias, houve uma redução da população de monócitos fagocíticos e esta condição pode apresentar um risco de falha na resposta imunológica inata em um momento próximo ao final do ciclo comercial de criação (42 dias). Além do mais, nesta dosagem não se observou a maior quantidade de linfócitos T CD4 gerais aos 28 dias como nas outras duas doses.

A dose de 0,6µg de CpG-ODN parece ser mais interessante que a de 15µg porque, além de requerer menor quantidade de CpG-ODN por dose, é uma quantidade com a qual o grupo tratado participou das modulações, inclusive aos 28 dias, e ainda apresentou um aumento de monócitos fagocíticos aos 21 dias, o que nenhum outro grupo mostrou. Entretanto, o grupo com esta dose não apresentou o importante momento precoce de resposta aos três dias de idade com relação ao aumento de população circulante de linfócitos T CD4 de mucosa.

Neste caso, torna-se fundamental o estudo da situação em que se aplica a dosagem desta sequência de CpG-ODN utilizada no presente estudo. O imunomodulador poderá variar sua dosagem dependendo das variáveis de produção comercial como pressão e momento de infecção, tipos e momentos de vacinação e objetivo do estado de resposta imunológica.

Mesmo com estas variáveis e incertezas quanto a dose efetiva, entende-se que o CpG-ODN é um composto sintético que pode ser confeccionado do tamanho e sequência de nucleotídeos desejada, o que muitos estudos mostram ser suficiente para provocar mudanças na ação do CpG-ODN. Mais estudos nesta área são necessários, pois a administração de CpG-ODN em menores doses que DNA total (0,6µg e 35µg, respectivamente) mostrou-se com respostas de modulação semelhantes às observadas nos demais tratamentos.

6.3 Arginina

Diferente dos grupos DNA total e CpG-ODN os grupos tratados com arginina receberam o aminoácido na ração em um consumo constante durante os 42 dias de duração do experimento, não sendo somente um único estímulo.

Aos três dias de idade a precocidade de resposta se manifestou no aumento das quantidades circulantes de linfócitos T CD4 gerais (Figura 01 A), de mucosa (Figura 02 A) e não ativados (Figura 04 A), APC não monócito (Figura 09 A) e linfócitos T CD8 de mucosa nos grupos que receberam 1,99% e 2,28% de arginina (Figura 03 A). O aumento na população de linfócitos T CD8⁺ foi observada por Abdukalykova e colaboradores (2008) frente à vacinação com o vírus da doença de Gumboro em um grupo alimentado com alta concentração de arginina (2,2%).

No que diz respeito aos linfócitos T CD4 de mucosa e os não ativados houve uma clara antecipação da resposta do grupo controle dos sete para os três dias de idade. O aumento dos níveis de linfócitos T CD4⁺ em ambientes *in vitro* ricos em arginina foi observado por Munder e colaboradores (2009) em estudo da responsividade de linfócitos T CD4 e macrófagos específicos para *Leishmania major* em camundongos. A proteção de mucosas por arginina foi observada por Tan e colaboradores (2010) em suínos quando enterócitos foram colocados na presença de LPS. A adição do aminoácido em meio de cultura não só estimulou a síntese proteica como reduziu a degradação proteica naquelas células em contato com LPS. Ainda, Munder e colaboradores (2009) avaliaram a proliferação de linfócitos T CD4⁺ frente a diferentes concentrações de arginina em meio de cultura (0, 20, 100 e 400 µM). A proliferação foi maior na presença de arginina que em relação ao meio sem o aminoácido, mas não houve diferença quando comparadas as concentrações de 20 e 100 µM. Isto pode ser um indicativo da relação dose-dependente das respostas leucocitárias frente à presença de arginina em diferentes níveis, como estudado no presente trabalho. Lee e colaboradores (2002) demonstraram que a suplementação de arginina em ração pode influenciar a composição de infiltrados leucocitários, aumentando a quantidade circulante de heterófilos frente a infecção com vírus da bronquite infecciosa.

Aos 14 e 21 dias houve uma imunomodulação diferente das observadas nos grupos DNA total e CpG-ODN, sendo dois momentos em que algumas células se apresentaram em menor quantidade que no grupo controle em quase todos os grupos tratados. O que chama a atenção é que algumas células como linfócitos B e T CD8 não ativados apresentaram menor quantidade em duas coletas consecutivas, principalmente no grupo suplementado a 2,28% de arginina (Figuras 07 B e C e 04 A e B, respectivamente).

O grupo suplementado a 1,77% de arginina também aparece como tendo menor quantidade circulante de APC não monócito e linfócito T CD4 virgens ou de memória aos 14 dias (Figuras 09 B e Figura 04 C, respectivamente). Essas alterações podem representar um maior risco de estabelecimento de infecções ao final da segunda semana de vida, período considerado ainda crítico.

Aos 28 dias observou-se um aumento nas quantidades circulantes de diferentes populações, à exceção de monócitos supressores e linfócitos T CD8 (ativados, não ativados e de mucosa). Todas as alterações se fizeram presentes principalmente no grupo que ingeriu ração com 1,99% de arginina. Taylor e colaboradores (1992) já demonstraram que aves que ingeriram L-arginina na dieta em alta concentração (2,4%) foram capazes de reduzir danos tumorais causados pelo vírus de sarcoma Ros, subgrupo A, em 24% dos casos. Isto pode ser devido a alta produção de óxido nítrico (NO), produto do pico respiratório da atividade fagocítica, que seria tóxico aos tumores induzidos por vírus. A ação do aumento na produção de NO foi observada por Allen (1999) no local de lesões parasitárias por *Eimeria sp.*, quando o desenvolvimento dos estágios iniciais de *Eimeria tenella* foi inibido, sendo essa espécie mais suscetível que *E. maxima* e *E. acervulina*. Abdukalykova e colaboradores (2008) observaram aumento do nível de linfócitos T CD4⁺ em animais que haviam ingerido altas doses de arginina (2,2%) e sido vacinados contra o vírus da doença de Gumboro após 19 dias do desafio, período anterior aos 28 dias observados neste trabalho, mas o fator do desafio deve ser considerado na avaliação.

O aumento da porcentagem de linfócitos B circulantes também foi visto por Abdukalykova e colaboradores (2008) em grupos tratados com alto nível de arginina (2,2%).

Aos 35 dias de idade foi observada menor quantidade de monócitos fagocíticos no grupo suplementado a 1,77% de arginina e de APC não monócitos em todos os grupos tratados com arginina (Figuras 08 C e 09 D, respectivamente). Esse resultado é compatível com o que ocorreu com os grupos de doses intermediária e maior de CpG-ODN no mesmo período quanto a monócitos fagocíticos.

Embora a imunomodulação aos 28 dias não possa ser considerado um efeito tardio (visto que o estímulo com arginina é presente a todo momento) o momento coincide com o de resposta tardia dos grupos DNA total e CpG-ODN. Talvez a

suplementação com arginina seja importante para imunomodulação somente em alguns momentos específicos, não durante todo o período avaliado. Embora linfócitos T e macrófagos, originados de monócitos, tenham a arginina como insumo metabólico para efetuar suas funções, Choi e colaboradores (2009) demonstraram em camundongos que, embora a arginina seja essencial para a ativação de linfócitos T, macrófagos são capazes de ativação e produção de citocinas mesmo na ausência do aminoácido. Claramente, essas duas populações tem diferentes necessidades de arginina para uma função considerada ótima e essas diferentes necessidades também devem ser considerados na suplementação de rações.

Imagina-se que as alterações observadas dos sete aos 21 dias de idade não sejam interessantes do ponto de vista imunológico para proteção contra possíveis patógenos, pois todos os momentos são caracterizados por menores quantidades circulantes de algumas células-chave (linfócitos B, APC não monócito e linfócitos T CD4 e CD8 de memória) principalmente nos grupos com 1,77% e 2,28% de arginina. Já aos 28 dias houve modulação positiva, ou seja, quantidade circulante maior que o grupo controle, em quase todas as células principalmente no grupo suplementado a 1,99% de arginina. Propõe-se que existam aí dois momentos interessantes para suplementação de arginina: desde o alojamento até três dias de idade e pouco antes dos 28 dias de idade.

Sabe-se que a ração responde por grande parte dos custos de produção e que a suplementação com um aminoácido representa um incremento neste custo, e a dose intermediária (1,99%) mostrou os melhores efeitos, representando um custo também intermediário para as formulações testadas. Importante ressaltar que um estudo de viabilidade econômica deve ser conduzido para entender de que forma a imunomodulação por 1,99% de arginina na ração melhora a resposta imunológica a possíveis infecções e vacinações, minimizando perdas zootécnicas como mortalidade e menor peso vivo. Além disso, deve ser estudada a interação entre os diferentes imunomoduladores em casos de infecções. Por exemplo, pode ser que a combinação de suplementação de arginina na ração e administração de CpG-ODN ou DNA total resulte em uma estratégia ótima para melhorar a resposta do sistema imunológico, sem prejudicar o desempenho zootécnico dos animais.

Allen (1999) observou que em casos de infecção parasitária por *Eimeria sp.* em frangos o tratamento com L-arginina, em diferentes doses, não foi capaz de impedir

a perda de peso observada durante o período de infecção, embora tenha reduzido a eliminação de oocistos de *Eimeria tenella* mas não *E. maxima* ou *E. acervulina*. Os dados obtidos neste estudo mostram que o peso das aves não foi alterado pela constante ingestão de diferentes níveis do aminoácido, somente tendo efeito sobre subpopulações imunes (figura 11).

6.4 Imunomodulação e peso corporal

Como já comentado anteriormente, Buehler e colaboradores (2008) demonstraram que a alta capacidade imunológica representada pela intensa atividade do sistema imunológico aviário demanda energia metabólica, que impactaria no crescimento do animal em ganho de peso quando esta demanda imunológica fosse excedente.

Foi demonstrado que, para as condições analisadas, as modulações aqui apresentadas não impactaram na evolução do peso vivo em nenhum momento, nem anterior ou posterior, ao período de aumento das populações celulares (Figura 12). Ou seja, mesmo uma maior quantidade de células não representou prejuízo ao crescimento dos animais.

Além disto, as alterações decorrentes da utilização de imunomoduladores são muito sensíveis a ponto de proporcionar maior quantidade de células circulantes mas não o suficiente para impactar no tamanho ou peso dos órgãos linfóides. Em situações de utilização de imunomoduladores na ausência de infecções a avaliação macroscópica dos órgãos não se mostraria como ferramenta adequada para inferir a atividade imunomoduladora.

7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos, os imunomoduladores testados desempenharam função modulatória, ou seja, de alteração, em praticamente todas as populações celulares em um momento precoce e outro tardio.

Algumas doses mostraram melhores respostas por aumentar a circulação de células do sistema imune, o que indica uma possível melhor capacitação da resposta imunológica mesmo na ausência de infecções ou desafios experimentais.

Futuros estudos devem ser conduzidos para analisar as respostas dos imunomoduladores frente a situações de vacinações e infecções, com principal atenção para as doses de CpG-ODN (0,6µg), DNA total bacteriano (36µg) e Arginina (total na ração de 1,99%).

8. PERSPECTIVAS

A avaliação do sistema imunológico de aves compreende o entendimento de respostas humorais e celulares frente a desafios ambientais ou infecciosos. A citometria de fluxo se mostrou como ferramenta sensível e específica na avaliação do perfil celular de componentes da imunidade, mas outras ferramentas poderiam acrescentar na análise da dinâmica linfocitária como a imunistoquímica. Foi observado que houve alteração de populações de linfócitos T CD4 de mucosa e a constatação desta população em tecidos de mucosa corroborariam os dados.

Outros componentes que participam da resposta imunológica fazendo a interação de respostas nos diferentes tipos celulares são as citocinas. Neste trabalho buscou-se padronizar a técnica para mensuração de RNA mensageiro para as interleucinas 2 (IL2), 4 (IL4) e 10 (IL10) e IFN γ por PCR em tempo real (qPCR). Assim, poderia se ter dados para confirmar a resposta observada como sendo de perfil Th1 (celular) ou Th2 (humoral). Mais estudos estão sendo realizados para atingir a padronização da técnica.

As mesmas interleucinas poderiam ser detectadas no plasma ou soro dos animais por meio de *kits* de ELISA disponíveis no mercado, mas o alto investimento na obtenção desta ferramenta tornou a avaliação inviável.

A utilização dos imunomoduladores em suas doses consideradas ótimas deve ser implementada em futuros estudos envolvendo infecções experimentais para análise do desempenho sanitário e zootécnico, sendo importante considerar outras sequências de CpG-ODN.

REFERÊNCIAS

ABDUKALYKOVA, S.T; ZHAO, X; RUIZ-FERIA, C.A. Arginine and vitamin E modulate the subpopulations of T lymphocytes in broiler chickens. **Poultry science**, 87(1), 50–5, 2008.

ALLEN, P. C. Effects of daily oral doses of L-arginine on coccidiosis infections in chickens. **Poultry Science**, v.78, p.1506-1509, 1999.

BALLAS, Z.K; RASMUSSEN, W.L; KRIEG, A.M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. **The journal of immunology**, v.157, p.1840-1845, 1996.

BEHBOUNDI, S; CHAO, D; KLENERMAN, P; AUSTYN, J. The effects of DNA containing CpG motifs on dendritic cells. **Immunology**, v.99, p.361-366, 2000.

BEIRÃO, B.C.B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BERNDT, A; PIEPER, J; METHNER, U. Circulating (gamma) (delta) T cells in response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, v.74, p.3967-3978, 2006.

BIMCZOK, D; DÖLL, S; RAU, H; GOYARTS, T; WUNDRACK, N; NAUMANN, M; DÄNICKE, S; ROTHKÖTTER, H-J. The *Fusarium* toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro. **Immunobiology**, v.212, p.655-666, 2007.

BRIDLE, B.W.; JULIAN, R.; SHEWEN, P.E.; VAILLANCOURT, J.P.; KAUSHIK, A.K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p.183-190, 2006.

BROWNLIE, R; ZHU, J; ALLAN, B; MUTWIRI, G.K; BABIUK, L.A; POTTER, A; GRIEBEL, P. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. **Molecular Immunology**, Epub, 2009.

BRYK, J; OCHOA, J.B; CORREIA, M.I; MUNERA-SEELEY, V; POPOVIC, P.J. Effect of citrulline and glutamine on nitric oxide production in RAW 264.7 cells in an arginine-depleted environment. **Journal of parental and enteral nutrition**, v.32, p.377-383, 2008.

BUEHLER, D. M. **Bottlenecks, budgets and immunity: the costs and benefits of immune function over the annual cycle of red knots (*Calidris canutus*)**. Tese de Doutorado, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, Groningen, 2008.

CHENG, H. W; EICHER, S.D; CHEN, Y; SINGLETON, P; MUIRT, W. M. Effect of genetic selection for group productivity and longevity on immunological and hematological parameters of chickens. **Poultry Science**, v.80, p.1079-1086, 2001.

CHOI, B.S; MARTINEZ-FALERO, I.C; CORSET, C; MUNDER, M; MODOLELL, M; MÜLLER, I; KROPF, P. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v.85, 2009.

CHOWDHURY, S.R.; SMITH, T.K.; BOERMANS, H.J.; WOODWARD, B. Effects of feed-borne Fusarium mycotoxins on hematology and immunology of turkeys. **Poultry Science**, v.84, p.1698-1706, 2005.

CHU, R.S; TARGONI, O.S; KRIEG, A.M; LEHMANN, P.V; HARDING, C.V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. **Journal of experimental medicine**, v.186, p.1623-1631, 1997.

CIHAK, J; HOFFMAN-FEZER, G; ZIEGLER-HEIBROCK, H. W; STEIN, H; KASPERS, B; CHEN, C. H; COOPER, M. D; LÖSCH, U. T cells expressing the V beta 1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 10951-10955, 1991.

COWDERY, J.S; CHACE, J.H; YI, A.K; KRIEG, A.M. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. **The journal of immunology**, v.156, p.4570-4575, 1996.

DA SILVA, I.C.M; RIBEIRO, A.M.L; CANAL, C.W; TREVIZAN, L; MACAGNAN, M; GONÇALVES, T.A; HLAVAC, N.R.C; DA ALMEIDA, L.L; PEREIRA, R.A. The impact of Organic and Inorganic Selenium on the Immune System of Growing Broilers Submitted to Immune Stimulation and Heat Stress. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.12, p.247-254, 2010.

D'AMATO, J.L; HUMPHREY, B.D. Dietary arginine levels alter markers of arginine utilization in peripheral blood mononuclear cells and thymocytes in young broiler chicks. **Poultry science**, v.89, p.938-947, 2010.

DAVIS, H.L; WEERATNA, R; WALDSCHIMIDT, TJ; TYGRET, L; SCHORR, J; KRIEG, AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. **The Journal of Immunology**, 160(2): 870–76, 1998 [Erratum J. Immunol. 1999, Mar. 1. 162 (5):3103].

Avian Immunology, 1 ed (DAVISON, F; KASPERS, B; SCHAT, K.A., eds), Elsevier, 2008.

DE JONGE, W.J; KWIKKERS, K.L; TE VELDE, A.A; VAN DEVENTER, S.J; NOLTE, M.A; MEBIUS, R.E; RUIJTER, J.M; LAMERS, M.C; LAMERS, W.H. Arginine deficiency affects early B cells maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.1539-1548, 2002.

DEVÉS, R; BOYD, C.A. Surface antigen CD98(4F2): Not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. **Journal of membrane biology**, v. 173, p.165-177, 2000.

ELKINS, K.L; RHINEHART-JONES, T.R; STIBITZ, S; CONOVER, J.S; KLINMAN, D.M. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. **The journal of immunology**, v.162, p.2291-2298, 1999.

ELMORE, S.A. Enhanced histopathology of the thymus. **Toxicologic pathology**, v.34, p.565-665, 2006.

ERF, G.F.; BOTTJE, W.G.; BERSI, T.K. CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, p.339-348, 1998.

EWERT, D; MUNCHUS, M.S; CHEN, C.L; COOPER, M. D. Analysis of structural properties and cellular distribution of avian Ia antigen by using monoclonal antibody to monomorphic determinants. **Journal of Immunology**, v.132, p.2524-2530, 1984.

FAIR, J.M.; TAYLOR-McCABE, K.J.; SHOU, Y.; MARRONE, B.L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.125, p.268-273, 2008.

GANGADHARAN, D; CHEROUTRE, H. The isoform The CD8 isoform CD8 α α is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8 α β . **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p.264-270, 2004.

GOMIS, S; BABIUK, L; GODSON, D.L; ALLAN, B; THRUSH, T; TOWNSEND, H; WILLSON, P; WATERS, E; HECKER, R; POTTER, A. Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. **Infection and immunity**, vol.71, n.2, p.857-863, 2003.

GRIMBLE, R.F. Nutritional modulation of immune function. Symposium on "Evidence-based nutrition". **Proceedings of the nutrition society**, v.60, p.389-397, 2001.

HANGALAPURA, B.N; KAISER, M. G; van der POEL, J. J; PARMENTIER, H. K; LAMONT, S. J. Cols stress equally enhances in-vivo pro-inflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. **Developmental and comparative immunology**, v. 30, p.503-511, 2006.

HARTMANN, G; WEINER, G.J; KRIEG, A.M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. **Proceedings of the national academy of sciences USA**, v.96, p.9305-9310, 1999.

HASEGAWA, K; HAYASHI, T. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. **Lupus**, 12:838-45, 2003.

HE, H.; LOWRY, V. K.; SWAGGERTY, C. L.; FERRO, P. J.; KOGUT, M. H. In vitro activation of chicken leukocytes and in vivo protection against *Salmonella enteritidis* organ invasion and peritoneal *S. enteritidis* infection-induced mortality in neonatal chickens by immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, p.81-89, 2005.

HECKERT, R.A.; ESTEVEZ, I.; RUSSEK-COHEN, E.; PETTIT-RILEY, R. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, v.81, p.451-457, 2002.

HUNT, H.D.; LUPIANI, B.; MILLER, M.M.; GIMENO, I.; LEE, F.L.; PARCELLS, M.S. Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B complex) class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. **Virology**, v. 282, p.198-205, 2001.

JAKOB, T; WALKER, P.S; KRIEG, A.M; UDEY, M.C; VOGEL, J.C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. **The journal of immunology**, v.161, p.3042-3049, 1998.

JARNICKI, A; CONROY, H. Induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. **The Journal of Immunology**, 180:3797-3806, 2008.

KAMALAVENKATESH, P.; VAIRAMUTHU, S.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B.M.; DHINAKAR RAJ, G. Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. **Mycopathologia**, v.159, p. 273-279, 2005.

KANEKO, M.; MIZUNUMA, T.; TAKIMOTO, H. KUMAZAWA, Y. Development of TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by interleukin-15-producing epithelial cells constitutively stimulated by gram-negative bacteria via TLR4. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, n.6, v.27, p.883-889, 2004.

KAUFMAN, J.; MILNE, S.; GÖBEL, T.W.F.; WALKER, B.A.; JACOB, J.P.; AUFRAY, C.; ZOOROB, R.; BECK, S. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. **Nature**, v.401, 1999.

KEESTRA, A.M; DE ZOETE, M.R; BOUWMAN, L.I; VAN PUTTEN, J.P.M. Chicken TLR21 Is an Innate CpG DNA Receptor Distinct from Mammalian TLR9. **The Journal of Immunology**, v.185, p.460-467, 2010.

KLINMAN, D.M; YI, A.K; BEAUCAGE, S.L; CONOVER, J; KRIEG, A.M. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon gamma. **Proceedings of the natural academy os sciences USA**, v.93, p.2879-2883, 1996.

KOBAYASHI, H; HORNER, AA; TAKABAYASHI, K; NGUYEN, MD; HUANG, E; CINMAN, N; RAZ, E. Immunostimulatory DNA pre-priming: a novel approach for prolonged Th1-biased immunity. **Cell Immunology**, v.198, p.69-75, 1999.

KRIEG, A.M; YI, A.K; MATSON, S; WALDSCHMIDT, T.J; BISHOP, G.A; TEASDALE, R; KORETZKY, G.A; KLINMAN, D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v.374, p.546-549, 1995.

KRIEG , A.M. CpG motifs in bacterial DNA and thei immune effects. **Annual review of immunology**, v.20, 709-60, 2002.

Robbins & Cotran Patologia - bases patológicas das doenças, 7.ed. (KUMAR, V; ABBAS, A; FAUSTO, N., eds.). Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

LAHTI, J.M.; CHEN, C.-L. H.; TJOELKER, L.W.; PICKEL, J.M.; SCHAT, K.A.; CALNEK, B.W.; THOMPSON, C.B.; COOPER, M.D. Two distinct $\alpha\beta$ T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor $V\beta$ gene segments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.88, p. 10956-10960, 1991.

LACROIX-LAMANDÉ, S; ROCHEREAU, N.; MANCASSOLA, R.; BARRIER, M.; CLAUZON,A.; LAURENT, F. Neonate Intestinal Immune Response to CpG Oligodeoxynucleotide Stimulation. **Plos one**, v14, p.82-91, 2009.

LEE, J-E; AUSTIC, R.E; NAQI, S.A; GOLEMBOSKI, K.A; DIETERT, R.R. Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. **Poultry Science**, 81, p.703-798, 2002.

LI, Z.; NESTOR, K.E.; SAIF, Y.M.; LUHTALA, M. Flow cytometric analysis of T lymphocyte subpopulations in large-bodied turkey lines and a randombred control population. **Poultry Science**, v.79, p.219-223, 2000.

LINSLEY, P.S.; LEDBETTER, J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual Review in Immunology**, v.11, p.191-212, 1993.

MATSON, K.D.; RICKLEFS, R.E.; KLASING, K.C. A hemmolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. **Developmental and Comparative Immunology**, v.29, p275-286, 2005.

MENDES, S. S; CANDI, A; VANSTEENBRUGGE, M. Microarray analyses of the effects of NF κ B or PI3 K pathway inhibitors on the LPS-induced gene expression profile in RAW264.7 cells Synergistic effects of rapamycin on LPS-induced MMP9-over-expression. **Cell Signaling Technology**, v.21, p.1109–1122, 2009.

MUNDER, M; CHOI, B-S; ROGERS, M; KROPF, P. L-arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. **European Journal of Immunology**, 39, p.2161-2172, 2009.

NESTOR, K. E.; ANDERSON, J. W.; VELLEMAN, S. G. Genetic variation in pure lines and crosses of large-bodied turkey lines. 2. Carcass traits and body shape. **Poultry Science**, v.80, n.8, p.1093-1104, 2001.

PARAMITHIOTIS, E; RATCLIFFE, M. Evidence for phenotypic heterogeneity among B cells emigrating from the Bursa of Fabricius: a reflection of functional diversity? **Current Topics on Microbiology and Immunology**, v.212, p.29-36, 1996.

PARMENTIER, H.K.; KREUKNIET, M.B.; GOEREE, B.; DAVIDSON, T.F.; JEURISSEN, S.H.M.; HARMSSEN, E.G.M.; NIEUWLAND, M.G.B. Differences in distribution of lymphocyte antigens in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, p.155-169, 1995.

PASARE, C; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance. **Current Opinion in Immunology**, v.15(6), p.677–682, 2003.

PISETSKY, D.S; REICH, C; CROWLEY, S.D; HALPERN, M.D. Immunological properties of bacterial DNA. **Annals of the New York academy of sciences**, v.722, p.152-163, 1995.

R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/> - version 2.15.2).

READER, R.U; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in applied microbiology**, v.1, p. 17-20, 1985.

RODRIGUEZ, P.C; ZEA, A.H; CULOTTA, K.S; ZABALETA, J; OCHOA, J.B; OCHOA, A.C. Regulation of T cell receptor CD3 ζ chain expression by l-arginine. **Journal of biological chemistry**, v.277, p.21123-21129, 2002.

RODRIGUEZ, P.C; QUICENO, D.G; OCHOA, A.C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. **Blood**, v.109, p.1568-1573, 2007.

SAALMÜLLER, A; KUEBART, G; HOLLEMWEGUER, E; CHEN, Z; NEILSEN, J; ZUCKERNANM, F; HAVERSON, K. Summary of workshop findings for porcine T-lymphocyte-specific monoclonal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 80, p.35-52, 2001.

SCHAEFER, A. E; SCAFURI, A.R., et al. Strong suppression by monocytes of T cell mitogenesis in chicken peripheral blood leukocytes. **The Journal of Immunology**, v. 135(3), p.1652-60, 1985.

SPARWASSER, T; KOCH, E.S; VABULAS, R.M; HEEG, K; LIPFORD, G.B; ELLWART, J.W; WAGNER, H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. **European journal of immunology**, v. 28, p.2045-2054.

SULLIVAN, Y. B.; LANDAY, A. L.; ZACK, J. A.; KITCHEN, S. G.; AL-HARTHI, L. Upregulation of CD4 on CD8⁺ T cells: CD4^{dim}CD8^{bright} T cells constitute an activated phenotype of CD8⁺ T cells. **Immunology**, v.103, n.3, p.270-280, 2001.

SUNG, Y.J; HOTCHKISS, R.E; AUSTIC, R.E; DIETERT, R.R. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. **Journal of leukocyte biology**, v.50, p.49-56, 1991.

SWAMY, H.V.L.N.; SMITH, T.K.; KARROW, N.A.; BOERMANS, H.J. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological parameters of broiler chicken. **Poultry Science**, v.83, p.533-543, 2004.

TAN, B; YIN, Y; KONG, X; LI, P; LI, X; GAO, H; LI, X; HUANG, R; WU, G. L-arginine stimulates proliferation and prevents endotoxin-induced death of intestinal cells. **Amino Acids**, v.38, p. 1227-1235, 2010.

TIMMS, L.; ALEXANDER, D.J. Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. **Avian Pathology**, n.1, v.6, p.51-59, 1977.

TOIVANEN, P; TOIVANEN, A. Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics. **European Journal of Immunology**, v.3, p.585-595, 1973.

TOKUNAGA, T; YANO, O; KURAMOTO, E; KIMURA, Y; YAMAMOTO, T; KATAOKA, T; YAMAMOTO, S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from

the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. **Microbiology and immunology**, v.36, p.55-66, 1992.

Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia, 4.ed. (TRANQUILLI, W.J. THURMON, J.C.; GRIMM, K.A., eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 2007.

TREGASKES, C.A.; KONG, F.K.; PARAMITHIOTIS, E.; CHEN, C.L.; RATCLIFFE, M.J.; DAVIDSON, T.F.; YOUNG, J.R. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha β and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha β subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of Immunology**, n.9, v.154, p.4485-4494, 1995.

TSUJI, S.; CHAR, D.; BUCY, R. P.; SIMONSEN, M.; CHEN, C. H.; COOPER, M. D. Gamma delta T cells are secondary participants in acute graft-versus-host reactions initiated by CD4+ alpha beta T cells. **European Journal of Immunology**, v.26, n.2, p.420-427, 1996.

VILLANUEVA, A.I; KULKARNI, R.R; SHARIF, S. Synthetic double-stranded RNA oligonucleotides are immunostimulatory for chicken spleen cells. **Developmental and comparative immunology**, v.35, p.28-34, 2011.

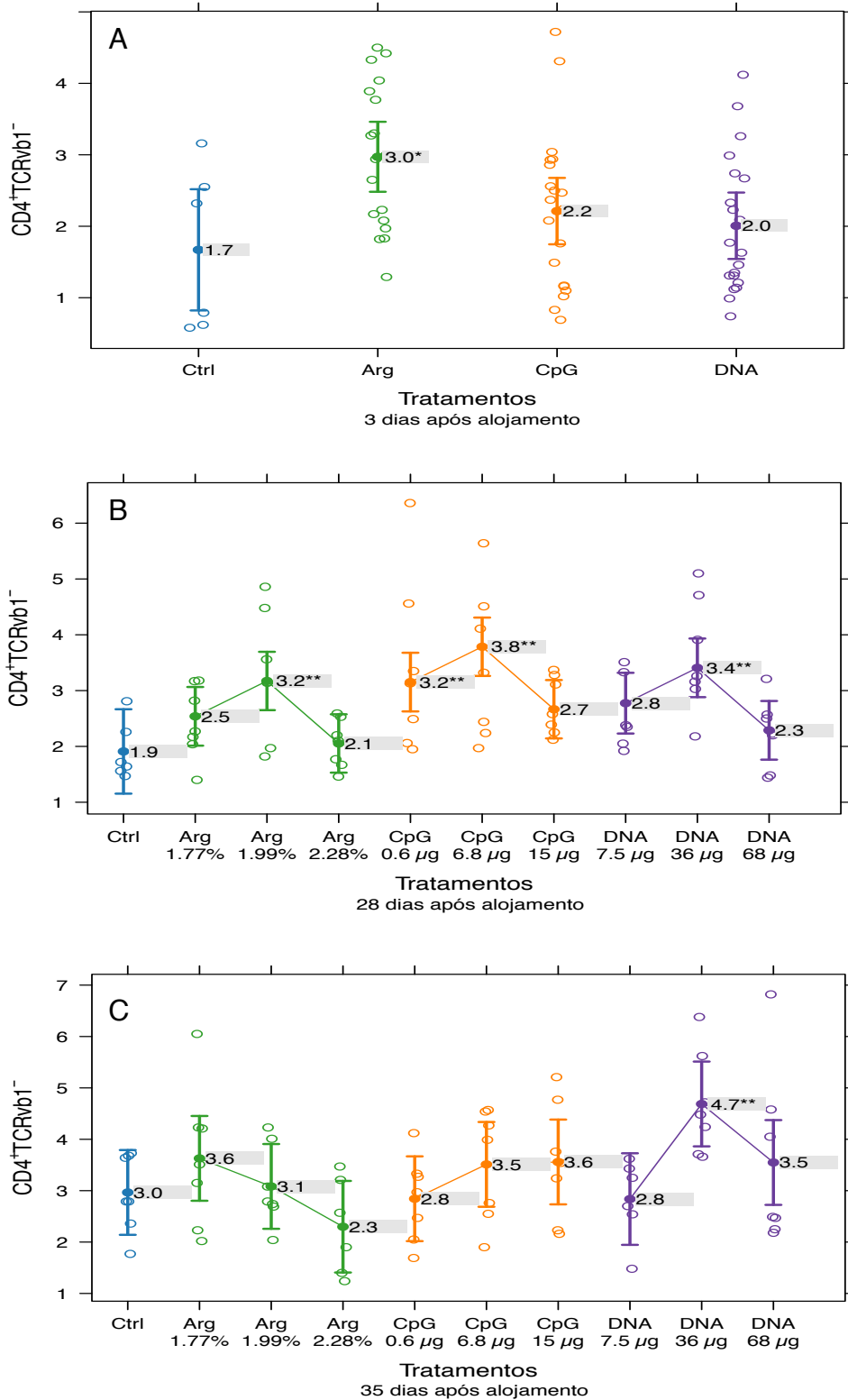
ZEA, A.H; RODRIGUEZ, P.C; CULOTTA, K.S; HERNANDEZ, C.P; DeSALVO, J; OCHOA, J.B; PARK, H.J; ZABALETA, J; OCHOA, A.C. L-arginine modulates CD3 ζ expression and T cell function in activated human T lymphocytes. **Cellular immunology**, v.232, p.21-31, 2004.

ZEKARIAS, B.; TER HUURNE, A.A.H.M.; LANDMAN, W.J.M.; REBEL, J.M.J.; POL, J.M.A.; GRUYS, E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v.33, p.109-125, 2002.

ZHU, F.G; MARSHALL, J.S. CpG-containing oligodeoxynucleotides induce TNF-alpha and IL6 production but not degranulation from murine bone marrow-derived mast cells. **Journal of leukocyte biology**, v.69, p.253-262, 2001.

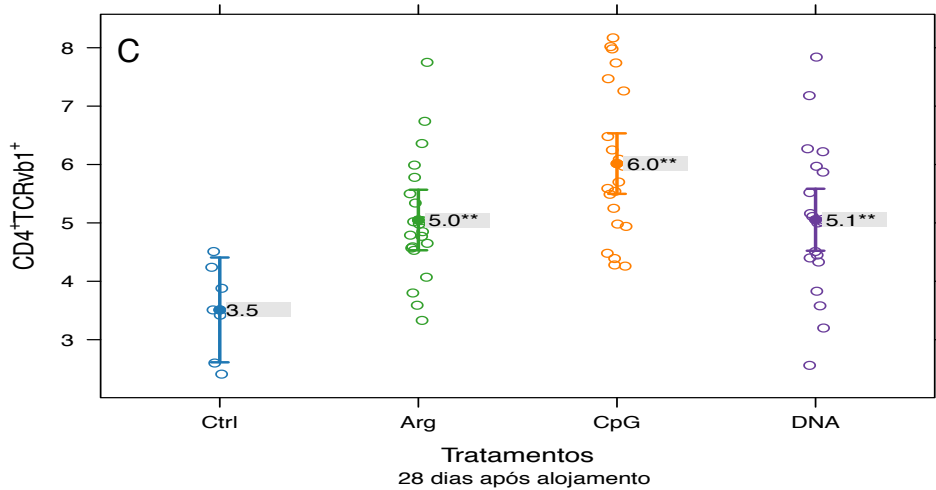
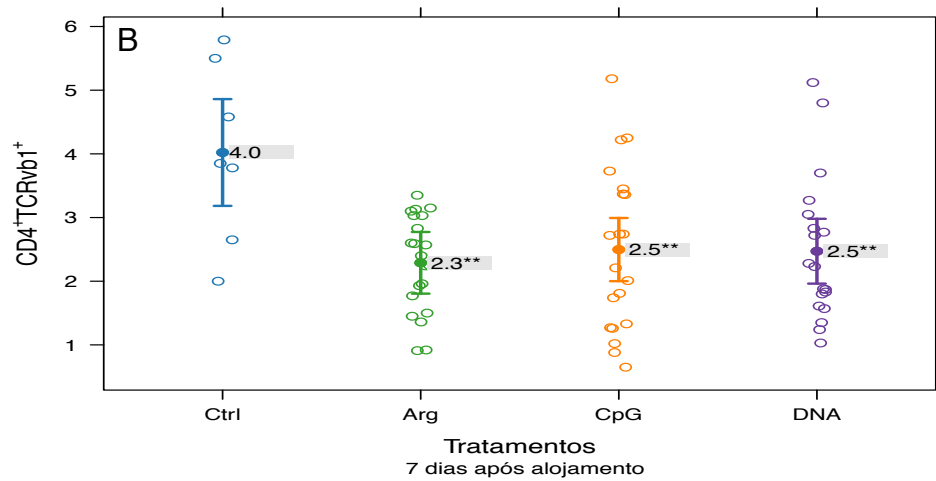
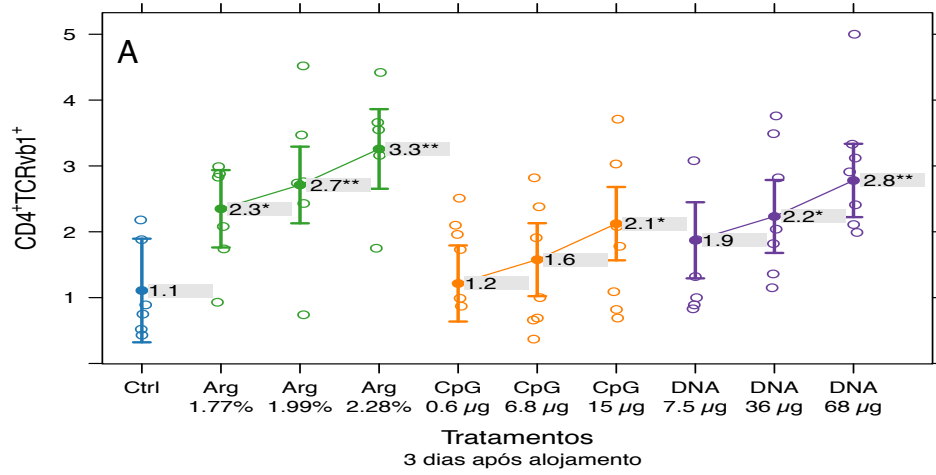
ZIMMERMANN, S; EGETER, O; HAUSMANN, S; LIPFORD, G.B; ROCKEN, M; WAGNER, H; HEEG, K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 response in lethal murine leishmaniasis. **Journal of immunology**, v.160, p. 3627-3630, 1998.

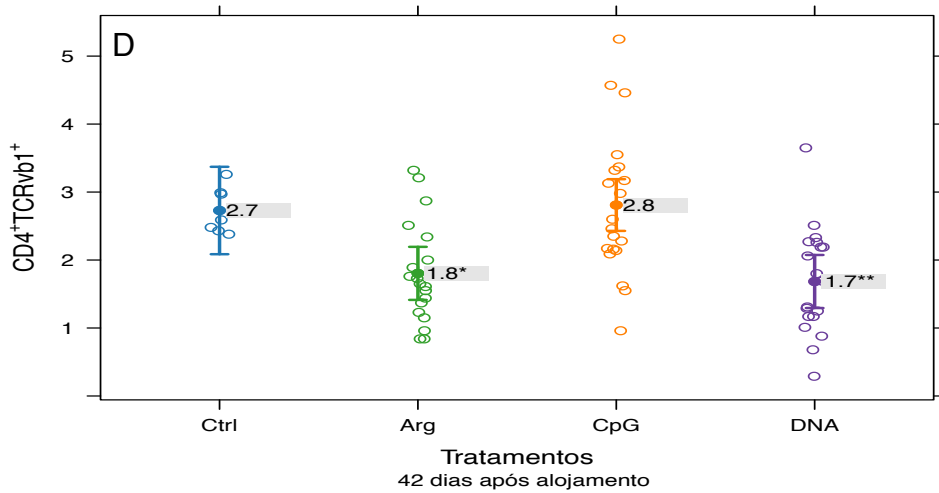
APÊNDICES

Figura 01 - Linfócitos T CD4 gerais (CD4⁺TCR ν β 1⁻)

Linfócitos T CD4 gerais (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 28 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

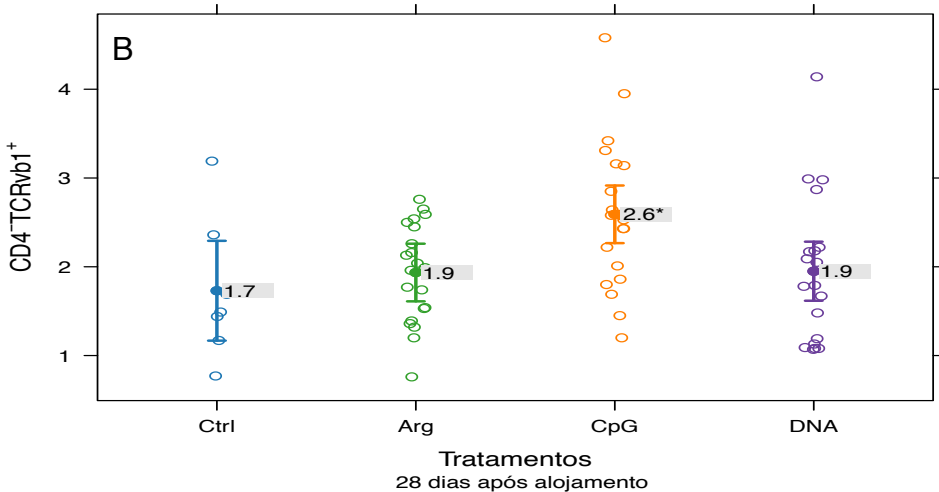
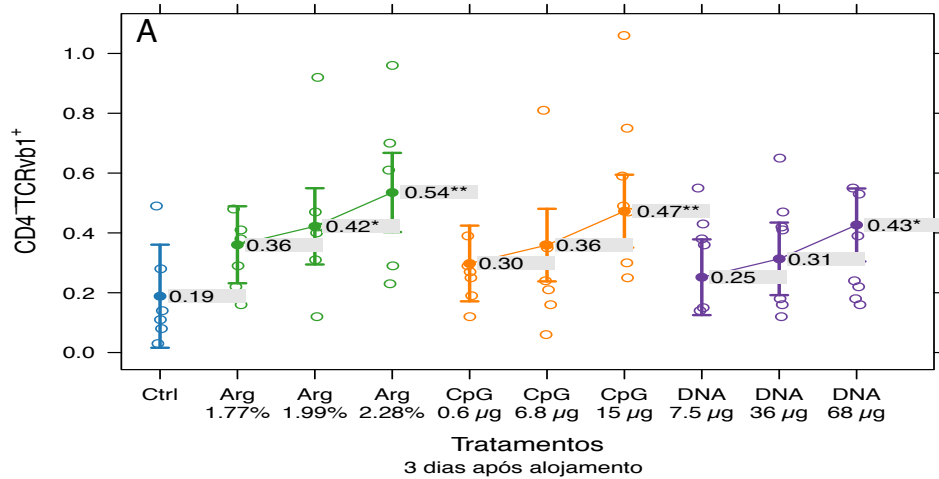
Figura 02 - Linfócitos T CD4 de mucosa (CD4⁺TCRvβ1⁺)

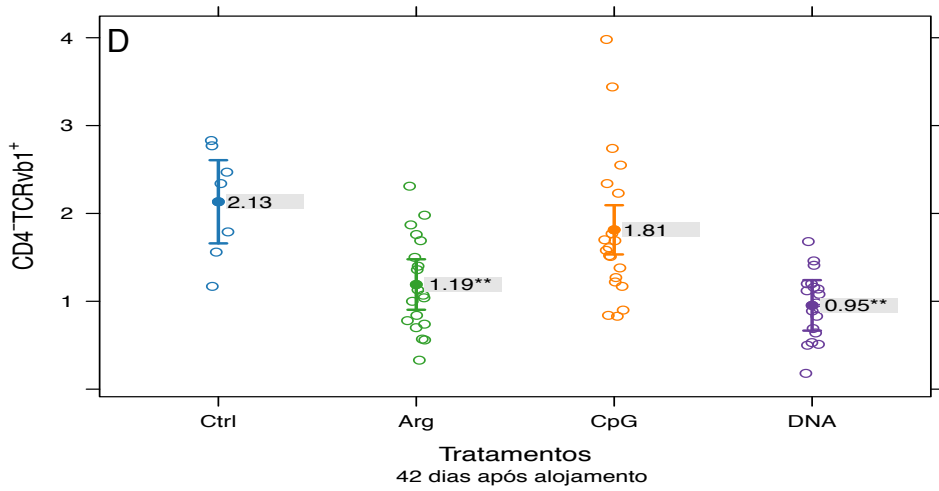
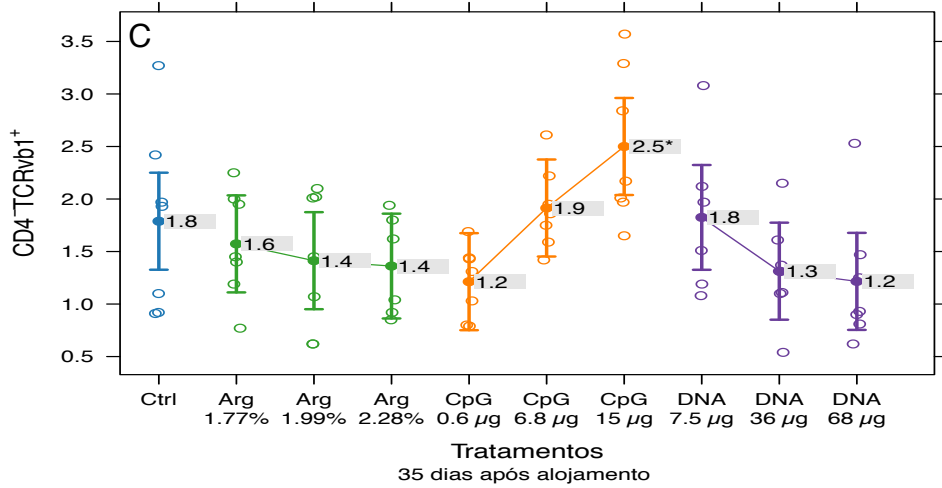




Linfócitos T CD4 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos sete dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

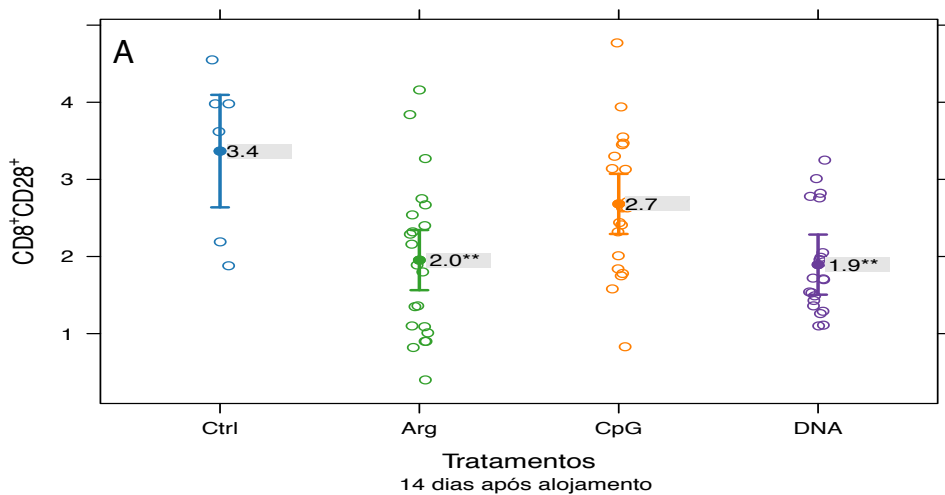
Figura 03 - Linfócitos T CD8 de mucosa (CD4-TCRvβ1⁺)

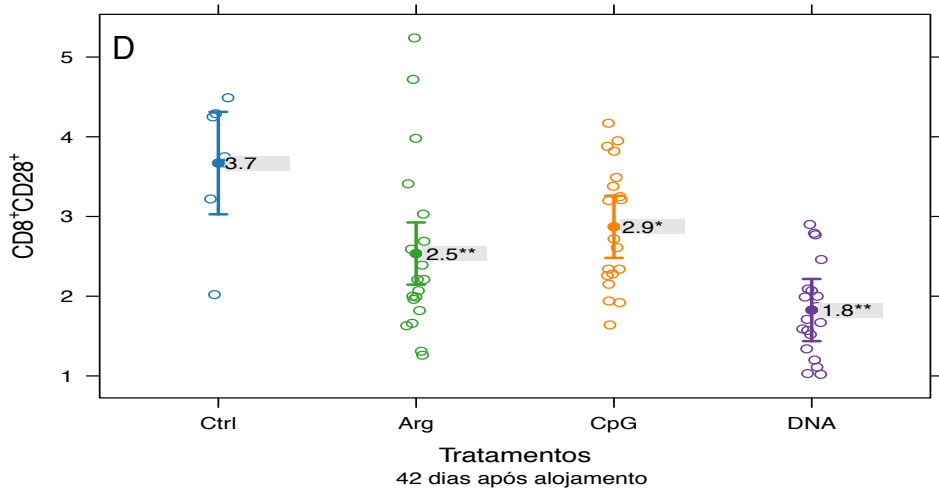
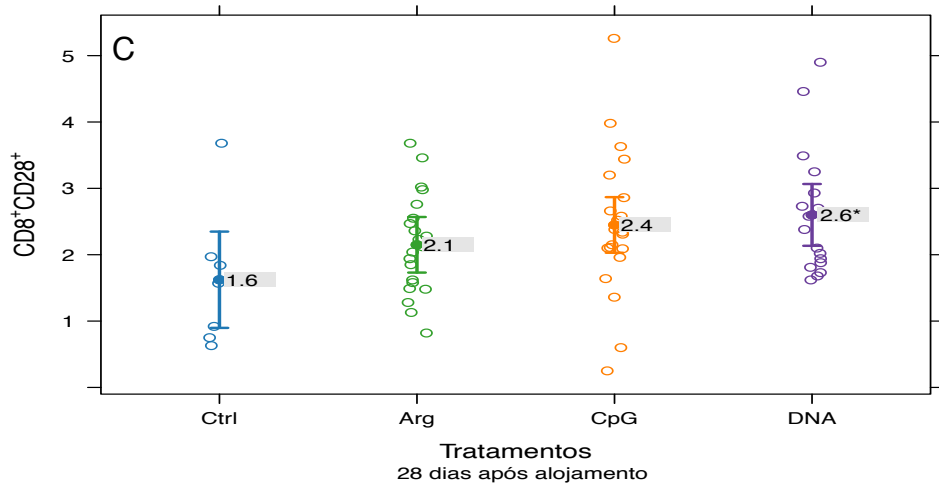
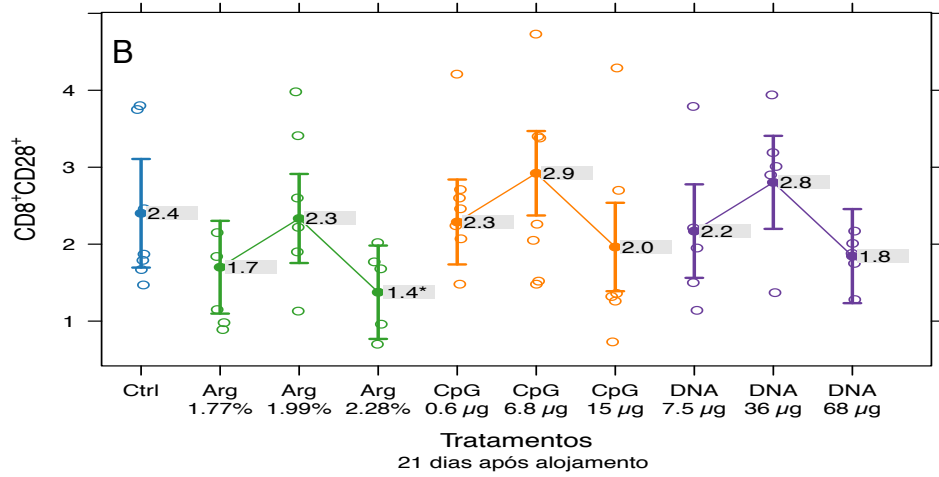




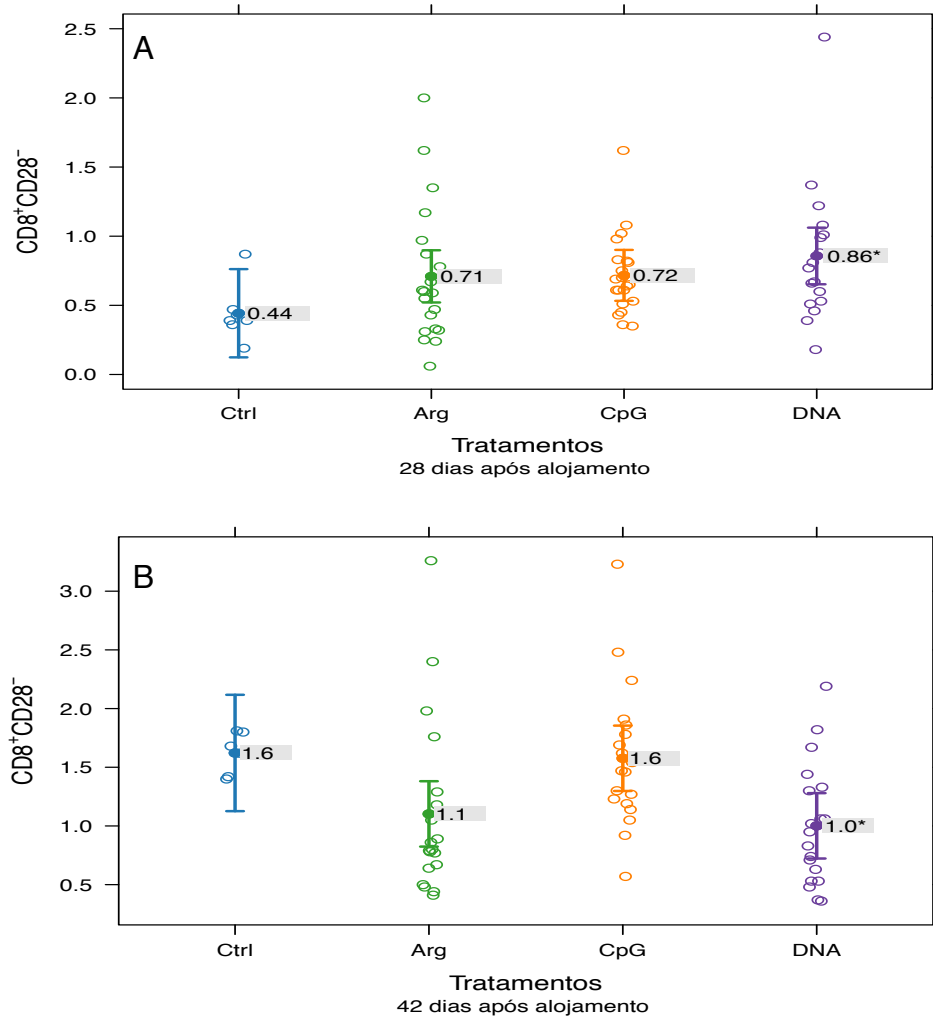
Linfócitos T CD8 de mucosa (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 28 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

Figura 04 - Linfócitos T CD8 não ativados (CD8 α^+ CD28 $^+$)



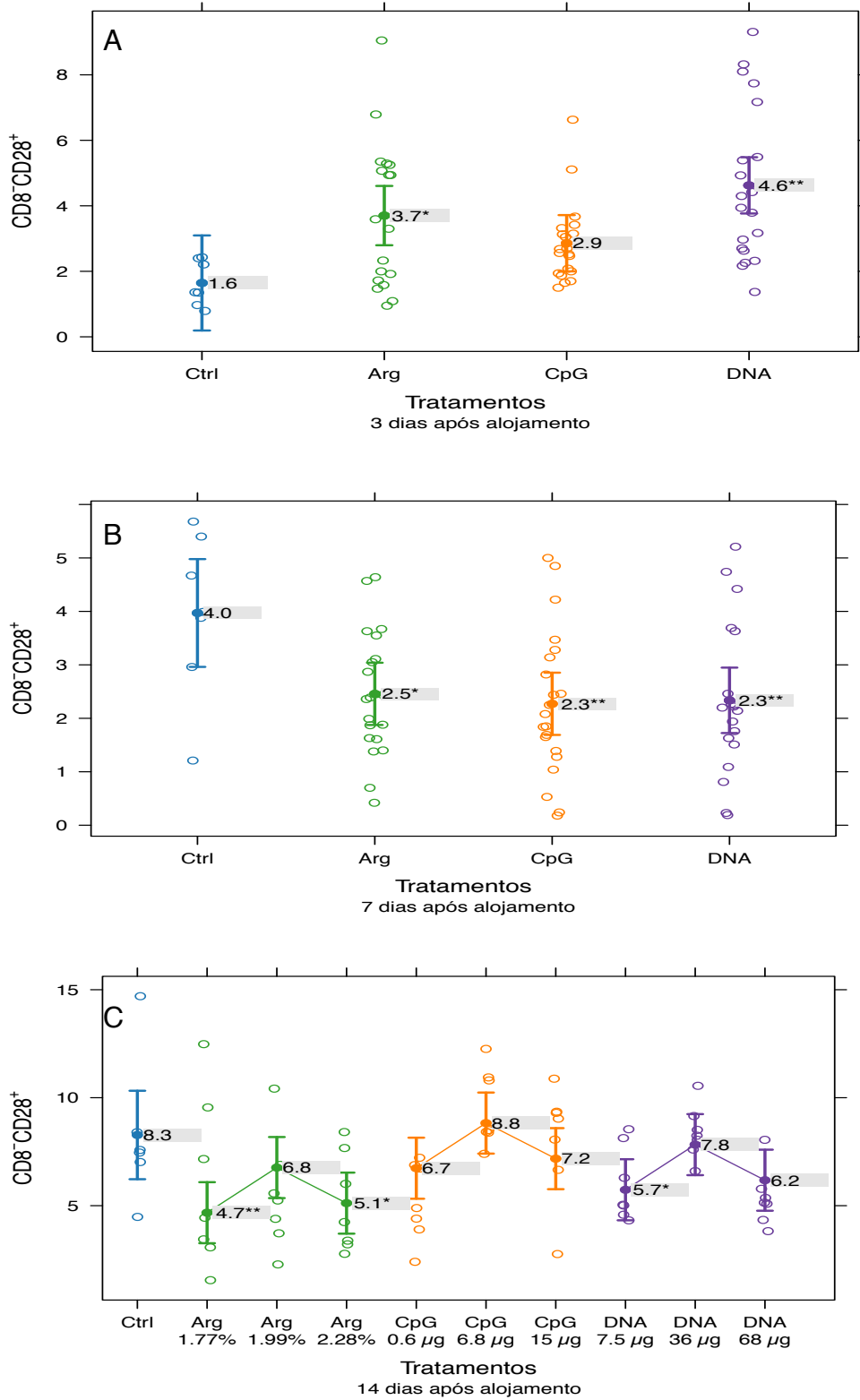


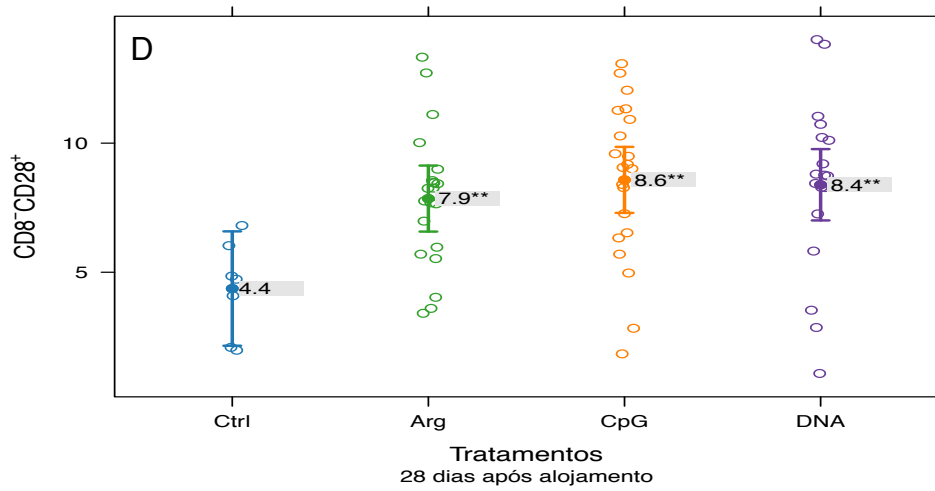
Linfócitos T CD8 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 14 dias de idade. B) aos 21 dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

Figura 05 - Linfócitos T CD8 ativados (CD8 α^+ CD28 $^-$)

Linfócitos T CD8 ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 28 dias de idade. B) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

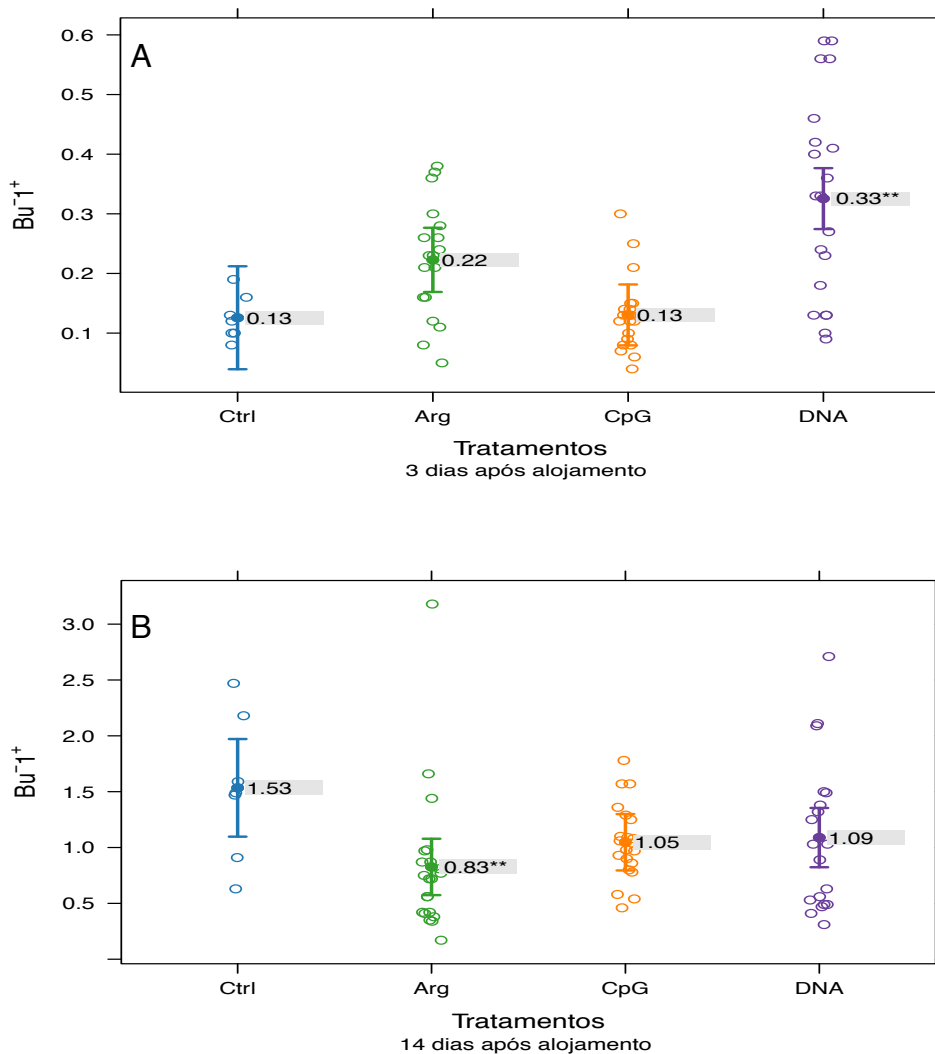
Figura 06 - Linfócitos T CD4 não ativados (CD8 α -CD28 $^{+}$)

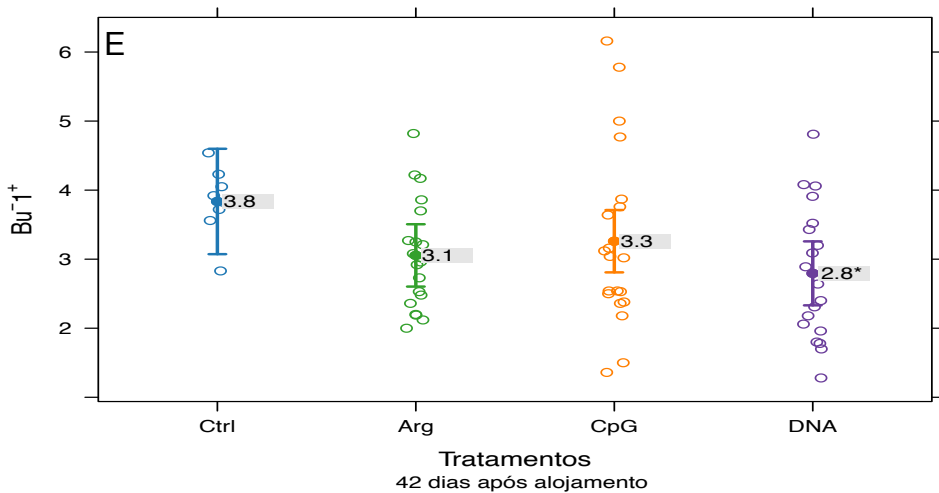
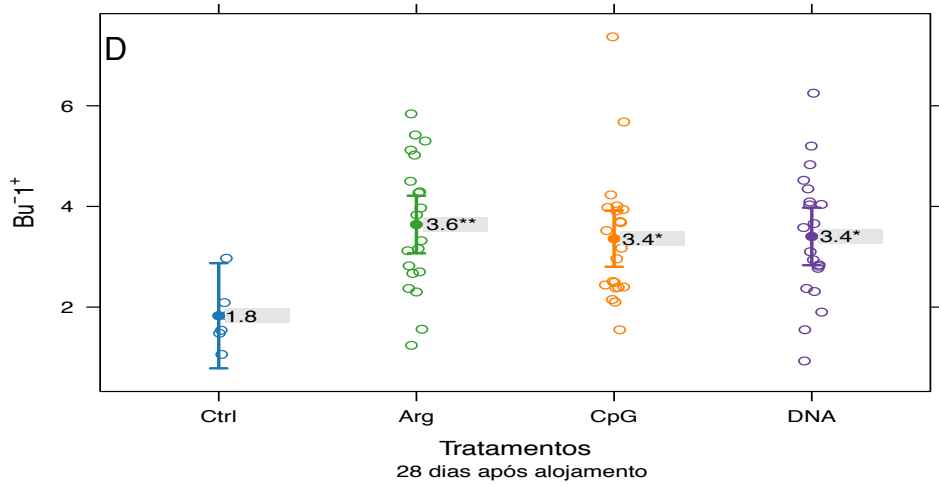
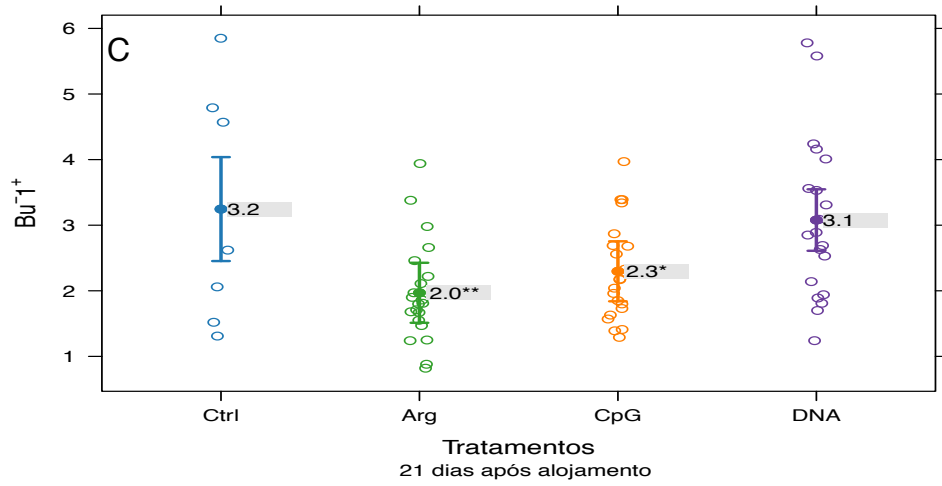




Linfócitos T CD4 não ativados (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos sete dias de idade. C) aos 14 dias de idade. D) aos 28 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

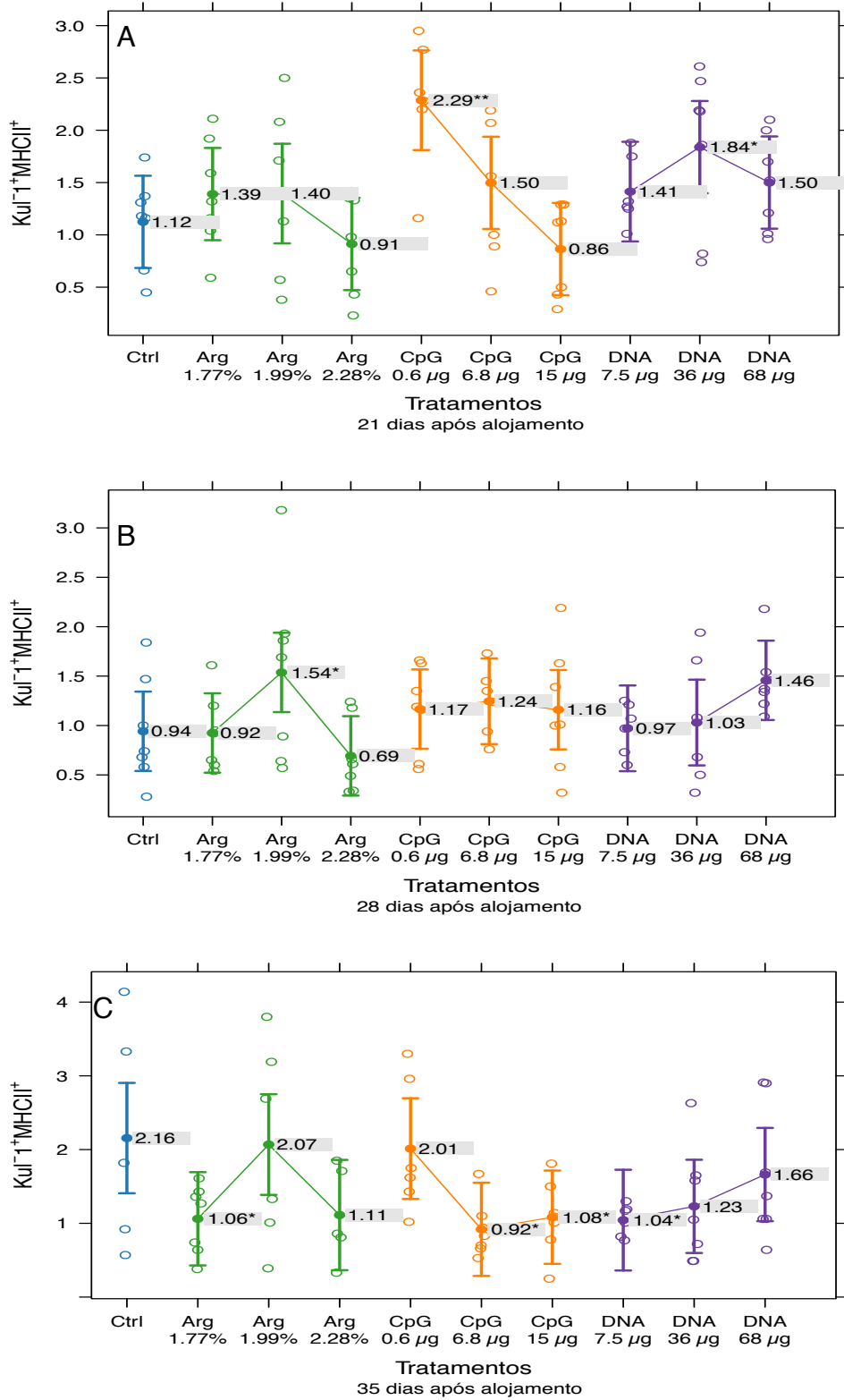
Figura 07 - Linfócitos B (Bu-1⁺)

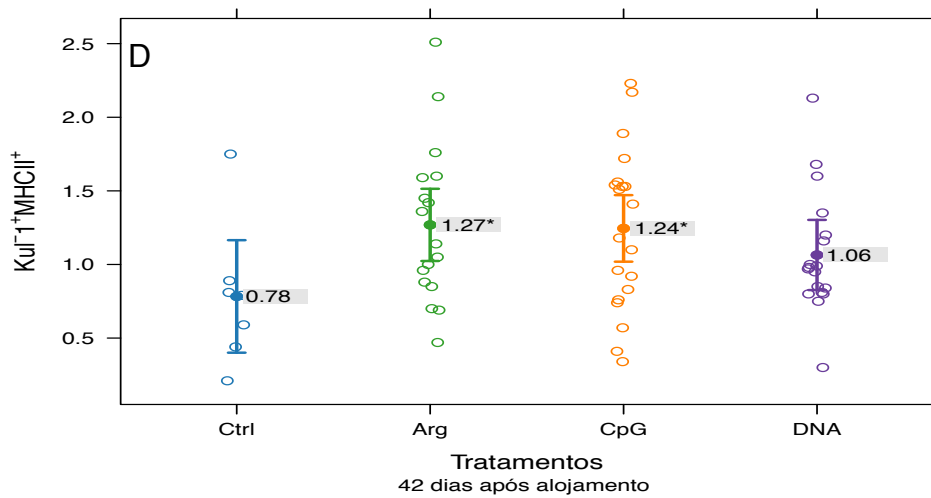




Linfócitos B (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 14 dias de idade. C) aos 21 dias de idade. D) aos 28 dias de idade. E) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

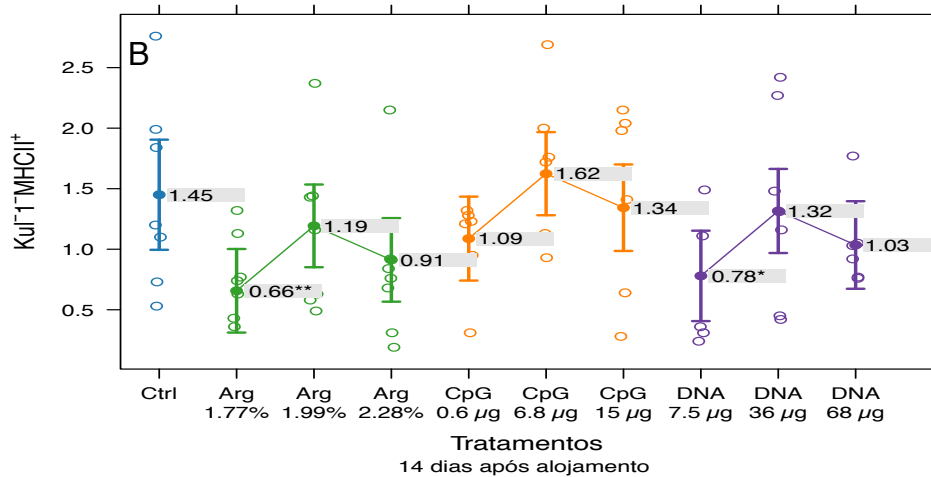
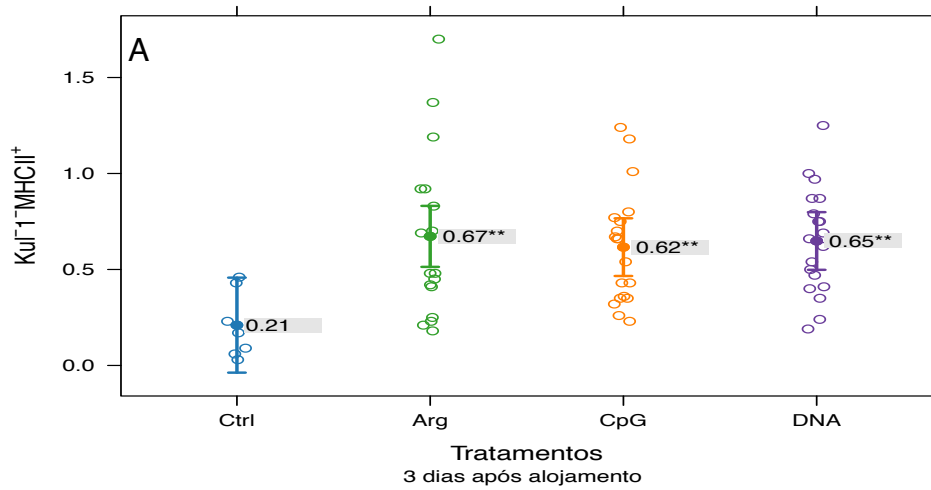
Figura 08 - Monócitos fagocíticos (Ku1⁺MHCII⁺)

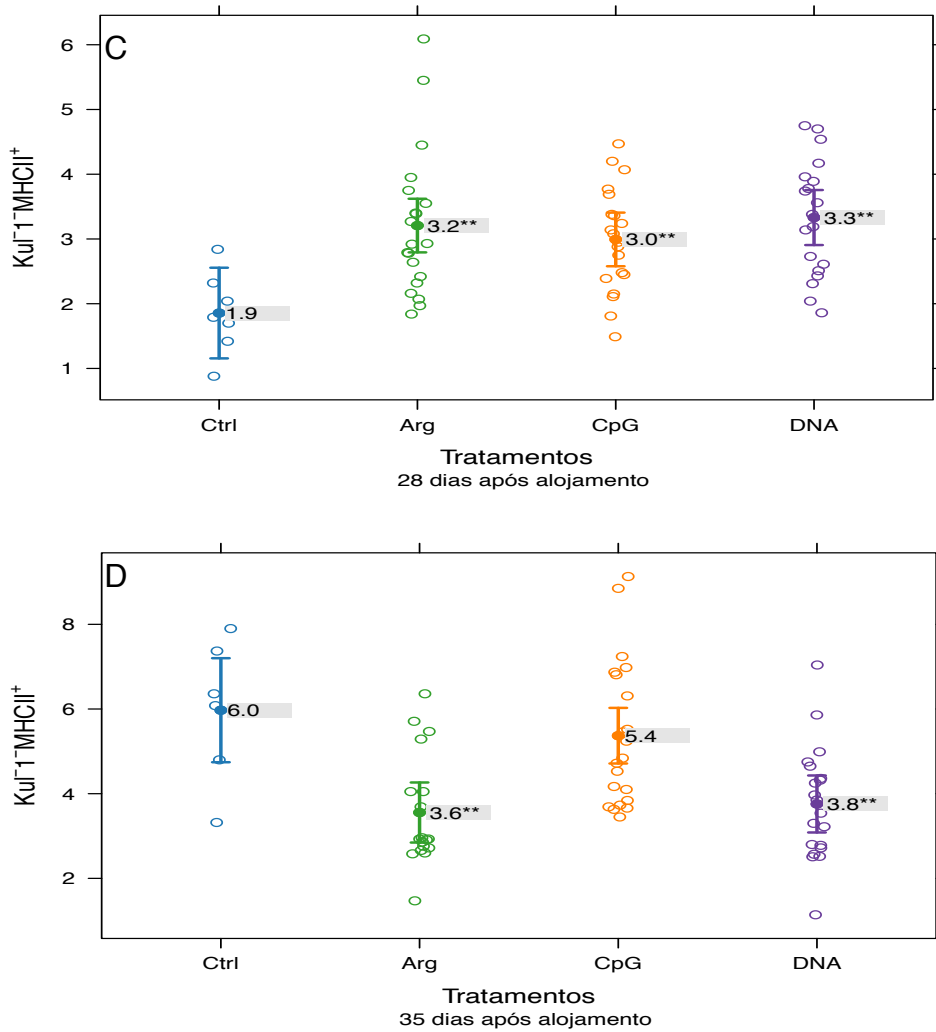




Monócitos fagocíticos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 21 dias de idade. B) aos 28 dias de idade. C) aos 35 dias de idade. D) aos 42 dias de idade. Diferenças expressas como *(p<0,05) e **(p<0,01).

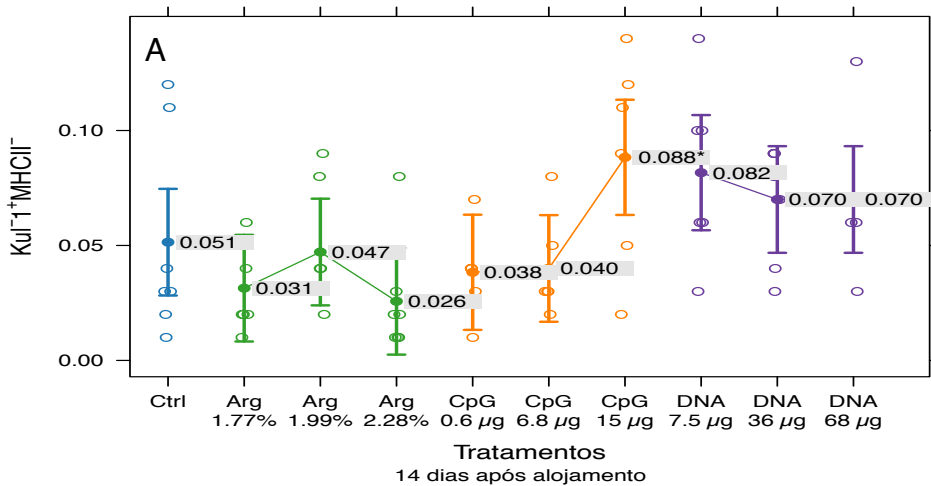
Figura 09 - APC não monócitos (Ku-1-MHCII⁺)

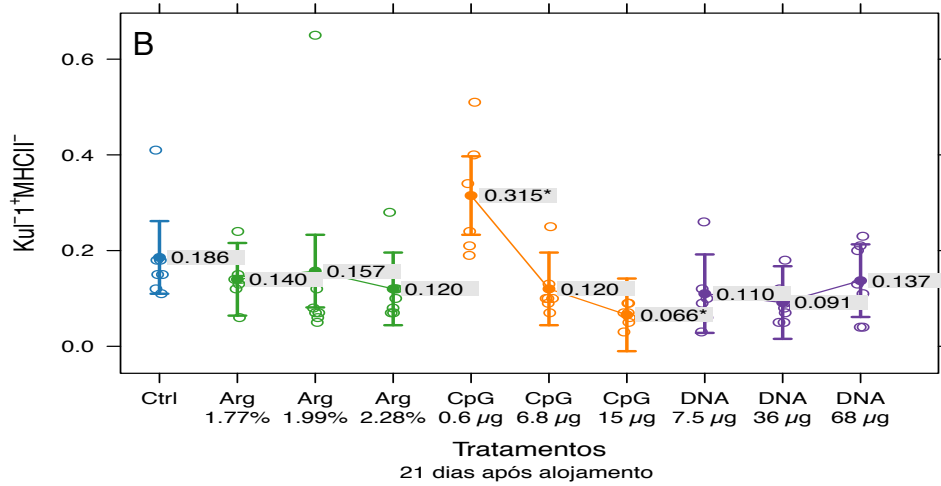




APC não monócitos (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos três dias de idade. B) aos 14 dias de idade. C) aos 28 dias de idade. D) aos 35 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

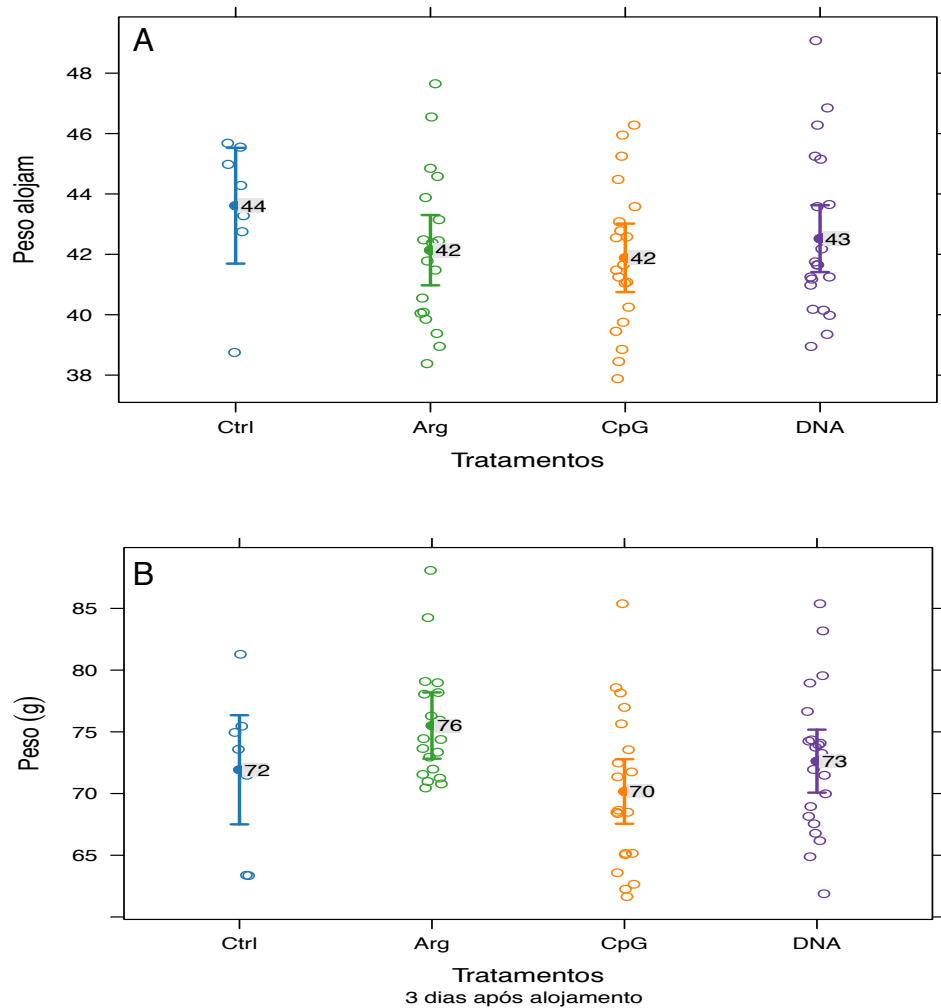
Figura 10 - Monócitos supressores de reposta ($Ku-1^+MHCII^-$)

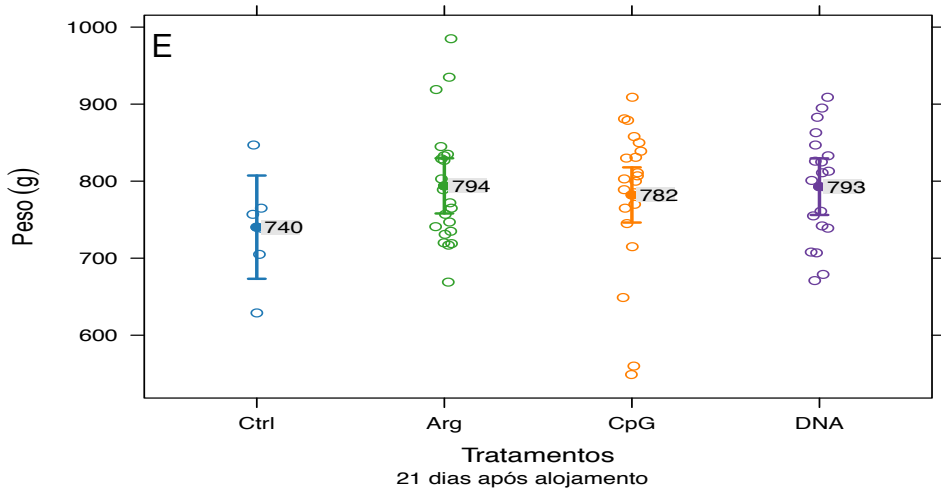
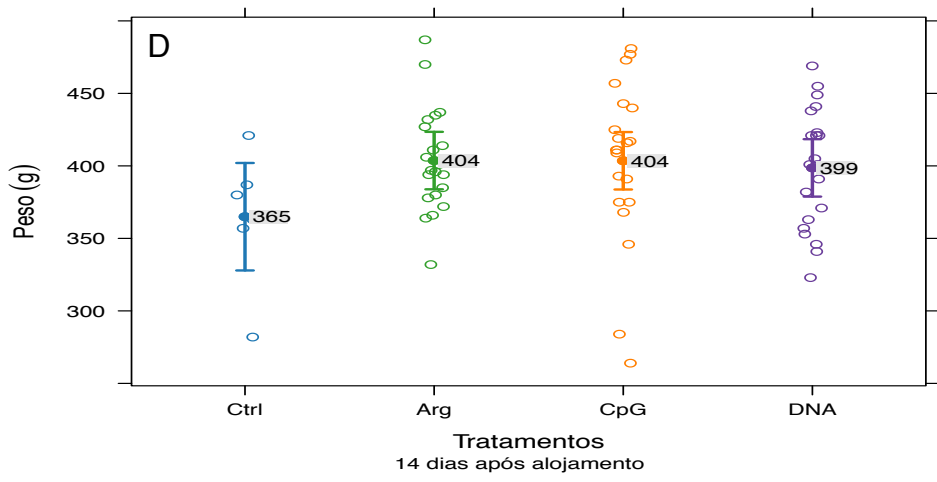
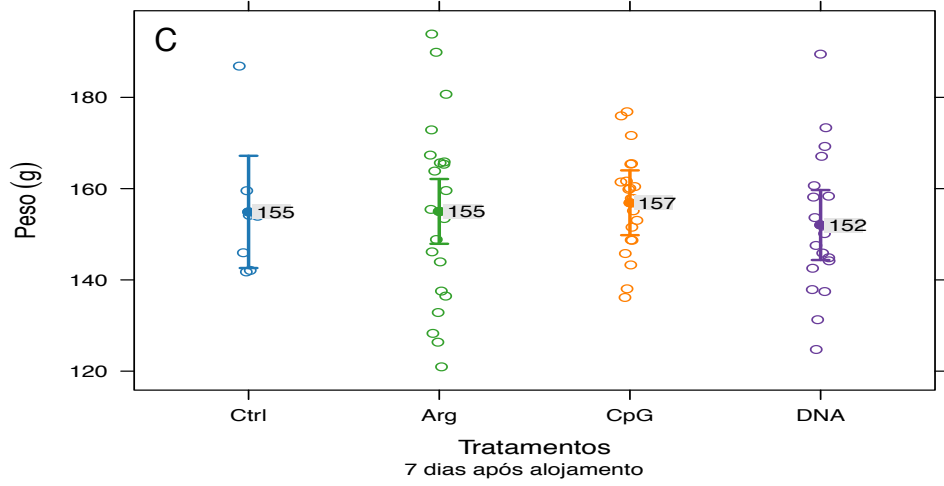


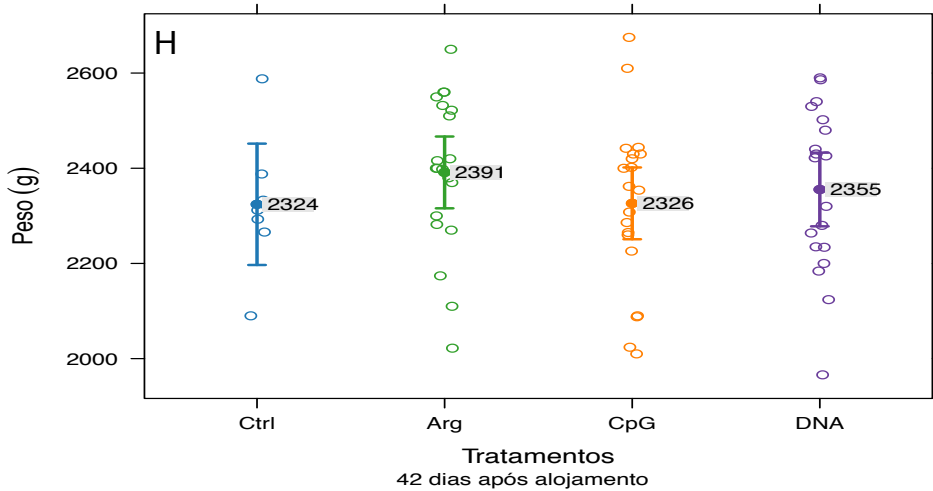
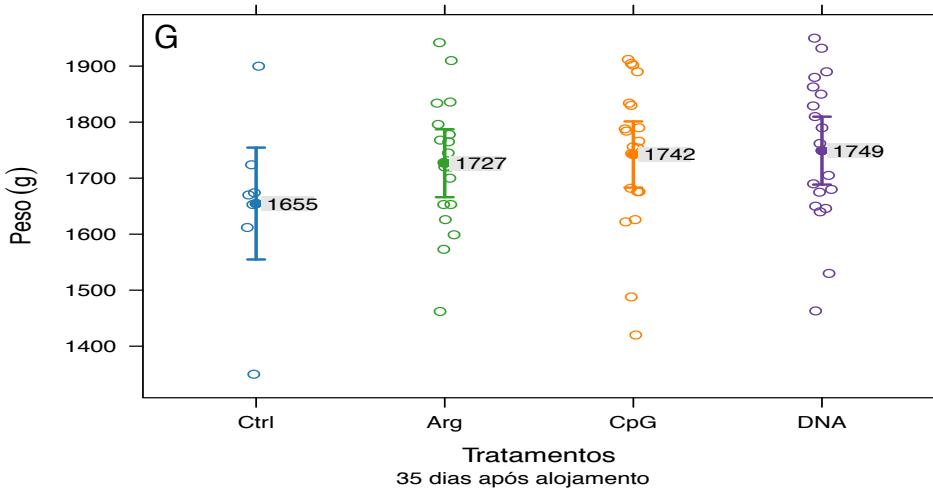
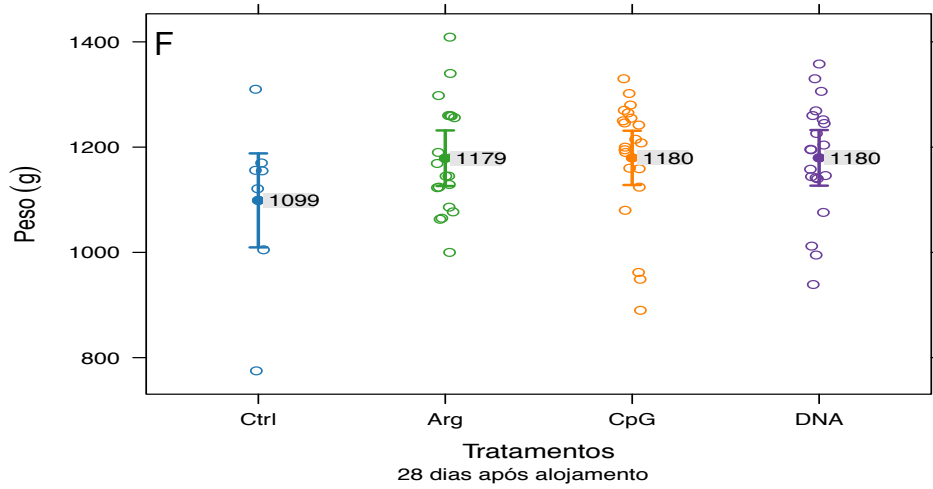


Monócitos supressores (%PBMC) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em três diferentes doses em comparação ao grupo controle (Ctrl). A) aos 14 dias de idade. B) aos 21 dias de idade. Diferenças expressas como *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

Figura 11 - Evolução do peso médio vivo







Peso vivo médio (g) dos grupos tratados Arginina (Arg), CpG e DNA total (DNA) em comparação ao grupo controle (Ctrl) A) no alojamento; B) aos três dias de idade; C) aos sete dias de idade; D) aos 14 dias de idade; E) aos 21 dias de idade; F) aos 28 dias de idade; G) aos 35 dias de idade; H) aos 42 dias de idade.

Quadro 04 - Efeito do DNA total na modulação imune de linfócitos T CD4: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	LINFÓCITO T CD4		
	IDADE (DIAS)	CD4 ⁺ TCRvβ1 ⁻	CD4 ⁺ TCRvβ1 ⁺
03	Sem efeito	↑ 36μg * 68μg **	↑ **
07	Sem efeito	↓ *	↓ **
14	Sem efeito	Sem efeito	↓ 7,5μg g*
28	↑ 36μg *	↑ *	↑ **
35	↑ 36μg *	Sem efeito	Sem efeito
42	Sem efeito	↓ *	Sem efeito

Quadro 05 - Efeito do DNA total na modulação imune de linfócitos T CD8: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	LINFÓCITO T CD8		
IDADE (DIAS)	CD8 α ⁺ CD28 ⁻	CD8 α ⁺ CD28 ⁺	CD4 ⁻ TCR ν β 1 ⁺
03	Sem efeito	Sem efeito	↑ 68 μ g *
14	Sem efeito	↓ **	Sem efeito
28	↑ *	↑ *	Sem efeito
42	↓ *	↓ **	↓ **

Quadro 06 - Efeito do DNA total na modulação imune de monócitos e APC: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	MONÓCITOS E APC		
IDADE (DIAS)	Kul-01 ⁺ MHCII ⁻	Kul-01 ⁺ MHCII ⁺	Kul-01 ⁻ MHCII ⁺
03	Sem efeito	Sem efeito	↑ **
14	Sem efeito	Sem efeito	↓ 7,5 μ g [*]
21	Sem efeito	↑ 36 μ g *	Sem efeito
28	Sem efeito	Sem efeito	↑ **
35	Sem efeito	↓ 7,5 μ g [*]	↓ **

Quadro 07 - Efeito do DNA total na modulação imune de linfócitos B: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	Linfócito B
IDADE (DIAS)	Bu-1+
03	↑ **
28	↑ *
42	↓ *

Quadro 08 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de linfócitos T CD4: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	LINFÓCITO T CD4		
IDADE (DIAS)	CD4+ TCRvβ1-	CD4+TCRvβ1+	CD8α-CD28+
03	Sem efeito	↑ 15μg *	Sem efeito
07	Sem efeito	↓ **	↓ **
28	↑ 0,6μ g** 6,8μ g**	↑ **	↑ **

Quadro 09 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de linfócitos T CD8: diferenças com relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

TIPO CELULAR	LINFÓCITO T CD8		
IDADE (DIAS)	CD8 α^+ CD28 $^-$	CD8 α^+ CD28 $^+$	CD4-TCR $\nu\beta$ 1 $^+$
03	Sem efeito	Sem efeito	↑ 15 μ g **
28	Sem efeito	Sem efeito	↑ *
35	Sem efeito	Sem efeito	↑ 15 μ g *
42	Sem efeito	↓ *	Sem efeito

Quadro 10 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de monócitos e APC: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	MONÓCITOS E APC		
IDADE (DIAS)	Kul-01+MHCII-	Kul-01+MHCII+	Kul-01-MHCII+
03	Sem efeito	Sem efeito	↑ **
14	↑ 15μg *	Sem efeito	Sem efeito
21	↑ 0,6μg g*	↑ 0,6μg g**	Sem efeito
28	Sem efeito	Sem efeito	↑ **
35	Sem efeito	↓ 6,8μg g* 15μg *	Sem efeito
42	Sem efeito	↑ *	Sem efeito

Quadro 11 - Efeito do CpG-ODN na modulação imune de linfócitos B: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	Linfócito B
IDADE (DIAS)	Bu-1+
21	↓ *
28	↑ *

Quadro 12 - Efeito da arginina na modulação de linfócitos T CD4: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	LINFÓCITO T CD4		
IDADE (DIAS)	CD4+ TCRvβ1-	CD4+TCRvβ1+	CD8α-CD28+
03	↑ *	↑ 1,77 %* 1,99 %** 2,28 %**	↑ *
07	Sem efeito	↓ **	↓ *
14	Sem efeito	Sem efeito	↓ 1,77%** 2,28 %*
28	↑ 1,99%* *	↑ **	↑ **
42	Sem efeito	↓ *	Sem efeito

Quadro 13 - Efeito da arginina na modulação de linfócitos T CD8: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	LINFÓCITO T CD8		
IDADE (DIAS)	CD8 α ⁺ CD28 ⁻	CD8 α ⁺ CD28 ⁺	CD4-TCR ν β 1 ⁺
03	Sem efeito	Sem efeito	↑ 1,99 %* 2,28 %**
14	Sem efeito	↓ **	Sem efeito
21	Sem efeito	↓ 2,28 %*	Sem efeito
42	Sem efeito	↓ **	↓ **

Quadro 14 - Efeito da arginina na modulação de monócitos e APC: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	MONÓCITOS E APC		
IDADE (DIAS)	Kul-01+MHCII-	Kul-01+MHCII+	Kul-01-MHCII+
03	Sem efeito	Sem efeito	↑ **
14	Sem efeito	Sem efeito	↓ 1,77% **
28	Sem efeito	↑ 1,99% *	↑ **
35	Sem efeito	↓ 1,77% *	↓ **
42	Sem efeito	↑ *	Sem efeito

Quadro 15 - Efeito da arginina na modulação de linfócitos B: diferenças com relação ao grupo controle (*p<0,05 ; **p<0,01).

TIPO CELULAR	Linfócito B
IDADE (DIAS)	Bu-1+
14	↓ **
21	↓ **
28	↑ **

Quadro 16 - Comparação de respostas das subpopulações de linfócitos T CD4 entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * (p<0,05) e ** (p<0,01).

TIPO CELULAR	CD4+TCRvβ1-		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
03	↑ *	Sem efeito	Sem efeito
28	↑ 1,99%* *	↑ 0,6μg ** 6,8μg **	↑ 36μg *
35	Sem efeito	Sem efeito	↑ 36μg *
TIPO CELULAR	CD4+TCRvβ1+		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
03	↑ 1,77%* 1,99%** 2,28%**	↑ 15μg*	↑ 36μg* 68μg* *
07	↓ **	↓ **	↓ *
28	↑ **	↑ **	↑ *
35	↓ *	Sem efeito	Sem efeito
42	Sem efeito	Sem efeito	↓ *

TIPO CELULAR	CD8 α -CD28 ⁺		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
03	↑ *	Sem efeito	↑ **
07	↓ *	↓ **	↓ **
14	↓ 1,77%* 2,28%* *	Sem efeito	↓ 5,7 μ g*
28	↑ **	↑ **	↑ **

Quadro 17 - Comparação de respostas das subpopulações de linfócitos T CD8 entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

TIPO CELULAR	CD8 α +CD28 ⁻		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
28	Sem efeito	Sem efeito	↑ *
42	Sem efeito	Sem efeito	↓ *
TIPO CELULAR	CD8 α +CD28 ⁺		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
14	↓ **	Sem efeito	↓ **
21	↓ 2,28%*	Sem efeito	Sem efeito
28	Sem efeito	Sem efeito	↑ *

42	↓ **	↓ *	↓ **
TIPO CELULAR	CD4-TCRvβ1+		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
03	↑ 1,99 %* 2,28 %**	↑ 15μg* *	↑ 68μg*
28	Sem efeito	↑ *	Sem efeito
35	Sem efeito	↑ 15μg*	Sem efeito
42	↓ **	Sem efeito	↓ **

Quadro 18 - Comparação de respostas das subpopulações de monócitos e outras células apresentadoras de antígeno entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

TIPO CELULAR	Kul-01+MHCII-		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
14	Sem efeito	↑ 15μg*	Sem efeito
21	Sem efeito	↑ 0,6μg *	Sem efeito
TIPO CELULAR	Kul-01+MHCII+		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
21	Sem efeito	↑ 0,6μg **	↑ 36μg*

28	↑ 1,99 %*	Sem efeito	Sem efeito
35	↓ 1,77%*	↓ 6,8μg* 15μg*	↓ 7,5μg*
42	↑ *	↑ *	Sem efeito
TIPO CELULAR	KuI-01-MHCII+		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
03	↑ **	↑ **	↑ **
14	↓ 1,77%*	Sem efeito	↓ 7,5μg*
28	↑ **	↑ **	↑ **
35	↓ **	Sem efeito	↓ **

Quadro 19 - Comparação de respostas das subpopulações de linfócitos B entre os grupos tratamento (CpG-ODN, DNA total e Arginina) frente ao grupo controle. Diferenças expressas como * (p<0,05) e ** (p<0,01).

TIPO CELULAR	Bu-1+		
IDADE (DIAS)	Arginina	CpG-ODN	DNA total
03	Sem efeito	Sem efeito	↑ **
14	↓ **	Sem efeito	Sem efeito
21	↓ **	↓ *	Sem efeito

28	↑ **	↑ *	↑ *
42	Sem efeito	Sem efeito	↓ *

ANEXOS

Certificado de aprovação no CEUA/UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 602

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.108888/2011-11

APROVADO: 03/04/2012 – R.O. 03/2012

TÍTULO: Utilização de citometria de fluxo e PCR em tempo real para análise do perfil imunológico de galinhas frente a potenciais imunomoduladores e sua correlação com o desempenho zootécnico

AUTORES: Luiz Felipe Caron, Tobias Fernandes Filho, Silvio Marques Zanata, Max Ingberman, Celso Fávoro Jr.

DEPARTAMENTO: Patologia Básica

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEUA

Protocolo de extração de DNA total

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO	
Componente	Concentração
Tris-HCl pH 8,0	125 mM
NaCl	200 mM
EDTA pH 8,0	50 mM
SDS pH 7,2	1%
H ₂ O Mili-Q	q.s.p volume desejado

SOLUÇÕES		
PASSO S	CLOROFANE	CLOROFIL
1	1 Clorofórmio (CHCl ₃): 1 fenol saturado (C ₆ H ₅ OH)	24 Clorofórmio (CHCl ₃): 1 álcool isoamílico ((CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ OH))
2	Adicionar Tris-HCl 1M pH 8,0 (q.s.p cobrir superfície da solução)	-
3	Aguardar ao menos 04 horas antes de utilizar	-

PROCEDIMENTOS		OBJETIVO
1	Submeter meio de cultura a centrifugação (10.000 g - 2 minutos)	Obter pellet celular
2	Adicionar até 2.000µL do tampão de extração previamente aquecido em banho-maria (60°C) e deixar 5 minutos no vórtex	Aceleração da lise química pela ação detergente do SDS com auxílio de força mecânica
3	Incubar por 20 minutos em banho-maria, homogeneizando com periodicidade	Aceleração da lise química pela ação detergente do SDS com aumento da temperatura

PROCEDIMENTOS		OBJETIVO
4	Incubar no gelo por 10 minutos	Aumentar a eficiência da desproteíntização por <i>salting out</i>
5	Centrifugar por 10 minutos a 10.000 g	Retirar debris celulares
6	Transferir sobrenadante para um tubo nomeado e adicionar mesmo volume de CLOROFANE. Homogeneizar e centrifugar (10.000 g - 5 minutos)	Por serem ótimos solventes orgânicos, fenol e clorofórmio retêm proteínas lipossolúveis e a porção hidrofóbica de proteínas mistas. A interfase gerada após centrifugação será rica em proteínas.
7	Transferir até 90% do sobrenadante para um tubo nomeado e adicionar mesmo volume de CLOROFIL. Homogeneizar e centrifugar (10.000 g - 5 minutos)	Solubilizar proteínas e retirar resíduos de fenol
8	Transferir até 90% do sobrenadante para um tubo nomeado e adicionar mesmo volume de ISOPROPANOL. Homogeneizar e centrifugar (10.000 g - 20 minutos)	A água tem como característica alta constante dielétrica, ou seja, é um bom material isolante. Os álcoois adicionados, etanol ou isopropanol, reduzem a constante dielétrica da solução, aumentando a força eletrostática entre ânions e cátions. Como há um cátion na solução (Na ⁺), ele terá força suficiente para se unir fortemente ao esqueleto de poliânion do DNA (PO ₄ ³⁻), tornando a carga da molécula e a mesma hidrofóbica, bastando uma centrifugação para remover o DNA da solução.
9	Verter a fase aquosa com cuidado. Adicionar 500µL de etanol 70% (para cada 1.000µL obtido no passo 6), agitar brevemente e centrifugar por 10 minutos a 12.000 g	-

PROCEDIMENTOS		OBJETIVO
10	Verter a fase aquosa com cuidado. Deixar secar por 30 minutos em estufa 37°C. Adicionar 50µL de água ultrapura e ressuspender o pellet. Aguardar por pelo menos uma hora antes de proceder qualquer protocolo	-

Análise de aminoácidos das rações basal (Batida 1 e 2), tratamentos arginina 1,77% (T8) 1,99% (T9) e 2,28% (T10).

AMINO^{Lab}[®]

Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - Batida 1

Lab code: 2012/07847

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Proteína Bruta (%)*: 20.24

Proteína Bruta (% tal qual): 20.42

Matéria seca (%): 88.77

Resultados das análises de aminoácidos / Conteúdos totais após a hidrólise protéica

Aminoácido	Conteúdo (%)**	AA (%) na PB	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.53	2.63	0.54
Cistina	0.32	1.60	0.33
Metionina + Cistina	0.86	4.23	0.86
Lisina	1.18	5.82	1.19
Treonina	0.79	3.88	0.79
Triptofano	0.24	1.17	0.24
Arginina	1.29	6.37	1.30
Isoleucina	0.84	4.15	0.85
Leucina	1.68	8.29	1.69
Valina	0.94	4.63	0.95
Histidina	0.54	2.67	0.55
Fenilalanina	0.99	4.89	1.00
Glicina	0.82	4.04	0.82
Serina	0.93	4.61	0.94
Prolina	1.21	5.97	1.22
Alanina	0.97	4.80	0.98
Ácido aspártico	1.96	9.68	1.98
Ácido glutâmico	3.42	16.90	3.45
Total (sem NH ₃)	18.65	92.1	18.82
Amônia	0.41	2.01	0.41
Total	19.06	94.11	19.23

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%

AA=Aminoácido, PB=Proteína Bruta



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.

Dr. I. Reimann



Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - Batida 1

Lab code: 2012/07847

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Matéria seca (%): 88.77

Conteúdos suplementados

Parâmetro	Conteúdo (%)**	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.279	0.281
Lisina	0.159	0.160
Treonina	0.071	0.072
Arginina	0.055	0.055

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.

Dr. I. Reimann



Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - Batida 2

Lab code: 2012/07848

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Proteína Bruta (%)*: 19.86

Proteína Bruta (% tal qual): 20.04

Matéria seca (%): 88.78

Resultados das análises de aminoácidos / Conteúdos totais após a hidrólise protéica

Aminoácido	Conteúdo (%)**	AA (%) na PB	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.53	2.66	0.53
Cistina	0.33	1.65	0.33
Metionina + Cistina	0.86	4.31	0.86
Lisina	1.20	6.05	1.21
Treonina	0.80	4.03	0.81
Triptofano	0.23	1.18	0.24
Arginina	1.32	6.64	1.33
Isoleucina	0.85	4.30	0.86
Leucina	1.70	8.57	1.72
Valina	0.95	4.77	0.96
Histidina	0.55	2.76	0.55
Fenilalanina	1.00	5.02	1.01
Glicina	0.83	4.19	0.84
Serina	0.96	4.84	0.97
Prolina	1.22	6.13	1.23
Alanina	0.98	4.95	0.99
Ácido aspártico	2.01	10.10	2.03
Ácido glutâmico	3.48	17.50	3.51
Total (sem NH ₃)	18.94	95.34	19.12
Amônia	0.43	2.14	0.43
Total	19.37	97.48	19.55

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%

AA=Aminoácido, PB=Proteína Bruta



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.

Dr. I. Reimann



Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - Batida 2

Lab code: 2012/07848

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Matéria seca (%): 88.78

Conteúdos suplementados

Parâmetro	Conteúdo (%)**	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.250	0.252
Lisina	0.135	0.136
Treonina	0.061	0.062
Arginina	0.053	0.053

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
 feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.

Dr. I. Reimann



Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - T8

Lab code: 2012/07849

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Proteína Bruta (%)*: 20.70

Proteína Bruta (% tal qual): 20.89

Matéria seca (%): 88.81

Resultados das análises de aminoácidos / Conteúdos totais após a hidrólise protéica

Aminoácido	Conteúdo (%)**	AA (%) na PB	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.53	2.55	0.53
Cistina	0.32	1.56	0.33
Metionina + Cistina	0.85	4.11	0.86
Lisina	1.17	5.63	1.18
Treonina	0.79	3.81	0.80
Triptofano	0.23	1.13	0.24
Arginina	1.76	8.49	1.77
Isoleucina	0.85	4.10	0.86
Leucina	1.68	8.13	1.70
Valina	0.94	4.56	0.95
Histidina	0.55	2.63	0.55
Fenilalanina	1.00	4.81	1.00
Glicina	0.82	3.98	0.83
Serina	0.94	4.54	0.95
Prolina	1.19	5.75	1.20
Alanina	0.97	4.70	0.98
Ácido aspártico	1.98	9.58	2.00
Ácido glutâmico	3.43	16.60	3.46
Total (sem NH3)	19.15	92.55	19.33
Amônia	0.43	2.07	0.43
Total	19.58	94.62	19.76

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%

AA=Aminoácido, PB=Proteína Bruta



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.

Dr. I. Reimann



Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - T8

Lab code: 2012/07849

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Matéria seca (%): 88.81

Conteúdos suplementados

Parâmetro	Conteúdo (%)**	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.273	0.276
Lisina	0.144	0.145
Treonina	0.067	0.068
Arginina	0.532	0.537

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.

Dr. I. Reimann



Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - T9

Lab code: 2012/07850

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Proteína Bruta (%)*: 20.99

Proteína Bruta (% tal qual): 21.15

Matéria seca (%): 88.64

Resultados das análises de aminoácidos / Conteúdos totais após a hidrólise protéica

Aminoácido	Conteúdo (%)**	AA (%) na PB	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.53	2.53	0.53
Cistina	0.33	1.59	0.34
Metionina + Cistina	0.86	4.11	0.87
Lisina	1.19	5.65	1.20
Treonina	0.80	3.83	0.81
Triptofano	0.24	1.13	0.24
Arginina	1.98	9.43	1.99
Isoleucina	0.83	3.97	0.84
Leucina	1.69	8.05	1.70
Valina	0.93	4.43	0.94
Histidina	0.54	2.59	0.55
Fenilalanina	1.00	4.76	1.01
Glicina	0.83	3.94	0.83
Serina	0.98	4.65	0.98
Prolina	1.23	5.85	1.24
Alanina	0.98	4.67	0.99
Ácido aspártico	2.00	9.52	2.01
Ácido glutâmico	3.46	16.50	3.49
Total (sem NH ₃)	19.54	93.09	19.69
Amônia	0.41	1.95	0.41
Total	19.95	95.04	20.1

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%

AA=Aminoácido, PB=Proteína Bruta



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.

Dr. I. Reimann



Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - T9

Lab code: 2012/07850

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Matéria seca (%): 88.64

Conteúdos suplementados

Parâmetro	Conteúdo (%)**	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.273	0.275
Lisina	0.150	0.151
Treonina	0.070	0.071
Arginina	0.760	0.766

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
 feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.



Dr. I. Reimann

Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - T10

Lab code: 2012/07851

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Proteína Bruta (%)*: 21.49

Proteína Bruta (% tal qual): 21.73

Matéria seca (%): 88.98

Resultados das análises de aminoácidos / Conteúdos totais após a hidrólise protéica

Aminoácido	Conteúdo (%)**	AA (%) na PB	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.54	2.51	0.55
Cistina	0.33	1.54	0.33
Metionina + Cistina	0.87	4.05	0.88
Lisina	1.18	5.50	1.20
Treonina	0.80	3.72	0.81
Triptofano	0.23	1.08	0.23
Arginina	2.25	10.50	2.28
Isoleucina	0.84	3.89	0.85
Leucina	1.68	7.83	1.70
Valina	0.93	4.34	0.94
Histidina	0.55	2.54	0.55
Fenilalanina	1.00	4.67	1.02
Glicina	0.83	3.85	0.84
Serina	0.96	4.48	0.97
Prolina	1.21	5.61	1.22
Alanina	0.98	4.54	0.99
Ácido aspártico	2.00	9.28	2.02
Ácido glutâmico	3.46	16.10	3.49
Total (sem NH ₃)	19.77	91.98	19.99
Amônia	0.43	1.99	0.43
Total	20.2	93.97	20.42

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%

AA=Aminoácido, PB=Proteína Bruta



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.



Dr. I. Reimann

Analytical Report

Universidade Federal do Parana (UFPR) (54927), Brazil

Descrição: Ração Experimento Tobias - T10

Lab code: 2012/07851

Data de entrega: 31 July 2012

Data de liberação: 24 August 2012

Matéria seca (%): 88.98

Conteúdos suplementados

Parâmetro	Conteúdo (%)**	Conteúdo (% tal qual)
Metionina	0.249	0.252
Lisina	0.130	0.131
Treonina	0.062	0.063
Arginina	0.942	0.952

*Valore padronizado para uma matéria seca de 88%



Evonik Industries AG feed additives | Animal Nutrition Services
 feed-additives@evonik.com | www.aminoacidsandmore.com

Evonik. Power to create.



Dr. I. Reimann