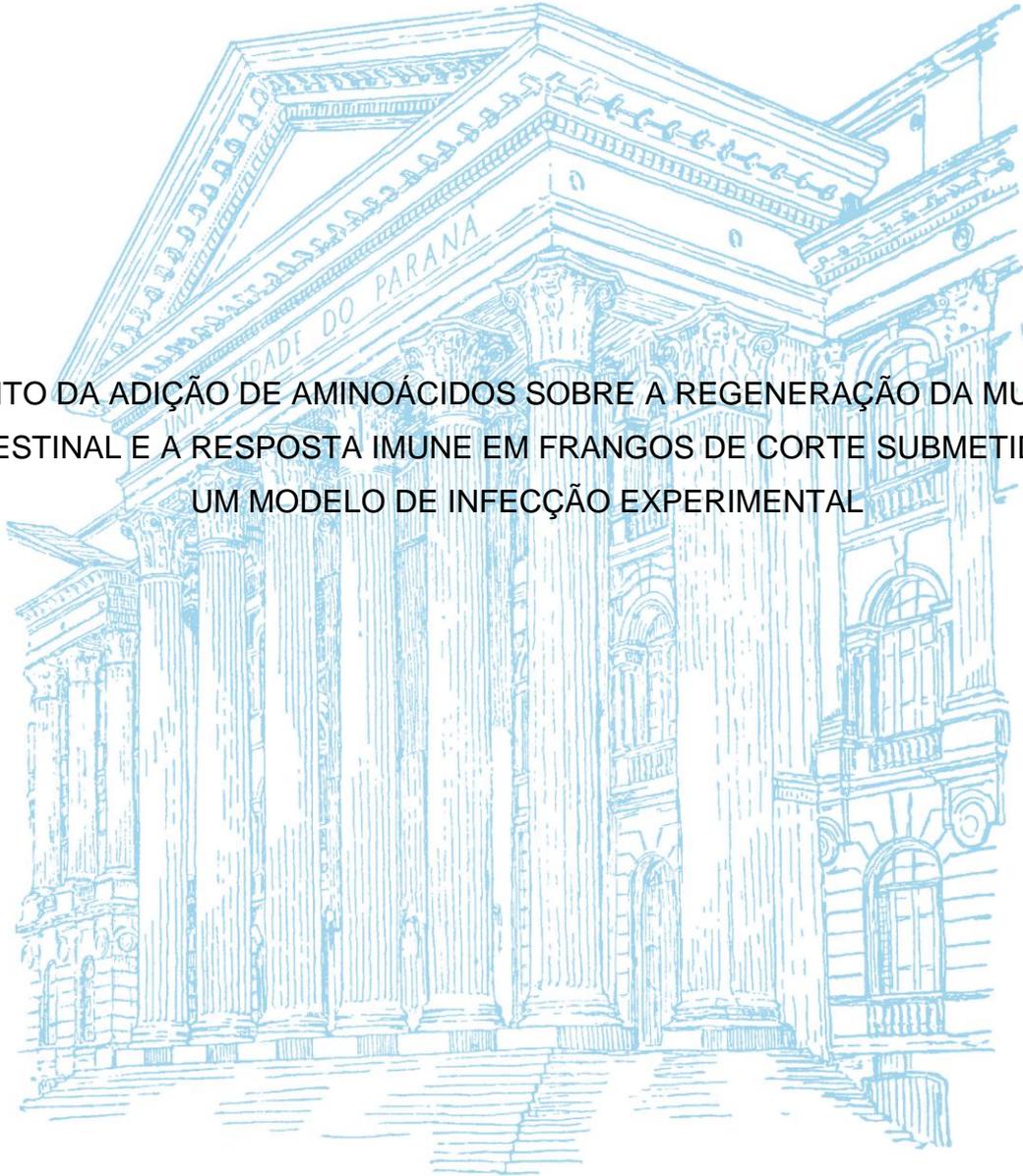


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELISANGELA THAÍSA GOTTARDO

EFEITO DA ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE A REGENERAÇÃO DA MUCOSA
INTESTINAL E A RESPOSTA IMUNE EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A
UM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL



PALOTINA

2014

ELISANGELA THAÍSA GOTTARDO

EFEITO DA ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE A REGENERAÇÃO DA MUCOSA
INTESTINAL E A RESPOSTA IMUNE EM FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A
UM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, área de concentração Produção Animal, linha de pesquisa em Nutrição Avícola, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Jovanir Inês Muller Fernandes

PALOTINA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G685 Gottardo, Elisangela Thaísa

Efeito da adição de aminoácidos sobre a regeneração da mucosa intestinal e a resposta imune em frangos de corte submetidos a um modelo de infecção experimental / Elisangela Thaísa Gottardo; Orientador, Jovanir Inês Muller Fernandes - Palotina, PR, 2014.
107p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR -- Área de concentração: Produção Animal, linha de pesquisa em Nutrição Avícola. Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, 2014.

1.Aminoácidos. 2. Células Caliciformes. 3.Sistema Imune. I. Fernandes, Jovanir Inês Muller II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Produção Animal . III. Título

CDU 591.53

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

ELISANGELA THAISA GOTTARDO

EFEITO DA ADIÇÃO DE AMONOÁCIDOS SOBRE A REGENERAÇÃO DA
MUCOSA INTESTINAL E A RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE
SUBMETIDOS A UM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção
Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca
Examinadora:

Profª Drª Jovanir Inês Müller Fernandes
Presidente/Coorientadora: Universidade Federal do Paraná

Profª Drª Alice Eiko Murakami
Membro: Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Aline De Marco Viott
Membro: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Palotina, 30 de maio de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Elisangela Thaísa Gottardo, filha de Isabel Fátima Martins Gottardo e Celso José Gottardo (*in memorian*), nasceu em Cascavel no Paraná, dia 25 de Abril de 1988.

Iniciou o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina em Março de 2006, concluído em Dezembro de 2010.

Também em Dezembro desse mesmo ano foi contratada pela empresa Tyson do Brasil Agroindustrial, na cidade de Campo Mourão, no Paraná, onde atuou no fomento de frangos de corte até o mês de Maio de 2012.

Em Março de 2012 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UFPR – Campus Palotina.

Em fevereiro de 2013 foi contratada pela Empresa Globoaves Agroavícola, na cidade de Cascavel, no Paraná, atua na área de Nutrição Animal.

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.

(Martin Luter king)

À minha mãe, pela força, amor e incentivo para ser melhor sempre.

Ao meu marido Francisco, pelo amor incondicional, pela cumplicidade e por estar ao meu lado a cada dia.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma arte, só o faz verdadeiramente quem vê, sente, e vive a vida como um presente, uma possibilidade que se renova a cada dia. “Agradecer é estar certo de que alguém fez a diferença em sua vida”.

À Deus por permitir que eu chegasse até aqui, por guiar sempre os meus passos, me dando o discernimento sobre as escolhas e direções a seguir.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Jovanir, pelo exemplo de pessoa, de mãe, de profissional, que coloca em primeiro lugar o respeito e a busca pelo melhor para todos. Pela oportunidade a mim concedida de ser sua primeira aluna de mestrado, e poder aprender muito com seu vasto conhecimento nesses anos de convivência e amizade.

Ao meu marido Francisco, por seu apoio e compreensão. Pelo amor que nos une, por estar ao meu lado, nos momentos difíceis, nas horas boas, por compartilhar comigo a vontade de ser melhor e crescer sempre!

À minha mãe Isabel, por seu esforço e dedicação para que o primeiro passo fosse dado em busca de um sonho, que eu conseguisse me tornar Médica Veterinária, e agora Mestre. Por todos os dias de amor, atenção e cuidados dedicados a mim. A você, a minha mais sincera gratidão.

À Universidade Federal do Paraná, por disponibilizar a estrutura física para a execução do experimento e pelo competente corpo docente, que permite a formação de profissionais de qualidade, sendo reconhecida por isso.

Ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, pela oportunidade de cursar o Mestrado, com professores tão preparados, proporcionando um aprendizado completo, que será levado para toda a vida profissional.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, campus Palotina, pela oportunidade de acesso ao conhecimento e a pesquisa, compartilhados ao decorrer do curso.

Ao Prof. Alexandre Leseur, por seus conhecimentos em estatística, seus auxílios em momentos de dúvida, nessa área tão importante para a pesquisa.

À Prof^a Dr^a Tatiana Carlesso, pela Co-orientação, por partilhar seu conhecimento, auxiliar para que fosse possível a execução das análises feitas na Universidade Estadual de Maringá. Por todas as idéias compartilhadas, pela participação efetiva para que fosse possível a conclusão desse experimento.

Aos alunos de Iniciação Científica do LEA (Laboratório de Experimentação Avícola), Karen, Bruna, Douglas (*in memoriam*) e Cassiano, que compartilharam a responsabilidade da execução da melhor forma possível desse experimento, em momentos que não pude estar presente, assim como nas extensas análises.

Aos estagiários do LEA, que executaram grande parte das análises e leituras, a vocês devo o mérito de os resultados estarem concluídos a tempo, e aos resultados obtidos. Jean, Anete, Rafaela, Adriele, Bruno, Alvaro, Robson, Diego, Heloisa, Camila, Daiane, Joice, Patricia, Bruna, enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão desse experimento, meu sincero agradecimento!

Às amigas Diana e Rúbia, pelo estreito convívio e tudo que compartilhamos, amizades, sonhos, mais que colegas de mestrado, amigas e companheiras que levarei para sempre!

À Kira Agostini, pela sua amizade, e pela acolhida em sua casa, sempre que foi necessário, meu carinho e gratidão.

Aos colegas da primeira turma de Mestrado da UFPR – Campus Palotina, pelas trocas de experiências, informações e auxílios mútuos.

À Globoaves Agroindustrial, por permitir que me ausentasse para cumprir as obrigações para com o Programa de Pós Graduação.

À Franciele Bess, por seu exemplo de profissional da Nutrição Animal, pela compreensão nas ausências da empresa, por permitir que me dedicasse ao Mestrado, mesmo durante períodos importantes para o setor. Ao Ivânio, pelo conhecimento, discussões sobre Nutrição, estatística, e pelo apoio para a conclusão dessa etapa.

À Ajinomoto, pelo fornecimento dos aminoácidos, possibilitando que fosse possível a execução desse experimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À CAPES pela bolsa fornecida, que possibilitou por um período a dedicação exclusiva ao Programa de Pós Graduação.

À todos que, de uma forma ou de outra contribuíram para que esse projeto fosse possível, e esse sonho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A nutrição direcionada à melhoria da resposta imune e reparação da mucosa do trato gastrointestinal tem tido grande importância, por ter impacto significativo sobre o crescimento e produção de frangos de corte. O objetivo do projeto foi avaliar a regeneração da mucosa intestinal e a resposta imune de frangos de corte submetidos à um modelo de infecção experimental e suplementados com aminoácidos: glutamina, arginina e treonina. Foram 600 pintos de corte da linhagem Cobb, machos, de 1 dia de idade. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (com e sem desafio experimental e 3 dietas). Uma dieta comercial foi utilizada como controle e outras duas dietas foram elaboradas com glutamina, associada ao ácido glutâmico (1,5 e 3% de Aminogut[®]), arginina (1 e 2% de L-Arginina) e treonina (1 e 2% de L-treonina). A análise estatística dos dados foi realizada pelo procedimento GLM do software SAS. As aves que consumiram as dietas suplementadas com aminoácidos apresentaram uma melhor ($p < 0,05$) conversão alimentar no período de 1 a 42 dias. A capacidade de proliferação celular e a relação vilo:cripta frente ao desafio entérico foi maior ($p < 0,05$) para as aves que receberam as dietas suplementadas. O rendimento de carcaça e cortes nobres não foram influenciados ($p > 0,05$) pela suplementação de aminoácidos. Os níveis elevados de aminoácidos nas rações experimentais se refletiram nos maiores ($p < 0,05$) níveis proteicos na cama do aviário, sem, no entanto, interferir na produção de amônia. As aves que consumiram as dietas suplementadas com aminoácidos apresentaram, aos 28 dias, menores valores de IgA ($p < 0,05$) detectados na mucosa intestinal. O número de células caliciformes foi maior nas aves que foram suplementadas com o maior nível de aminoácidos em relação ao nível intermediário. Uma semana pós-infecção as aves desafiadas apresentaram menores ($p < 0,05$) medidas do timo que as aves não desafiadas, independente da suplementação de aminoácidos. Já aos 28 dias, aves não desafiadas e que receberam os níveis mais altos de aminoácidos apresentaram menores ($p < 0,05$) área e índice esplênicos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas medidas da bolsa cloacal. Aos 28 dias, as aves desafiadas e que receberam o nível intermediário de aminoácidos apresentaram maior ($p < 0,05$) contagem de aglomerados linfóides. Os níveis séricos de AST, uréia e ácido úrico foram afetados pela suplementação dos aminoácidos

($p < 0,05$), de modo que os maiores valores foram observados nas aves que receberam os maiores níveis dos aminoácidos. A suplementação de dietas com aminoácidos pode contribuir positivamente para a melhoria do sistema imune, regeneração e proliferação da mucosa intestinal e como consequência a manutenção do desempenho zootécnico de frangos de corte quando submetidos à situações de desafio entérico.

Palavras-chave: aminoácidos, reparo intestinal, sistema imune, PCNA, células caliciformes

ABSTRACT

Nutrition management to improve immune response and mucosal repair of the gastrointestinal tract has been studied because of the significant impact on broiler growth and production. This work evaluated the regeneration of the intestinal mucosa and the immune response of broilers experimentally infected and supplemented with amino acids: glutamine, arginine and threonine. 600 one-day-old male Cobb broilers were distributed in a completely randomized design with a 2x3 factorial arrangement (with and without challenge and 3 diets). A commercial diet was the control and two diets were prepared with glutamine associated with glutamic acid (1.5 and 3% Aminogut[®]), arginine (1 and 2% L-Arginine) and threonine (1 and 2% L-threonine). Statistical analyses were run using the GLM procedure of SAS. Broilers that received diets supplemented with amino acids showed a better ($p<0.05$) feed conversion in the period between 1 and 42 days. Cell proliferation ability and villus: crypt ratio in challenged chicks was higher ($p<0.05$) for supplemented birds. Carcass and prime cuts yield was not affected ($p>0.05$) by amino acid supplementation. High content of amino acids in experimental diets resulted in greater ($p<0.05$) protein levels in the poultry litter, without interfering with the production of ammonia. Broilers that consumed diets supplemented with amino acids showed, at 28 days, lower IgA values ($p<0.05$) in the intestinal mucosa. Goblet cells were more numerous in broilers supplemented with the highest level of amino acids. One week after infection, challenged birds showed smaller ($p<0.05$) measurements of the thymus, regardless of the amino acid supplementation. At 28 days, non-challenged birds that received the highest levels amino acids exhibited lower values ($p<0.05$) of spleen area and index. No significant difference ($p>0.05$) was detected in the measurements of the cloacal bursa. Challenged birds supplemented with the intermediate level of amino acids showed higher ($p<0.05$) number of lymphoid clusters at 28 days. Serum AST, urea and uric acid were higher in birds supplemented with the highest level of amino acids. Dietary supplementation with amino acids can benefit the immune system, favoring the regeneration and proliferation of intestinal mucosa, contributing thus with maintenance of the growth performance of broilers undergoing enteric challenge.

Key words: amino acids, intestinal repair, immune system, PCNA, goblet cells

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

Arg – arginina

AST – Aspartato-transaminase

DNA – Ácido desoxiribonucléico

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

GALT – Tecido linfóide associado ao intestino

GGT – Gama glutamiltransferase ou GAMA-GT

GLM – General Linear Models

Glu – glutamina

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

Lys – Lisina

HE – Hematoxilina e Eosina

N – Nitrogênio

NK – Células Natural Killer

NO – Óxido Nítrico

NRC – National Research Council

PCNA – Proliferating cell nuclear antigen

PBS – Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

PAS – Ácido Periódico de Schiff

Tre – treonina

UFC – Unidades formadoras de colônias

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Página
Tabela 01: Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período de crescimento (11 a 29 dias) e abate (30 a 42 dias).....	50
Tabela 02: Desempenho produtivo de frangos de corte suplementados com aminoácidos submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	57
Tabela 03: Morfometria intestinal da mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	60
Tabela 04: Contagem de células pcna-positivas na base, meio e ápice dos vilos (células/mm ²), da mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	65
Tabela 05: Pesos absolutos e rendimento de carcaça e de cortes nobres de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	68
Tabela 06: Avaliação da quantidade de matéria seca, proteína bruta e NH ₃ na cama em que estavam as aves suplementadas com aminoácidos, desafiadas ou não.....	69
Capítulo 2	
Tabela 01: Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período de crescimento (11 a 29 dias) e abate (30 a 42 dias).....	83
Tabela 02: Valores de absorbância do teste ELISA para IgA na mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	87
Tabela 03: Contagem de células caliciformes na mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	88

Tabela 04:Medidas morfométricas do timo em frangos de corte recebendo dietas com adição de aminoácidos, desafiados ou não, em coletas aos 21 e 28 dias.....	90
Tabela 05: Medidas morfométricas do baço de frangos de corte recebendo dietas com adição de aminoácidos, desafiados ou não, em coletas aos 21 e 28 dias	91
Tabela 06: Medidas morfométricas da bolsa cloacal de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	93
Tabela 07: Contagem dos aglomerados linfóides do fígado de frangos de corte recebendo dietas com adição de aminoácidos, desafiados ou não, em coletas aos 21 dias e 28 dias.....	94
Tabela 08: Concentrações séricas de uréia e ácido úrico de frangos de corte suplementados com aminoácidos tróficos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	96
Tabela 09: Concentrações séricas de Albumina, AST (Aspartato transaminase) e GGT (Gama glutamil transferase ou GAMA-GT), de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.....	97

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	Página
Figura 01: Medidas morfométricas, comprimento e largura de vilo (CV e LV), profundidade e largura das criptas em jejuno de frangos de corte. Aumento de 10x.....	51
Figura 02: Fotomicrografia das vilosidades intestinais de jejuno de frangos de corte de 21 dias, apresentando fusão de vilos (aspecto polipóide) em aumento de 10x (A), e aumento de 40x (B).....	61
Figura 03: Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte com idade de 42 dias. É possível visualizar as células PCNA-positivas nas vilosidades (Vi) com aumento de 10x (A), e na região das criptas (Cr), com aumento de 40x (B). Na figura C está a fotomicrografia do controle negativo (Neg) em que se omitiu o anticorpo primário, que não apresentou imunorreatividade.....	62
Capítulo 2	
Figura 1: Jejuno de frangos de corte com 21 dias de idade. Observar corte transversal dos vilos do jejuno corados com PAS, para visualizar as células caliciformes (setas). Figura A: aumento de 10x, jejuno de uma ave que consumiu a dieta controle. Figura B e C: aumento de 40x, parte intermediária dos vilos do jejuno de frango de corte que consumiu o nível intermediário de aminoácidos, e superior respectivamente.....	89

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Situação da Atual Avicultura e os Desafios Intestinais.....	23
2.2 Integridade da mucosa intestinal e a relação com os nutrientes da dieta.....	24
2.3 Mecanismos de Avaliação do Desenvolvimento e Reparo Intestinal após desafio.....	27
2.4 O Sistema Imune das Aves e a Relação com os Aminoácidos.....	29
2.5 Aminoácidos com Função de Reparo da Mucosa Intestinal e Melhoria do Sistema Imune.....	31
2.6 Referências.....	37
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivos Específicos.....	43
4. CAPÍTULO 1 – EFEITO DA ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE A REGENERAÇÃO DA MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A UM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	44
4.1 Resumo.....	44
4.2 Palavras-Chave.....	44
4.2 Abstract.....	45
4.3 Keywords.....	45
4.4 Introdução.....	46
4.5 Material e Métodos.....	48
4.6 Resultados e Discussões.....	54
4.7 Conclusão.....	70
4.8 Referências.....	71
5. CAPÍTULO 2 – EFEITO DA ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE O SISTEMA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A UM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	76
5.1 Resumo.....	76

5.2	Palavras-Chave.....	77
5.3	Abstract.....	78
5.4	Keywords.....	78
5.5	Introdução.....	79
5.6	Material e Métodos.....	82
5.7	Resultados e Discussões.....	86
5.8	Conclusão.....	99
5.9	Referências.....	100
6.	CONCLUSÕES GERAIS.....	105

1. INTRODUÇÃO GERAL

A moderna avicultura hoje se caracteriza pela intensificação dos processos de criação, pelo aumento do volume de produção e pela demanda de maximização da eficiência técnico econômica. Dentre os diversos fatores que competem para a evolução da cadeia de produção avícola, além da genética, sanidade e ambiência, está a utilização do melhor conceito para a formulação de dietas que atendam as necessidades para melhor desempenho e menor custo de produção.

A produção e a formulação de dietas utilizando o conceito de proteína ideal associado à questão de custo mínimo proporcionam redução nos níveis de proteína bruta e levam a necessidade da inclusão de aminoácidos industriais, proporcionando dessa forma, maior flexibilidade na formulação das dietas (CORZO, et al., 2007). Além desse foco na utilização dos aminoácidos, o que vem recebendo atenção dos pesquisadores, é a utilização de determinados aminoácidos como aditivos funcionais, para a melhora da resposta imune e na reparação de mucosas em situações de desafio sanitário (LI et al., 2007; WU et al., 2009).

A integridade morfofuncional do sistema digestório é de fundamental importância para o bom desempenho dos índices zootécnicos da produção de frango de corte, pois dela depende os processos de digestão e absorção de nutrientes e a defesa local (MAIORKA, et al., 2000; SMITH, 1990). Ao mesmo tempo, a plasticidade desse sistema em responder de forma adaptativa a agentes externos presentes na dieta mostra ser possível uma manipulação de suas características morfofuncionais a favor de uma maximização das áreas de digestão e absorção e no seu sistema de defesa (BOLELI et al., 2008). O epitélio intestinal possui a capacidade de impedir que substâncias indesejáveis como microorganismos e toxinas presentes no lúmen intestinal atravessem a mucosa e atinjam tecidos e órgãos.

Entretanto, é um órgão metabolicamente dispendioso e extremamente afetado se a ingestão de nutrientes é diminuída. Cerca de 20% da energia da dieta é direcionada para a manutenção destas funções (McBRIDE & KELLY, 1990). Em situações de desafio infeccioso ou dietético, a demanda é muito maior, o que pode

comprometer o desempenho produtivo se estratégias de recuperação e regeneração da mucosa intestinal não forem adotadas.

A interação entre a nutrição e a saúde animal é particularmente importante para a produção avícola e os resultados obtidos. A nutrição pode modular quantitativamente e qualitativamente aspectos da resposta imune contra patógenos. Essas respostas influenciam a homeostase metabólica e as necessidades nutricionais dos frangos de corte, porém até então pouca atenção tem sido dada a significância prática desse mecanismo. Fatores relacionados à genética, frequência da exposição a patógenos e a eficácia do programa de vacinação são predominantemente conhecidos na incidência de doenças infecciosas em lotes de frangos de corte. Entretanto características da dieta podem modular a susceptibilidade das aves aos desafios infecciosos e sutis influências devidas ao nível ou aos tipos de ingredientes podem ter uma importância crítica (KLASING, 1998).

Um dos primeiros sinais decorrentes de um desafio é a redução no consumo de alimentos. O desencadear da resposta imune ocasiona diversas mudanças metabólicas, como o catabolismo muscular a fim de obter substratos necessários para o sistema imune, alterações no metabolismo hepático levando a redução da disponibilidade de determinados nutrientes para o crescimento e desenvolvimento. Esses fatos justificam a avaliação da resposta imune frente a fatores estressantes e/ou imuno-desafio induzida.

Desta forma, a nutrição tem papel importante na maximização da capacidade da ave em suportar um desafio infeccioso e manter a produtividade. O potencial de modular a atividade do sistema imune através da intervenção com nutrientes específicos é denominado imunonutrição (CALDER, 2008), que juntamente com o controle de fatores imunossupressores podem modular a resposta inflamatória e evitar a posterior imunossupressão. A nutrição direcionada à reparação da mucosa do trato gastrointestinal tem impacto significativo na saúde e proteção a organismos invasores, influenciando a microflora, fisiologia digestiva, estimulação imune e inflamação. A adição de determinados aminoácidos em dietas tem recebido muita atenção clínica, na tentativa de reduzir a atrofia da mucosa intestinal, principalmente em situações de danos à mucosa (WU, 1998).

Na determinação das exigências nutricionais, devem ser consideradas as exigências do sistema imunológico das aves, que podem ser maiores para alguns

nutrientes, sendo possível modular sua resposta e conseqüentemente obter melhor desempenho em condições comerciais. Compreender como ocorrem estes mecanismos e as formas de modular o sistema imune positivamente para manter a saúde e desempenho animal se torna fundamental para melhorar o retorno econômico da atividade avícola. O uso preventivo de aminoácidos tróficos nas dietas além das exigências nutricionais, pode ser efetivo e ser uma alternativa ao uso de promotores de crescimento que estão sendo paulatinamente retirados das dietas

Os resultados deste projeto ajudarão na compreensão dos mecanismos envolvidos e na elaboração de planos nutricionais que hoje são essenciais para a obtenção do máximo desempenho e de uma adequada resposta imune, os quais irão permitir superar os desafios dos sistemas de produção de aves.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SITUAÇÃO ATUAL DA AVICULTURA E OS DESAFIOS INTESTINAIS

Nos últimos 50 anos, a implantação dos modernos e intensivos sistemas de produção avícolas, foram sustentados pela utilização de aditivos que diminuíssem a interferência das doenças gastrointestinais no desempenho dos animais. O aumento da resistência às drogas, a proibição da utilização de algumas delas e a conscientização do consumidor em busca de produtos naturais isentos de quimioterápicos ou antibióticos, tem aumentado a busca por alternativas ao uso desses medicamentos. Dessa forma, a utilização de aminoácidos funcionais na tentativa de melhorar a imunidade e o reparo da mucosa intestinal vem sendo estudada com uma ferramenta para a melhoria da qualidade na produção de frangos de corte, podendo até ser utilizado associado aos aditivos alternativos, em substituição aos antimicrobianos.

A maior superfície de contato do organismo com o meio externo são as mucosas. A mucosa do tubo digestivo apresenta uma área cerca de 150 a 200 m², em um ser humano adulto (MOOG, 1981). Os tecidos intestinais representam cerca de apenas 5% do peso corporal, mas consomem entre 15 e 30% de todo aporte de O₂ e proteínas do organismo (GASKINS, 2001) e 20% da energia bruta consumida (MCBRIDE & KELLY, 1990), devido a alta taxa de renovação e intensa atividade metabólica das células. O epitélio intestinal possui a capacidade de impedir que substâncias indesejáveis como microorganismos e toxinas presentes no lúmen intestinal atravessem a mucosa e atinjam tecidos e órgãos.

A alta densidade populacional nos aviários, a reutilização da cama sem o devido tratamento e intervalos curtos entre lotes propiciam o aparecimento de doenças entéricas. A coccidiose é uma das principais enfermidades que acometem as aves nos sistemas de produção mais intensificados. Provoca lesões no intestino por ação do protozoário do gênero *Eimeria*, que diminui a área de absorção dos nutrientes e predispõe a infecções por microorganismos patogênicos. É responsável por grandes perdas econômicas uma vez que afeta o processo de digestão e

absorção dos nutrientes, interferindo de forma negativa no resultado zootécnico da criação (ITO et al., 2004).

Em função das alterações causadas na mucosa intestinal das aves devido à colonização por *Eimeria*, e outros desafios intestinais a campo como enterite necrótica causada por *Clostridium sp*, ou infecções por bactérias oportunistas como *E. coli*, tornam-se importantes os estudos para a identificação de fatores que estimulem a proliferação celular na mucosa intestinal e a ativação do sistema imune.

2.2. INTEGRIDADE DA MUCOSA INTESTINAL E A RELAÇÃO COM OS NUTRIENTES DA DIETA

A integridade da mucosa intestinal é mantida por dois fatores principais. O primeiro deles é a própria camada contínua de células que íntegras constituem uma forte barreira. O segundo é a camada de muco produzido pelas células caliciformes que recobre as células intestinais. A camada epitelial do intestino, é considerada o sitio da digestão e absorção dos nutrientes, e é composta por uma contínua e renovável população de células nas quais estão as “stemcells” localizadas na região das criptas, dando origem a população de enterócitos e células Globet (UNI, 2006).

Segundo MACARI (1999), o número de vilosidades e seu tamanho, bem como de microvilos, em cada segmento do intestino delgado, conferem às aves características próprias, sendo que na presença de nutrientes a capacidade de absorção do segmento será diretamente proporcional ao número de vilosidades ali presentes, ao tamanho dos vilos e à área de superfície disponível para a absorção. A altura de vilos e sua densidade estão relacionadas com a ação de fatores tróficos, que são agentes estimuladores do desenvolvimento da mucosa intestinal. Um agente trófico estimula o crescimento ou reparo da mucosa intestinal por promover a síntese de DNA o que estimulará o aumento da taxa de mitose celular (MAIORKA et al., 2008). A manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal é mantida pela formação contínua de novos enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas, assim como da sua maturação e extrusão (BOLELI et al., 2008).

Nas aves as células sofrem diferenciação enquanto migram em direção ao ápice do vilão, tornando-se células completamente funcionais em enterócitos, células caliciformes ou enteroendócrinas. As mudanças que ocorrem são funcionais e estruturais, tendo os enterócitos uma vida em torno de dois dias e trata-se do tecido de maior taxa de renovação celular. Esta diferenciação depende da necessidade do intestino para desempenhar suas funções naquele momento (BOLELI et al., 2008).

A proliferação de enterócitos das aves não ocorre somente nas criptas como ocorre nos mamíferos. Uni et al., (1998) observaram em galinhas poedeiras que as divisões mitóticas não se encontram somente nas criptas, ocorrendo também nas vilosidades. As criptas respondem por 55% das divisões mitóticas da proliferação celular do intestino, já na região média do vilão corresponde a 32% e o ápice corresponde a 8% da proliferação. Resultados semelhantes foram encontrados por Applegate et al., (1999) ao utilizarem o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) para marcar células em mitose em perus jovens.

O processo de desenvolvimento da mucosa intestinal decorre primariamente por dois eventos citológicos sendo eles a renovação celular (proliferação e diferenciação) e a perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos (UNI, 2000). O equilíbrio entre esses processos recebe o nome de *turnover* celular, ou seja, a taxa de renovação é constante, portanto, define a capacidade digestiva e de absorção intestinal (UNI et al., 1998). Um aspecto relevante que deve ser considerado é o tempo de “turnover” celular, que oscila entre 90 a 96 horas. Este período de tempo parece curto; contudo, considerando o tempo de criação do frango representa nada menos do que 9% do tempo de vida da ave.

Alguns nutrientes da dieta podem influenciar de forma positiva a capacidade de absorção da mucosa intestinal, pois modificam sua estrutura e metabolismo, resultando em melhora da capacidade de digestão e absorção dos nutrientes pelas aves (FREITAS et al., 2001). Essas substâncias são consideradas agentes tróficos, que segundo Maiorka et al., (2008), são capazes de estimular o processo mitótico e, como consequência, aumentar o número de células e o tamanho dos vilos. Vários nutrientes atuam como agentes tróficos sobre a mucosa, dentre eles estão glutamina, os ácidos graxos de cadeia curta, e as aminas biogênicas, entre outros (MAIORKA, et al., 2008).

A presença de nutrientes no lúmen é fator estimulante do crescimento dos vilos e criptas (BARANYIOVÁ e HOLMAN, 1976; MORAN, 1985), porém o estímulo

físico parece não influenciar no desenvolvimento da mucosa, pois Tarachai e Yamahuchi (2000) utilizando-se de caulin para avaliar o efeito do estímulo físico do alimento sobre o desenvolvimento da mucosa observaram que a mucosa intestinal parece não responder unicamente ao estímulo físico. Esses mesmos autores verificaram que na presença de nutrientes, o lúmen intestinal apresenta maior desenvolvimento, resultando em aumento da altura dos vilos, sugerindo que o desenvolvimento da mucosa ocorreu devido às características químicas dos nutrientes.

O termo “nutrição local” foi definido por Johnson (1979) como o efeito nutricional dos produtos da digestão sobre as células absorptivas ou da simples presença de nutrientes no lúmen intestinal. Isso implica que os nutrientes não precisam ser necessariamente absorvidos para exercerem o seu efeito trófico. A adição de aminoácidos considerados tróficos em dietas tem recebido muita atenção clínica na área de medicina humana, na tentativa de reduzir a atrofia da mucosa intestinal, principalmente em situações de danos (WU, 1998).

O reparo da mucosa intestinal ou reconstituição é definida como sendo um processo pelo qual a continuidade das células epiteliais é restabelecida rapidamente após uma injúria. Esse processo é afetado pela migração de células epiteliais viáveis de áreas adjacentes logo abaixo da área lesada (SVANES et al., 1982). O processo de reconstituição inicia-se rapidamente após a lesão (5 a 30 minutos), sendo dependente da secreção de muco sobre a área injuriada. Após a perda de grandes áreas na mucosa intestinal, é estimulado o aparecimento de mecanismos moleculares de adaptação para o reparo da mucosa intestinal. O epitélio remanescente torna-se hiperplásico com maior altura do vilo e profundidade da cripta (DOWLING, 1992; MAIORKA et al., 2008).

A atividade linfocitária da mucosa do intestino delgado tem chamado a atenção, cada vez mais, de um grande número de nutricionistas. Além de a mucosa gastrointestinal constituir-se numa porta de entrada aos antígenos alimentares e às bactérias não patogênicas da microflora, representa uma forte fonte de perturbação da atividade imunológica no organismo (TEIXEIRA, 1995). É também na mucosa que se localiza o maior número de macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B, secretores de imunoglobulinas (VAN DER HEIDJEN, 1987 e NAGLER-ANDERSON, 2001).

2.3. MECANISMOS DE AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E REPARO INTESTINAL APÓS DESAFIO

A avaliação qualitativa e quantitativa da perda do epitélio é muito importante, pois representa uma inferência confiável da capacidade digestiva e absorviva do intestino. Além da avaliação dos danos causados à mucosa intestinal por agentes patogênicos, dieta, e até mesmo por jejum, já que é de grande importância o desenvolvimento e do reparo do intestino, após um desafio para a eficiência na absorção dos nutrientes.

A avaliação do intestino através de cortes histológicos e mensuração de parâmetros morfométricos é, sem dúvida, a técnica mais utilizada nos trabalhos de pesquisa. O desenvolvimento da mucosa intestinal é avaliado através das medidas de altura de vilo, cripta, e relação vilo cripta. Segundo Macari (1999), na presença de nutrientes a capacidade de absorção do segmento será diretamente proporcional ao número de vilosidades ali presentes, ao tamanho dos vilos e à área de superfície disponível para a absorção.

Quando o intestino responde a algum agente com desequilíbrio da relação de extrusão e proliferação, ocorre modificação na altura dos vilos. O número e o tamanho dos vilos dependem do número de células que o compõem. Assim, quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilo, e por consequência, maior é a área de absorção de nutrientes. No geral, a maior altura de vilos e relação vilo/cripta estão associadas com uma boa diferenciação da mucosa intestinal (JEURISSEN et al., 2002). Criptas menos profundas indicam melhor estado de saúde intestinal (VIOLA & VIEIRA, 2007). Scheeman et al., (1982) sugeriram que vilos curtos (relativo a profundidade de cripta) tem menos células absorvivas e mais células secretórias.

A segunda barreira de proteção da integridade do epitélio intestinal é o muco. O muco é produzido por células caliciformes, glândulas unicelulares, que se encontram entre as células epiteliais. O duodeno tem o menor número de células caliciformes dos segmentos intestinais e o número aumenta ao se aproximar do jejuno.

Essas células produzem mucinógeno, cuja forma hidratada constitui a mucina, um componente do muco (GARTNER & HIATT, 2003). É composto por

glicosaminoglicanas que protegem o vilosidade, ou até mesmo participam do processo absorptivo através das proteínas ligadoras de cálcio (MACARI et al., 1994). O aumento da proliferação celular na cripta pode alterar o número de células caliciformes e mudar a composição da mucina e propriedades físico-químicas do muco. A determinação do número de células caliciformes é uma técnica estabelecida usando segmentos intestinais corados com ácido periódico Schiff (PAS).

Fasina et al., (2010) estudaram a influência da infecção por *Salmonella enterica* Sorovar Typhimurium sobre células caliciformes e a morfologia de vilosidades intestinais de frangos de corte. Estes autores determinaram a densidade e o tamanho das células caliciformes, além dos tradicionais parâmetros morfométricos. A densidade foi definida pelo número de células PAS ou Alcian blue (ALB) positivas por mm² de superfície quadrada do vilosidade.

Novos métodos têm sido desenvolvidos para quantificar as taxas de crescimento tecidual, que possibilite a partir do conhecimento, desenvolvimento e divisão celular estudar a cinética da proliferação celular. Segundo Rabenhorst, Burini e Schmitt (1993), a imuno-histoquímica, que utiliza anticorpos monoclonais contra antígenos específicos de células proliferativas, é uma das formas de fazer essa avaliação, permitindo medições acuradas da taxa de proliferação celular, sem a necessidade da administração de nenhuma substância ao animal em estudo.

O PCNA é um antígeno nuclear da proliferação celular (RABENHORST, BURINI e SCHMITT, 1993), que está baseado na expressão deste antígeno na fase G1 tardia e durante a fase S do ciclo celular. A escolha do anticorpo monoclonal anti-PCNA deve-se à facilidade de poder trabalhar com tecido fixado em parafina, ser resistente a fixação em formol, apresentar uma meia vida longa de aproximadamente vinte horas, indicando que o núcleo pode permanecer positivo mesmo após o estímulo (ARISAWA et al., 1999)

Segundo Uni et al., (1998), a técnica de imunocoloração feita pelo PCNA indica a presença de células em proliferação, não só na região das criptas, mas também ao longo das vilosidades da mucosa gastrintestinal de frangos de corte, e inclusive, alguma atividade na porção superior dos vilos. Estes autores observaram que no jejuno de frangos de corte da linhagem Arbor-Acres a porcentagem de células PCNA positivas em diferentes regiões dos vilos foi de 55% na cripta, 32% na porção média e 8% na região superior. Estes dados sugerem que nas aves, como

em alguns vertebrados inferiores, a proliferação intestinal de células epiteliais não está restrita às criptas e que o crescimento e reposição do epitélio pode ser devido em parte à atividade mitótica de células especializadas. (MARCHINI, 2005).

2.4. O SISTEMA IMUNE DAS AVES E A RELAÇÃO COM OS AMINOÁCIDOS

O perfil de nutrientes utilizado nas formulações de rações para frangos está baseado em pesquisas que avaliam as funções produtivas economicamente importantes como: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e rendimento de cortes; mas não à imunidade ou à resistência a doenças (KIDD, 2004). Em situação de campo, muitas vezes os frangos são submetidos a agentes estressores infecciosos e ou não infecciosos que ativam o sistema imune desses animais (NORUP et al., 2008).

O desafio sanitário, que induz a resposta imune normalmente ocasiona diminuição no consumo de alimento, e diversas mudanças metabólicas, como o catabolismo muscular a fim de obter substratos necessários para o sistema imune, alterações no metabolismo hepático levando a redução da disponibilidade de determinados nutrientes para o crescimento e desenvolvimento. Esses fatos justificam a avaliação da resposta imune frente a fatores estressantes e/ou imunodesafio induzida. Desta forma, a nutrição tem papel importante na maximização da capacidade da ave em suportar um desafio infeccioso e manter a produtividade. A imunonutrição e o controle de fatores imunossupressores podem reduzir a resposta inflamatória evitando a posterior imunossupressão compensatória.

A interrelação entre nutrição e sistema imune tem sido o foco crescente de atenção, assim como um número crescente de substratos são identificados como imunomoduladores. Imunonutrientes podem ser identificados entre os macro e micronutrientes, e entre esses estão os aminoácidos tais como glutamina, arginina, cisteína e taurina, bem como nucleótidos, são importantes substratos (SUCHNER et al., 2000).

A imunidade em aves é desenvolvida através do sistema linfóide, dependendo da característica funcional os órgãos linfóides são classificados em primários e secundários. Os primários são o timo e a bolsa cloacal. A principal função desses órgãos é promover a ideal condição para a maturação dos linfócitos.

A bolsa cloacal é constituída de linfócitos incrustados em tecido epitelial, cujas dobras se estendem no interior do lúmen, onde se espalham os folículos linfóides. Seus folículos contêm mais de 90% de células B (TIZARD, 1998). Os secundários são baço, a glândula pineal e os aglomerados linfóides. Dentro desses também estão incluídos os tecidos linfóides periféricos que são a glândula de Harder, o divertículo de Meckel, as tonsilas cecais e as placas de Peyer (MONTASSIER, 2009).

O sistema imune pode ser subdividido em três sítios de ação representando alvos potenciais para substratos nutricionais específicos: 1) barreira mucosa, 2) defesa celular, 3) sistema de inflamação local (SUCHNER et al., 2000).

A barreira de muco, da mucosa intestinal representa a primeira linha de defesa contra translocação de agentes patogênicos, e já é considerada importante em relação à nutrição enteral precoce de pacientes criticamente doentes (GARDINER et al., 1995). É também na mucosa que se localiza o maior número de macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B, secretores de imunoglobulinas (VAN DER HEIDJEN, 1987 e NAGLER-ANDERSON, 2001). A disponibilidade suficiente de substratos é atualmente considerada a principal ferramenta na manutenção da estrutura e funcionalidade da barreira mucosa (SUCHNER et al., 2000).

O sistema imune protege o hospedeiro de vários patógenos e consiste de sistemas inato (natural, não específico) e adquirido (adaptativo, específico) (CALDER, 1995). O sistema imune inato consiste nas barreiras físicas como pele e mucosas, o pH do proventrículo, a flora bacteriana benéfica, células fagocíticas como heterófilos e macrófagos que removem e destroem o material estranho (LARSSON & CARLANDER, 2002), células *natural killer* que identificam e matam células infectadas por vírus e células tumorais. O sistema inato responde contra um invasor estranho, e caso não seja eficiente a imunidade adquirida é desencadeada. Esse sistema adquirido é composto por imunidade adaptativa, através da proliferação de anticorpos IgA, IgM e IgY. Já a resposta imune celular envolve a interação de receptores de células T e o antígeno, levando a lise celular.

Sistema imune inato e adquirido, são regulados por uma grande rede de interações, com comunicações químicas, que incluem a síntese de maquinaria apresentadora de antígenos, imunoglobulinas e citocinas (CALDER, 2006). O sistema imune é prioritariamente dependente de uma oferta adequada de

aminoácidos para a síntese dessas proteínas e polipeptídeos, bem como outras moléculas de importância biológica (KIM et al., 2007). Essas substâncias incluem óxido nítrico (NO), superóxido, peróxido de hidrogênio, histamina e glutatona.

A ativação imunológica intestinal pode contribuir para mudanças nas exigências aminoacídicas, sendo que o perfil de aminoácidos utilizados na formulação de ração precisa ser revisto nessas situações. O aumento da atividade imunológica intestinal contribui para o aumento da proliferação de células de defesa, produção de anticorpos e aumento na secreção de mucinas, proteínas constituintes do muco entérico (TAHAKASHI, 2006).

2.5. AMINOÁCIDOS TRÓFICOS COM FUNÇÃO DE REPARO DA MUCOSA INTESTINAL E MELHORIA DO SISTEMA IMUNE

A nutrição direcionada à reparação da mucosa do trato gastrointestinal tem impacto significativo na saúde e proteção a organismos invasores, influenciando a microflora, a fisiologia digestiva, a estimulação imune e inflamação. A adição de determinados aminoácidos em dietas tem recebido muita atenção clínica, na tentativa de reduzir a atrofia da mucosa intestinal, principalmente em situações de danos à mucosa, e estimular a resposta do sistema imune às agressões.

Neste sentido, diversos pesquisadores relataram que glutamina (Gln), é o maior substrato de energia para as células do sistema imune (WU et al., 1991; NEWSHOLME et al., 1999). É utilizada por células isoladas do sistema imune, como linfócitos, macrófagos e neutrófilos, além de ser importante para a proliferação de linfócitos e produção de citocinas, atividades de fagocitose e secreção dos macrófagos e morte bacteriana pelos neutrófilos (NEWSHOLME, 2001). A glutamina também é requerida para a proliferação de células de tecidos de multiplicação rápida como enterócitos e fibroblastos (CURI, 1999).

A glutamina é considerada um aminoácido essencial em algumas espécies sob condições inflamatórias, de desafio sanitário ou cirurgias (NEWSHOLME, 2001). Tem um importante papel nas funções de homeostase e é um precursor essencial para a síntese de purinas, pirimidinas e nucleotídeos.

A adição de glutamina sintética nas dietas vem sendo estudada, devido à ação trófica que esse aminoácido exerce na mucosa intestinal (MAIORKA et al., 2000). Além da provável ação sobre a redução da atrofia da mucosa intestinal, o metabolismo da glutamina permite a formação de precursores como o glutamato, que participam da síntese de moléculas chave no processo inflamatório como a glutathione, que desempenha papel no sistema antioxidante do organismo e importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres (HUNTER et al., 1994; TAKAHASHI et al., 1997 e 2006; KIDD, 2004; RUBIN et al., 2007).

De acordo com Ribeiro et al., (2004), a utilização da glutamina em situações de estresse pós-operatório e tratamentos imunossupressores, pode contribuir para preservação da integridade da mucosa intestinal e a prevenção na translocação de bactérias e toxinas. Essa proteção contra bactérias, segundo Khan et al., (1999), ocorre porque a glutamina atua como precursor de N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina, que podem exercer papel importante na produção de mucina e, portanto na manutenção da barreira de proteção contra agentes bacterianos.

Diversas pesquisas têm sido executadas no intuito de determinar os efeitos da suplementação de glutamina nos parâmetros de desempenho, desenvolvimento intestinal e sua participação nos eventos dependentes da ativação do sistema imune (SARTORI, 2005; BARTELL & BATAL, 2007; MURAKAMI 2007; CARVALHO, 2009; CURTI et al., (2009). Maiorka et al., (2000) investigaram os efeitos da adição de 1,0% de L-glutamina na dieta de frangos de corte sobre os parâmetros de desempenho e vilosidades intestinais, e observaram efetividade na melhoria na altura das vilosidades no duodeno e íleo e profundidade da cripta na porção duodenal ao 7º dia de vida. Por outro lado, Sartori et al., (2005) não observaram efeito da glutamina sobre a morfologia da mucosa intestinal em poedeiras submetidas a estresse térmico.

Avaliando o desempenho, a morfologia intestinal e a resposta imune de pintos de corte recebendo dietas com 1 ou 4% de L-glutamina, Bartell & Batal (2007), verificaram que a adição de 1% de glutamina proporcionou aumento no ganho de peso aos 21 dias, enquanto a adição de 4% influenciou negativamente esse parâmetro. Por outro lado a suplementação de 4% de glutamina proporcionou melhora significativa no comprimento das vilosidades do duodeno e jejuno aos 7

dias de idade. A produção de anticorpos (IgA) aumentou quando a dieta foi suplementada com glutamina

A Treonina (Thr) é um aminoácido essencial para aves devido ao baixo conteúdo nos grãos, além das aves não sintetizarem Thr. Em dietas para aves à base de milho e farelo de soja, a Thr é o terceiro aminoácido limitante, precedido dos aminoácidos sulfurosos e da lisina (LÓPEZ et al., 2001).

A treonina participa da síntese protéica e seu catabolismo gera numerosos produtos importantes no metabolismo (por exemplo glicina, acetilCoA e piruvato) (KIDD & KERR, 1996). Os esqueletos de carbono resultantes do catabolismo da L-treonina geram piruvato para produção de glicose ou energia e glicina para necessidades metabólicas, tais como síntese de proteína, creatina, serina, ácido úrico, sais biliares e glutathiona.

Segundo Fernandez et al., (1994), existe uma alta exigência de treonina, em relação aos demais aminoácidos, para manutenção, devido a sua alta taxa de *turnover* e relativa abundância nas secreções intestinais endógenas. A treonina é o maior componente da mucina intestinal em animais (KIM et al., 2007). Segundo Myrie (2001), o intestino usa cerca de 60% da treonina dietética consumida primariamente para síntese de mucina intestinal. A mucina é resistente à digestão e é fermentada por microrganismos intestinais ou excreta nas fezes. Conseqüentemente, a treonina na mucina é perdida pelo animal. Stoll (2006) relatou que fatores que induzam a secreção de mucina podem aumentar as exigências de treonina e conseqüentemente diminuir sua disponibilidade para crescimento e produção. Essa menor disponibilidade de treonina pode ainda limitar a síntese de mucina e comprometer a integridade da barreira intestinal.

Pesquisas indicam que alterações nos componentes do sistema imune são sensíveis à ingestão de treonina dietética (LI et al., 1999). Wang et al., (2006), verificaram que o aumento da ingestão de treonina na dieta leva a aumento da produção e níveis de anticorpos IgG no soro e a concentrações de IgG e IgA na mucosa do jejuno, enquanto diminui as concentrações de IL-6 na mucosa do jejuno em suínos jovens desafiados com *Escherichia coli*.

Carvalho (2009) ao utilizar relação treonina:lisina digestíveis de 65% associado a adição de 0,75% de suplemento contendo glutamina na dieta observou efeito benéfico sobre a integridade das porções proximais do intestino quando as aves foram desafiadas com oocistos de diferentes espécies de *Eimeria* spp. O

aumento da utilização da Treonina pelo intestino pode desviá-lo das rotas de deposição de carne prejudicando o desempenho das aves, sendo então importante o fornecimento de níveis adequados deste aminoácido.

As exigências de arginina para frangos são consideravelmente variáveis, de acordo com a taxa de crescimento e a linhagem, e devido ao fato do ciclo da uréia não ser funcional em aves, estas são dependentes do fornecimento na dieta (SUNG, 1991). As aves não possuem a enzima carbamil fosfatase sintetase, que catalisa o primeiro passo do mecanismo de detoxificação da amônia que leva a síntese de uréia a Arg. As aves também dependem da arginina suplementar para a formação da ornitina, que em mamíferos é obtida através do ácido glutâmico. A síntese de ornitina é fundamental, pois está envolvida na obtenção de prolina e também na formação de poliaminas (espermidina, espermina e putrescina) que são moléculas associadas diretamente ao crescimento e diferenciação celular (BUTTERY & D'MELLO, 1994).

As concentrações teciduais de poliaminas, nas aves, são particularmente responsivas à manipulação dietética dos níveis de Arg. Estas aminas biogênicas são também consideradas de importância nutricional no crescimento e desenvolvimento do intestino do neonato (QUINN et al., 2002). Ruemmele et al., (1999) já haviam constatado que a falta de poliaminas inibe a proliferação, migração e apoptose das células intestinais. Neste sentido, a Arg como precursor das poliaminas pode ser considerada um agente trófico estimulando o desenvolvimento da mucosa intestinal e acelerando o processo mitótico na região cripta-vilo, o que pode aumentar o número de células e o tamanho do vilo (UNI et al., 1998).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da arginina (SUNG et al., 1991). É uma molécula importante produzida em abundância quando o sistema imune está ativado, sendo um potente agente oxidante com função bactericida e sinalizadora para macrófagos. Permeável nas células e membranas, participa de vários processos celulares, incluindo a neurotransmissão e a imunidade. O óxido nítrico que resulta da ação da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), é um potente agente microbicida para os patógenos intracelulares e extracelulares. Também estimula a vasodilatação local e favorece ainda a reparação tecidual (BREDT & SNYDER, 1994). Pesquisas em espécies aviárias suplementadas com arginina apontaram melhorias no sistema imune, como pelo aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos (SUNG et al., 1991). Essas melhorias muitas vezes têm sido

conseguidas com níveis bem superiores (2 a 3% de arginina na ração) ao recomendado pelo NRC (1994) que é de 1,25% (KIDD, 2004). Kidd et al., (2001) verificaram que níveis próximos ao recomendado (90 a 120% do NRC), apesar de elevar os níveis plasmáticos de arginina, não melhoraram a resposta imune humoral e celular das aves. Em outros trabalhos, estes autores obtiveram respostas positivas com a suplementação de arginina, na redução da mortalidade de frangos desafiados com *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* e *Eimeria maxima* (KIDD et al., 2001).

Segundo Wu et al., (2009), aminoácidos além de indutores de mecanismos de transcrição gênica pela ativação de enzimas importantes no processo mitótico intestinal, como a glutamina na indução da ornitina-descarboxilase, enzima responsável pela descarboxilação da ornitina na síntese das poliaminas, também podem regular a expressão gênica em qualquer etapa dos processos altamente específicos que envolvem a transferência de informação codificada em um gene no seu produto (RNA e ou proteína). Em mamíferos, trabalhos de pesquisa mostraram que a suplementação dietética com Arg e glutamina aumentou a expressão de genes anti-oxidantes e reduziu a expressão de genes pró inflamatórios no intestino delgado e tecido adiposo (FU et al., 2005; WANG et al., 2008; JOBGEN et al., 2009).

Dessa forma, tornam-se necessários estudos a fim de se estabelecer exigências nutricionais também para animais em situações de estresse imunológico. Quando ocorre um desequilíbrio entre os aminoácidos, além do comprometimento do desempenho dos frangos de corte, a carga excessiva de aminoácidos na circulação sanguínea precisa ser eliminada. Para serem metabolizados, exige um gasto extra de energia, a qual é desviada da produção para os processos de excreção do nitrogênio na forma de ácido úrico (ALETOR et al., 2000). Este nitrogênio em excesso, excretado pelas aves, também pode provocar danos ao meio ambiente (PARSONS & BAKER, 1994). Fato que se agrava devido à grande quantidade de dejetos gerados pela atividade de produção animal e que tem se tornado uma questão muito preocupante nos tempos atuais.

Apesar do vasto conhecimento em nutrição de aves, há poucas informações assegurando se os níveis de nutrientes para um ótimo desempenho zootécnico em animais saudáveis, são adequadas para uma ótima resposta imune durante um desafio infeccioso. Além disso, com a provável retirada dos antibióticos promotores de crescimento das rações, substitutos imuno-estimulantes terão que ser utilizados no intuito de minimizar as perdas de produtividade no setor avícola. Neste sentido

houve o interesse de avaliar a regeneração da mucosa intestinal e a resposta imune de frangos de corte submetidos à um modelo de infecção experimental utilizando-se a combinação de fatores predisponentes de infecção entérica e suplementados com aminoácidos tróficos: glutamina, arginina e treonina, verificando se ocorre melhora nos parâmetros com a utilização de tais tratamentos.

REFERÊNCIAS

- Aletor, V. A; Hamid I. I, Niess E. 2000. Low protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens: Effecton performance, carcass characteristics, whole body composition and efficiencies nutrient utilization. *J Sci Food Agric.* 80:547-554.
- Applegate, T. J., Dibner, J. J., Kitchell, M. L., Uni, Lilburn, M. S. 1999. Effect of turkey (*Meleagridis gallo pavo*) breeder hen age and egg size on poultry development. Intestinal villus growth, enterocyte migration and proliferation of the turkey poultry. *J Comparat Bioch Physiol B, Vancouver*, 124(4):381-389.
- Arisawa E. A. L., Moraes E., Rocha R. F., Almeida J. D. 1999. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67: Breve revisão. *Rev Fac Odontol.* 2:54-60.
- Bartell, S. M., Batal, A. B. 2007. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poult Sci*, 86:1940-1947.
- Baraniyová, E., Holman, J. 1976. Morphological changes in the intestinal wall in fed and fasted chickens in the first week after hatching. *Acta Veterinaria Brno*, 45:151-158.
- Bredt, D. S., Snyder S. H. 1994. Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. *Annual Rev of Bioch.* 63:175-195.
- Boleli, I. C., Maiorka, A, Macari M. 2008. Estrutura funcional do trato digestório. Pag. 75-98. In: Marcos Macari; Renato Luís Furlan; Elisabeth Gonzáles. (Org.) *Fisiologia Aviária Aplicada a frangos de corte – 2ª ed.* Jaboticabal: Funep.
- Buttery P. J., D’Mello, J. P. F. 1994. Amino acid metabolism in farm animals: an overview. Pag. 1-10. In: D’Mello, J.P.F. (Ed.). *Amino Acid in farm nutrition.* Wallingford: Cab International.
- Calder, P. C. 1995. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc Nutr Soc* 54:65–82.
- Calder, P. C. 2006. Branched-chain amino acid and immunity. *J Nutr* 136:288S–293S.
- Carvalho T. A. 2009. Avaliação de dietas com glutamina e glicina para pintos de corte contendo diferentes relações treonina:lisina. (Dissertação de mestrado). Univ. Federal de Viçosa –MG.
- Corzo, A, Kidd M.T., Dozier, W.A, Pharr G.T, Koutsos, E. A. 2007. Dietersy threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. *J Appl Poult Res.* 16:574-582.
- Curi, R., Newsholme P., Pithon-Curi, T. C. et al. 1999 Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages, and neutrophilis. *Bra J. Med Bio Res.* 32(1):15-21.

- Dowling, R. H. 1992. Cellular and molecular basis of intestinal and pancreatic adaptation. *Scand. J Gastr.* 27:64-67, (Supl. 193).
- Fasina, Y. O., Hoerr, F. J., Mckee, S. R. Conner, D. E. 2010. Influence of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection on Intestinal Goblet Cells and Villous Morphology in Broiler Chicks. *Avian Diseases.* 54:841–847.
- Fernandez, S. F., Oyagi, S., Han, Y., Parsons, C. M. & Baker, D. H. 1994. Limiting Order of amino acids in corn and soybean meal for growth of the chick. *Poult Sci.* 73:1887–1896.
- Freitas, B. C. F., Baião, N. C., Nunes, I. J. 2001. Fisiologia digestiva do frango de corte nos primeiros dias de vida: digestão da gordura. *Cad Téc Vet Zootec, Belo Horizonte: FEP MVZ.* 34:7-13.
- Fu, W. J., T. E. Haynes, R. Kohli, J. Hu, W. Shi, T. E. Spencer, R. J. Carroll, C. J. Meininger, and G. Wu. 2005. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* 135:714–721.
- Gartner, L. P., Hiatt, J. L. 2003. Introdução à histologia e técnicas básicas de Histologia. In: Gartner, L.P.; Hiatt, J.L. *Tratado de histologia em cores.* Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2ª edição.
- Gaskins, H. R. 2001. Intestinal bacteria and the influence on swine growth. *Swine Nutrition.* (Ed. A.J. Lewis and L.L. Southern) CRC Press, New York. 583-606.
- Hunter, E. A. L., Grimble, R. F. 1994. Cysteine and methionine supplementation modulate the effect of tumor necrosis factor α on protein synthesis, glutathione and zinc concentration of liver and lung in rats fed a low protein diet. *J Nutr,* 124:2319-2328.
- Ito, N. M. K, 2004. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. Pág. 207-215 In: Mijayi, C. I., Lima, E. A., Okabayaski, S. *Produção de frangos de corte.* Campinas: FACTA, Fundação Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas.
- Jeurissen, S. H. M., Lewis, F., Klis, J. D. V., Mroz, Z., Rebel, J. M. J, Huurne, A. A. H. M. 2002. Parameters and Techniques to Determine Intestinal Health of Poultry as Constituted by Immunity, Integrity and Functionality. *Curr Iss Intest Microbiol.* 3:1-14.
- Jobgen W., Meininger C. J., Jobgen S. C., LI P., Lee M. J., Smith S. B., Spencer T. E., Fried S. K., Wu G. 2009. Dietary L-arginine supplementation reduces white-fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr* 139:230–7.
- Johnson L. R. 1979. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *World J Surg.* 3:477-486.
- Klasing, K. C. 1998. Nutricional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult Sci, Champaign.* 77:1119-1125.

- Larsson, A., Carlander D. 2002. Resistance and various kinds of immunity in birds. Pág. 48-49. In: Thankam, M. (Ed.) *Modern Concepts of Immunology in Veterinary Medicine: Poultry Immunology*. West Orange, USA: Thajema Publishing,
- Li, D. F., Xiao, C. T., Qiao, S. Y., Zhang, J. H., Johnson, E. W. & Thacker P. A. 1999. Effects of dietary threonine on performance, plasma parameters and immune function of growing pigs. *Anim Feed Sci Tech* 78:179–188.
- Li P., Yin Y. L., Li D. F., Kim S. W., Wu G. 2007. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 98:237-252.
- López, R. M., Méndez, T. J., González, E. A. et al. 2001. Necesidades de treonina en pollos sometidos a dos calendarios de vacunación. *Veterinária México*. 32(3):189-194.
- Kidd, M.T. et al. 2001. Growth and immunity of broiler chicks as affect by dietary arginine. *Poult Sci*. 80:1535-1542.
- Kidd, M. T. 2004. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poult Sci*. 83:650-657.
- Kim, S. W., Mateo, R. D., Yin, Y. L. & Wu, G. 2007. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian-Aust J Anim Sci* 20:295–306.
- Khan, J., Liboshi, L., Cui, L., Wassa, M., Sando, K., Takagi, Y., Okada, A. 1999. Alanil-glutamine supplemented parenteral nutrition increase luminal mucus gel and decreases permeability in ther at small intestine. *J Parent Ent Nutr*. 23:24-31.
- Macari, M.; Furlan, R.L.; Nakaghi, L. O. 1994. In: *Fisiologia da digestão e absorção das aves*. Pág. 1-17. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e tecnologia Avícolas.
- Macari, M. 1999. A fisiologia do sistema digestivo das aves (I). *Aves e ovos*. 15: (8/9):12-20.
- Maiorka, A., Silva, A. V. F., Santin, E. 2000. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 52(5):487-490.
- Maiorka, A.; Boleli, I. C.; Macari, M. 2008. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. Pág. 113-120. In: Macari, M.; Furlan, R.L.; Gonzales, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP.
- Mc Bride, B. W., and Kelly J. M.. 1990. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: A review. *J. Anim. Sci*. 68:2997–3010.
- Myrie, S. B., Bertolo, R. F. P., Mohn, S., Pencharz, P. B., Sauer, W., Ball, R. O. 2001. Threonine requirement and availability are affected by feeds that stimulate gut mucin. *Adv Pork Product*. 12: abstract 23.

Montassier, H. J. 2009. Fisiopatologia do Sistema Imune. In: A. Berchieri Jr, E.N. Silva, J. Di Fabio, L. Sesti, M.A.F. Zuanaze (Editores), Doencas das Aves. 2a ed. Campinas – SP, FACTA. 1:391-429.

Moog, F. 1981. "The lining of the small intestine." *Sci Am* 245(5): 154-158, 160, 162.

Murakami, A. E., Sakamoto, M. I. Natali, M. R. M., Souza, L. M. G. Franco, J. R. G. 2007. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. *Poult Sci* 86:488-495.

Nagler-Anderson C., Shi H. N. 2001. Peripheral non responsiveness to orally administered soluble protein antigens. *Crit Rev Immunol* 21(1-3):121-131.

Newsholme, P., 2001. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J.Nutr.* 131:2515S-2522S

Norup, L., Jensen, K. H., Jorgensen, E., Sorensen, P., Juul-Medse, H. R. 2008. Effect of mild heat stress and mild infection pressure on immune responses to an *E. coli* infection in chickens. *J Anim Sci*, 2:265- 274.

Parsons, C. M., Baker, D. H. 1994. The concept and use of ideal proteins in the feeding of non-ruminants. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE NÃO-RUMINANTES, 1994, Maringá. Anais... Maringá: SBZ, p.119-128.

Ribeiro, S. R., Júnior, P. E. P., Miranda, A. C., Bromberg, S. H., Lopasso, F. P. Iriya, K. 2004. Weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal resection. Influence of a glutamine enriched diet. *Rev Hosp das Clínicas da Fac Med de São Paulo.* 59:349-356.

Rabenhorst, S. H.; Burini, R. C.; Sdhmitt, F. C. L. 1993. Marcadores da proliferação celular. *Revista Brasileira de Patologia Clínica, Rio de Janeiro.* 29(1): 24-29.

Rubin, L. L., Ribeiro, A. L. M, Canal, C. W., Silva, I. C., Trevizan L, Vogt L. K., Pereira, R. A., Lacerda L. 2007. Influence of sulfur amino acid levels in diets of broiler chickens submitted to immune stress. *Braz J. Poult Sci.* 9(1):305-311.

Ruemmele, F. M., C.; Ruemmele, E.; Levy; E. Seidman. 1999. Les mécanismes moléculaires de la régulation du renouvellement de cellules épithéliales intestinales par des nutriments. *Gast. Clin. Biol.* 23:47–55.

Scheeman, B. O., Richter, D. B., Jacobs, L. R. 1982. Response to dietary wheat bran in the exocrine pancreas and intestine of rats. *J Nutr.* 112:283-286.

Sartori, J. R., Zavarize, K. C., Garcia, E. A., Pezzato, A. C. Madeira, L. A., Silva, M. D. P. 2005. Morfometria do trato intestinal de poedeiras submetidas a diferentes temperaturas, com e sem suplementação de glutamina na dieta. *Rev Bras Ciên Avícola, Campinas: FACTA.* 7:60.

SAS INSTITUTE. Software and services: system for Windows, version 8.0 software Cary, 2002.

- Smith, M. W., Mitchell, M., Peacock, M. A. 1990. Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 97:57-63.
- Stoll, B. 2006. Intestinal uptake and metabolism of threonine: nutritional impact. *Adv in pork Prod.* 17:257-263.
- Suchner, U., K. S. Kuhn, et al. 2000. The scientific basis of immunonutrition. *Proc Nutr Soc*, 59(4):553-63.
- Suchner U., Heyland D. K. & Peter K. 2002. Immune-modulatory actions of arginine in the critically ill. *Br J Nutr* 87:S121–S132.
- Sung Y.J. et. Al. 1991. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *J Leukoc Biol.* 50:49-56.
- Svanes, K., Ito, S., Takeuchi, K., Silen, W. 1982. Retitution of the surface epithelium of the in vitro frog gastric mucosa after damage with hyperosmolar sodium chloride: Morphological and physiological characteristics. *Gastroent*, 82:1409-1420.
- Tahakashi, K., Ohta, N., Akiba, Y. 1997. Influences of dietary methionine and cysteine on metabolic responses to immunological stress by *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection, and mitogenic response in broiler chickens. *J Nutr.* 78:815-821.
- Tahakashi, K. 2006. Nutritional control of inflammatory responses in broiler chicken. *J Integr Field Sci.* 3:1-7.
- Tarachai, P. E.; Yamauchi, K. 2000. Effects of luminal nutrient absorption, intraluminal physical stimulation and intravenous parenteral alimentation on the recovery responses of duodenal villus morphology following feed withdrawal in chickens. *Poult Sci. Champaign.* 79(11):1578-1585.
- Teixeira, E. W. 1995. Utilização de alimentos fibrosos pelos suínos. *Zootecnia, Nova Odessa.* 33(1):19-27.
- Tizard I.R. 1998. *Imunologia Veterinária.* 5ª ed. Roca, São Paulo, p.273-293.
- Uni, Z., Platin, R., Sklan, D. 1998. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J Comp Phys.* 168(4):241-247.
- Uni, Z. 2000. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the CHICKENS in small intestine. *Br Poult Sci. London,* 41(2):410-415.
- Uni Z. 2006. Early development of small intestinal function. In: *Poultry Science Symposium Series. Avian Gut Function in Health and Disease.* Washington DC, USA. 28:29-42.
- Viola, E. S., Vieira, S. L. 2007. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. *Rev Bras Zootec.* 36(4):1097-1104(supl.).

Wang X., Qiao S. Y, Liu M & Ma Y. X. 2006. Effects of graded levels of true ileal digestible threonine on performance, serum parameters and immune function of 10-25kg pigs. *Anim Feed Sci Tech*, 129:264-2787.

Wang J, Chen L, Li P, Li X, Zhou H, Wang F, Li D, Yin Y, Wu G. 2008 Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr.*;138:1025–32.

Wu G., Field, C. J. & Marliss, E. B. 1991. Glutamine and glucose metabolism in rat splenocytes and mesenteric lymph node lymphocytes. *Am J Physiol* 260, E141–E147.

Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr.* 128:1249-1252

Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 37:1–17.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da suplementação dos aminoácidos tróficos arginina, treonina e glutamina, nas dietas crescimento e abate, frente a um desafio experimental, sobre as características de reparação da mucosa intestinal e sistema imune.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da suplementação dos aminoácidos arginina, treonina e glutamina sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal, proliferação celular através da contagem das células PCNA-positivas, rendimento de carcaça, metabolização do excesso de nitrogênio e a influência sobre a qualidade da cama.

Avaliar o efeito da suplementação dos aminoácidos arginina, treonina e glutamina sobre o sistema imune frente ao desafio experimental, com relação ao nível de IgA de mucosa, contagem de células caliciformes, medidas morfométricas de órgãos linfóides como timo, baço e bolsa cloacal, e contagem de aglomerados linfóides do fígado.

CAPITULO 1 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE A REGENERAÇÃO DA MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A UM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

RESUMO - A nutrição tem impacto significativo no desenvolvimento, manutenção da integridade e na capacidade regenerativa do trato digestório. Aminoácidos podem exercer uma função trófica acelerando a proliferação celular da mucosa intestinal pós-infecção. O objetivo do projeto foi avaliar a regeneração da mucosa intestinal de frangos de corte submetidos à um modelo de infecção experimental, e suplementados com aminoácidos: glutamina, arginina e treonina. Foram utilizados 600 pintos de corte da linhagem Cobb, machos, de 1 dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (com e sem desafio experimental e 3 dietas). Uma dieta comercial foi utilizada como controle e outras duas dietas foram elaboradas com glutamina associada ao ácido glutâmico (1,5 e 3% de Aminogut[®]), arginina (1 e 2% de L-Arginina) e treonina (1 e 2% de L-treonina). O desafio foi através da inoculação de vacina contra coccidiose e culturas de E. coli. A análise estatística dos dados foi realizada pelo procedimento GLM do software SAS. As aves que consumiram as dietas suplementadas com aminoácidos apresentaram uma melhor ($p < 0,05$) conversão alimentar no período de 1 a 42 dias. A capacidade de proliferação celular e a relação vilosidade:cripta frente ao desafio entérico foi maior ($p < 0,05$) para as aves que receberam as dietas suplementadas. O rendimento de carcaça e cortes nobres não foi influenciado pela suplementação de aminoácidos, porém os níveis elevados de aminoácidos nas rações experimentais se refletiram nos maiores níveis proteicos na cama do aviário, sem, no entanto, interferir na produção de amônia. A suplementação de dietas com aminoácidos tróficos pode contribuir positivamente com a regeneração e proliferação da mucosa intestinal de frangos de corte e com a manutenção do desempenho zootécnico quando submetidos à situações de desafio entérico.

Palavras-Chave: Coccidiose, Reparo Intestinal, PCNA, E. coli, Mucosa

CHAPTER 1 – EFFECT OF ADDITION OF AMINO ACIDS ON INTESTINAL MUCOSA REPAIR IN BROILER SUBJECTED TO AN EXPERIMENTAL INFECTION MODEL

ABSTRACT – Nutrition is an important factor for development, maintenance of the integrity and regenerative capacity of the digestive tract. Amino acids may accelerate cell proliferation in the intestinal mucosa after infection. This study evaluated the repair of the intestinal mucosa of broilers experimentally infected and supplemented with amino acids: glutamine, arginine and threonine. 600 one-day-old male Cobb broilers were distributed in a completely randomized design with a 2x3 factorial arrangement (with and without challenge and 3 diets). A commercial diet was the control and two diets were prepared with glutamine associated with glutamic acid (1.5 and 3% Aminogut[®]), arginine (1 and 2% L-Arginine) and threonine (1 and 2% L-threonine). The challenge consisted of vaccination against coccidiosis and inoculation of *E. coli* cultures. Statistical analyses were run using the GLM procedure of SAS. Birds that consumed diets supplemented with amino acids showed a better ($p<0.05$) feed conversion in the period between 1 and 42 days. Cell proliferation ability and villus: crypt ratio in challenged chicks was higher ($p<0.05$) for supplemented birds. Carcass and prime cuts yield was not affected ($p>0.05$) by amino acid supplementation, but high content of amino acids in experimental diets was reflected in higher levels of amino acids in the poultry litter, without interfering with the production of ammonia. The supplementation of diets with trophic amino acids can positively contribute to the repair and proliferation of the intestinal mucosa of broilers and to the maintenance of the growth performance of broilers undergoing enteric challenge.

Key words: Coccidiosis, Intestinal Repair, PCNA, *E. coli*, Mucosa

Introdução

Tecnologias para a produção avícola visando redução dos custos de produção exigem a adoção de estratégias como o aumento da densidade de criação (kg/m^2), menor intervalo entre lotes e camas reutilizadas sem os devidos processos de fermentação, o que podem se refletir negativamente sobre a saúde intestinal dos frangos de corte.

O epitélio da superfície da mucosa intestinal representa uma barreira crucial entre um amplo espectro de substâncias nocivas e imunogênicas presentes no lúmen do intestino e a ave. Danos e prejuízos a esta barreira superficial resultam em inflamação, resposta imune descontrolada e desequilíbrio da homeostase orgânica.

Assim, uma rápida regeneração e reconstituição da integridade da superfície epitelial frente às lesões ou danos fisiológicos, sendo essencial para a preservação da homeostase normal. Considerando a complexidade multifuncional da mucosa intestinal, um completo *turnover* pode levar de 24 a 96 horas, o que significa quase 10% do tempo de vida de um frango de corte.

Com a proibição do uso dos antibióticos promotores do crescimento, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de avaliar alternativas para proteger a mucosa intestinal e ainda atender a demanda e a sensibilidade dos consumidores que buscam produtos naturais isentos de quimioterápicos ou antibióticos. Pesquisas com fitoterápicos e óleos essenciais (PULICI, 2012; SANTURIO, et al., 2007; TOLEDO et al., 2007), probióticos e prebióticos (ALBINO, 2006) e ácidos orgânicos (VIOLA e VIEIRA, 2007) vêm mostrando resultados promissores.

Aminoácidos, além de constituintes de proteínas, regulam vias metabólicas essenciais para manutenção, crescimento e imunidade, também regulam a expressão gênica, a síntese de hormônios e de moléculas de grande importância biológica como a glutatona, óxido nítrico, poliaminas, nucleotídeos purina e pirimidina (LI et al., 2007). Recentemente outro papel importante tem sido atribuído a alguns aminoácidos denominados funcionais ou a seus metabólitos: a modulação da regeneração da mucosa intestinal (WU, 1998; DIGNASS, 2001). A glutamina participa diretamente nos processos de proliferação epitelial estimulando a migração celular (SCHEPPACH et al., 1996), as poliaminas, derivadas do metabolismo da

arginina, atuam diretamente na reconstrução e proliferação do epitélio intestinal (WANG et al, 1991) e a treonina por meio da síntese de mucina. Treonina é o maior componente da mucina intestinal, envolvida na manutenção da função imune intestinal (DIGNASS, 2001).

O melhor desenvolvimento da mucosa intestinal na primeira semana de vida das aves foi demonstrada em frangos de corte por Maiorka et al., (2002), Murakami et al., (2007) e Sakamoto (2009). As células da mucosa do trato digestivo, assim como outras células de proliferação rápida, têm alta exigência de Glu, principalmente pela função de prover N para a síntese de purina e pirimidina (LOBLEY et al., 2001).

Outros trabalhos demonstraram que a suplementação dietética com Arg e Glu aumenta a expressão de genes anti-oxidantes e reduz a expressão de genes pró inflamatórios no intestino delgado e tecido adiposo (FU et al., 2005; WANG et al., 2008). A Arg é considerada um aminoácido essencial para aves, pelo fato de que o ciclo bioquímico da uréia não ser funcional em aves (AUSTIC & NESHEIM, 1971). Entre as espécies animais estudadas, as aves têm a mais alta exigência de Arg (BALL et al., 2007), que se deve, ainda, a alta taxa de deposição protéica pelo rápido crescimento das atuais linhagens de corte e o antagonismo com a Lys. Além disso, o uso exclusivo de dietas a base de milho e farelo de soja representa fator particularmente sensível na disponibilidade de Arg para frangos de corte. Arg é o quinto aminoácido limitante nestas dietas, após metionina + cistina, Lys, treonina e triptofano (ATENCIO et al., 2004).

Murakami et al., (2012) demonstraram que o aumento da suplementação de Arg na dieta de frangos de corte aumentou a relação vilosidade:cripta do duodeno. Na cripta intestinal células progenitoras proliferam e migram da cripta ao longo do eixo cripta-vilosidade, e adquirem a funcionalidade específica. As populações de células epiteliais da mucosa intestinal são moduladas por um grande número de fatores e peptídeos que estão presentes no interior do lúmen ou no próprio epitélio. Ornitina é sintetizada a partir da Arg e é precursora das poliaminas que têm efeito direto sobre a divisão celular, síntese protéica e crescimento tecidual (GONZALEZ-ESQUERRA & LEESON, 2006). Pesquisas recentes apontam o envolvimento da Arg na indução de mecanismos de transcrição gênica de enzimas e até mesmo de expressão gênica (JOBGEN et al., 2009; WU et al., 2009).

Segundo Zaghari et al., (2011) a Thr tem um alto impacto na funcionalidade intestinal, principalmente sobre a manutenção da função imune do intestino, através

da composição da mucina, na inibição da apoptose e proliferação de linfócitos (PRIMOT et al., 2008). Corzo et al., (2007) comprovaram que em situações de desafio intestinal, a exigência desse aminoácido pode ser maior.

Por outro lado, o aumento dos níveis dietéticos de aminoácidos pode comprometer o desempenho dos frangos de corte devido ao desequilíbrio entre eles e a carga excessiva de aminoácidos na circulação sanguínea. Para serem metabolizados, exigem um gasto extra de energia, a qual é desviada da produção para os processos de excreção do nitrogênio na forma de ácido úrico (ALETOR et al., 2000). Este nitrogênio em excesso, excretado pelas aves, liberado na forma de amônia também pode provocar danos à saúde das aves e dos colaboradores, assim como representar grave impacto ao meio ambiente (PARSONS & BAKER, 1994). Fato que se agrava pelo aumento da atividade de produção animal e que tem se tornado uma questão muito preocupante nos tempos atuais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da utilização dos aminoácidos glutamina, arginina e treonina sobre a reparação intestinal de frangos de corte submetidos a um desafio entérico experimental.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Aviário Experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Todos os procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação.

Foram utilizados 600 pintos de corte da linhagem Cobb, machos, de 1 dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (com e sem desafio experimental e 3 dietas) totalizando 6 tratamentos, 5 repetições com 20 aves cada.

Até os 10 dias de idade as aves foram alimentadas com ração comercial, e a partir dos 11 dias, as dietas experimentais passaram a ser fornecidas. As dietas fornecidas foram assim constituídas:

1. Sem desafio experimental + dieta controle
2. Sem desafio experimental + nível 1 aminoácidos (1,5% de Aminogut[®] + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina)
3. Sem desafio experimental + nível 2 aminoácidos (3% de Aminogut[®] + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina)
4. Com desafio experimental + dieta controle
5. Com desafio experimental + nível 1 aminoácidos (1,5% de Aminogut[®] + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina)
6. Com desafio experimental + nível 2 aminoácidos (3% de Aminogut[®] + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina)

Aos 14 dias de idade, o grupo de aves desafiadas recebeu vacina comercial Bio-Coccivet R[®] (Biovet), para coccidiose com as espécies *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. praecox*, *E. tenella* e *E. mitis*. Previamente à aplicação foi realizada a esporulação dos oocistos pela injeção de O₂ diretamente em tubos Falcon com a vacina, os quais foram rapidamente lacrados e mantidos em estufa BOD a 28°C durante 48 horas. A vacina foi inoculada diretamente no ingluvio de cada ave na dose de 20 vezes a recomendada pelo fabricante da vacina (± 80.000 oocistos esporulados). Dois dias após, um inóculo contendo *Escherichia coli*, cepa isolada de fezes de frangos de corte adultos, confirmada por série bioquímica e PCR, cedida pela Universidade Estadual de Londrina – Laboratório de Medicina Aviária, com uma concentração calculada de 10⁸ UFC/dia/ave foi preparado e fornecido na água de bebida das aves por dois dias consecutivos.

As aves foram mantidas em temperatura de conforto térmico, de acordo com sua fase de vida, em aviário climatizado, controlado por placa evaporativa e alojadas em boxes com maravalha. Ração e água foram fornecidas a vontade durante todo o período de criação. As dietas, à base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais adotadas pelas integrações avícolas da região (Tabela 1). O programa de alimentação foi dividido em três fases: inicial (1 a 10 dias de idade), crescimento (11 a 29 dias) e a abate (30 aos 42 dias de idade).

Tabela 01. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período de crescimento (11 a 29 dias) e abate (30 a 42 dias).

Ingredientes (%)	Ração crescimento	Ração abate
Milho 7,5%	41,55	45,78
Farelo de soja 46%	39,30	35,10
Oleo Soja	8,10	8,20
Sal comum	0,31	0,38
Calcáreo calcítico 38,5%	1,08	1,03
Fosfato Bicálcico 20%	1,72	1,70
Bicarbonato de Sódio	0,10	0,00
DL-Metionina 98%	0,35	0,33
L- Lisina 50,7%	0,23	0,23
L-Treonina 98%	0,08	0,07
Colina 60%	0,08	0,08
Premix mineral e vitamínico ^{1,2}	0,10	0,10
Caulim*	0 – 7	0 – 7
Valores calculados		
Proteína, %	21,63	19,98
EM, Kcal/Kg	3,000	3,050
Cálcio, %	0,929	0,900
Fósforo, %	0,440	0,410
Lisina Dig., %	1,200	1,100
Metionina Dig., %	0,625	0,590
Met + Cis Dig., %	0,912	0,859
Treonina Dig., %	0,791	0,726
Triptofano Dig., %	0,237	0,216
Arginina Dig., %	1,356	1,240

* Substituído pela inclusão dos aminoácidos tróficos na dieta Nível 1 de AA (1,5kg de Aminogut[®], 1kg de L-Arginina e 1 kg de L-Treonina) e na dieta Nível 2 de AA (3kg de Aminogut[®], 2kg de L-Arginina e 2 kg de L-Treonina).

¹Mistura Vitamínica Inicial (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg, Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

²Mistura mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

Semanalmente, as aves e as sobras de ração foram devidamente pesadas para o cálculo do ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar por parcela experimental, semanalmente até os 42 dias de idade das aves.

Aos 21, 28 e 42 dias, duas aves por unidade experimental foram sacrificadas por deslocamento cervical. Durante a coleta aos 21 dias, foram retiradas as excretas do jejuno de 10 aves de cada tratamento para a realização da contagem de oocistos

de *Eimeria* spp por grama de excreta (OPG). Realizou-se a contagem pelo método de Gordon & Whitlock (1939) modificado.

Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento do jejunó (a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel), os quais foram presos abertos longitudinalmente em placas de isopor, e lavados com soro fisiológico. As amostras foram fixadas em solução de formol tamponado e após foram emblocadas em parafina. Cada fragmento foi submetido à cortes semi-seriados de 5 µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina.

Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (Olympus BX 50), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Neste estudo foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilos e a profundidade e largura de 20 criptas de cada lâmina (Figura 1). Utilizou-se estas medidas morfométricas também para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, através da seguinte fórmula, segundo Kisielinski et al., (2002):

$$\text{Área de absorção: } \frac{(LV \times AV) + (LV/2 + LC/2)^2 - (LV/2)^2}{(LV/2 + LC/2)^2}$$

Onde:

LV: largura de viló, AV: altura de viló, LC: largura de cripta

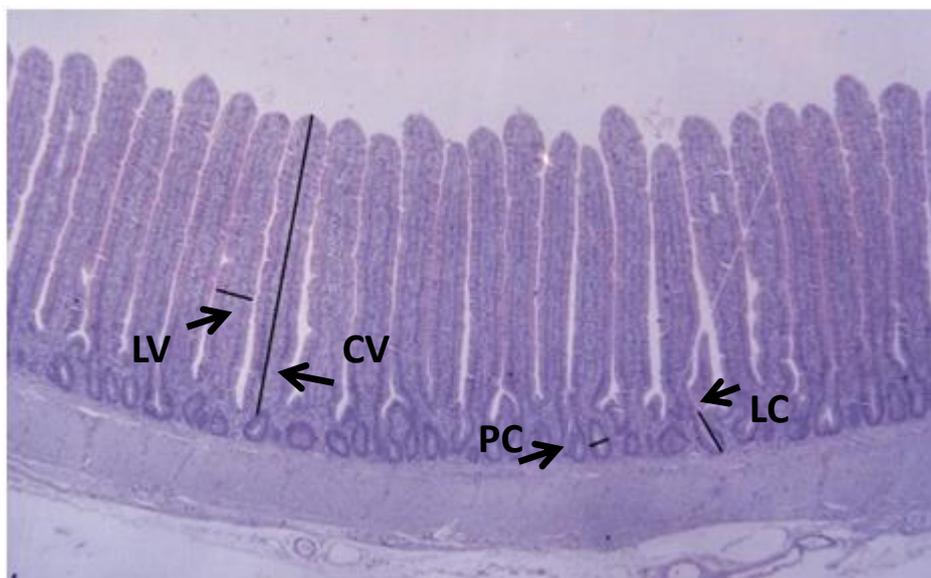


Figura 01: Medidas morfométricas, comprimento e largura de viló (CV e LV), profundidade e largura das criptas em jejunó de frangos de corte. Aumento de 10x.

Das amostras emblocadas em parafina foram obtidos novamente cortes de 5µm de espessura usando um micrótomo semi-automático e os cortes acondicionados em lâminas silanizadas. A atividade proliferativa das células intestinais das criptas e dos vilos do jejuno das poedeiras foram analisados por imunohistoquímica para PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

A parafina foi removida dos cortes por passagens em banhos de xilol e os cortes foram reidratados em séries decrescentes de etanol (99 a 70°), seguido de água destilada. Os reagentes utilizados na imunohistoquímica são do kit EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (ab94710) (Abcam®, CAbridge, MA, USA).

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pelo Hydrogen peroxide block do *kit*, por 10 minutos. Os cortes foram encaminhados ao microondas com 70% de sua potência, em tampão citrato pH 6,0 e 0,1M, por 15 minutos, ficando em repouso até atingir a temperatura ambiente. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com pré-incubação pelo *Protein Block* do mesmo *kit*, por 10 minutos, em câmara úmida.

O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo policlonal feito em coelhos anti-PCNA (FL-261) contra os aminoácidos 1-261 do PCNA humano da Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, Ca, USA). As lâminas foram incubados *overnight*, em câmara úmida a 4°C de temperatura com o anticorpo primário anti-PCNA com diluição de 1:200. Os tecidos foram submetidos a 3 banhos de 5 minutos cada em PBS. A amplificação da reação do anticorpo primário foi efetuada usando anticorpo secundário *anti-rabbit* do *kit*, por 10 min em temperatura ambiente, seguido de lavagens em PBS e incubação com o *Goat anti-rabbit HRP Conjugate* do kit por 15 minutos.

Após lavagens em PBS, a reação foi visualizada através do DAB plus substrate + DAB cromógeno do kit, por 2-3 min. Os cortes foram lavados em água corrente e contra-corados com Hematoxilina e montados com Permount após desidratação em álcool crescente e xilol (5 minutos cada). A reação positiva foi visualizada pela cor marrom nos núcleos celulares. Como controle negativo o anticorpo primário foi omitido dos cortes e substituído por PBS.

Duas lâminas por unidade experimental foram confeccionadas. De cada lâmina foram capturadas cinco imagens da região da base, do meio e do ápice do vilo em aumento de 40x. Cada imagem foi medida e foram quantificadas as células

PCNA positivas nestas regiões por milímetro quadrado. Também foi feita a contagem de células PCNA positivas por vilão, sendo considerado o comprimento do vilão como uma covariável.

Para determinação do rendimento de carcaça, aos 42 dias foram sacrificadas duas aves por unidade experimental (10 aves/tratamento), com peso vivo \pm 20g da média de peso do box. As aves foram identificadas e submetidas ao jejum alimentar por seis horas e abatidas por atordoamento com eletricidade e posterior sangria. Para o cálculo de rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça eviscerada quente, sem os pés, cabeça e gordura abdominal, em relação ao peso vivo que foi obtido individualmente antes do abate das aves. Para o rendimento dos cortes nobres, foi considerado o rendimento do peito inteiro com pele e ossos e das pernas (coxa e sobrecoxa com ossos e pele) que foi calculado em relação ao peso da carcaça eviscerada.

A gordura abdominal presente ao redor da cloaca, da bolsa cloacal, moela, pro-ventrículo e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada conforme descrito por Smith (1993). Em seguida, foi pesada e também calculada em relação ao peso da carcaça eviscerada.

Após a saída das aves foi coletado amostras de cama para análise dos níveis de proteína bruta e matéria seca (Silva et al., 2001), e nitrogênio amoniacal. Para a análise do nitrogênio amoniacal foi realizada a extração do conteúdo aquoso após moer e coar a amostra, colocando 2 mL em um tubo, sendo adicionado 5mL de KOH (2N) e 10 mL de água destilada. Essa solução foi submetida ao destilador juntamente com 10 mL de ácido bórico, elevando a temperatura a 500 °F (260°C). Após o ácido atingir até 40 mL. Esperar a solução diminuir a temperatura até 0 °F e depois titular o conteúdo do béquer com HCl 0,005 normal.

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (“outliers”) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Após constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002) com nível de 5% de significância e em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Os dados médios de número de células positivas para PCNA no vilão do jejuno foram avaliados considerando distribuição de Poisson com função

de ligação log implementados no PROC GENMOD do SAS. O comprimento do vilo foi usado como co-variável.

Resultados e Discussões

A participação de aminoácidos funcionais com propriedades tróficas nos processos de regeneração da mucosa intestinal de frangos de corte submetidos a um modelo de infecção experimental foi investigada. Na 1ª coleta pós-infecção foi possível observar a presença de lesões características de coccidiose, tais como placas esbranquiçadas na mucosa do duodeno até o início do jejuno, lesões típicas de *E. acervulina*. Alguns animais apresentavam diarreia aquosa, nos intestinos havia conteúdo mucoso alaranjado, espessamento da parede intestinal, entre outros sinais característicos de coccidiose, como os encontrados em estudos anteriores (ALLEN e FETTERER, 2002), o que demonstra ter havido a agressão à mucosa intestinal. As contagens médias de oocistos por tratamento variaram entre 23.000 e 40.000 OOPG (oocistos por grama) nas fezes das aves desafiadas. As aves que não foram desafiadas apresentaram contagem de 0 a 300 OOPG.

Os dados de desempenho produtivo nas duas primeiras semanas pós-infecção (14 a 21 dias e 21 a 28 dias) e no período total de criação das aves (1 a 42 dias) estão demonstrados na Tabela 02. Não houve interação $p > 0,05$ entre as dietas e o desafio, com exceção da conversão alimentar de 21 a 28 dias. O desempenho produtivo no período anterior, de 1 a 14 dias, não foi influenciado pelos tratamentos e por isso não estão apresentados na tabela.

No período de 14 a 21 dias, foi possível observar o pior desempenho das aves desafiadas em relação às não desafiadas ($p < 0,05$). Houve menor ganho de peso e consumo de ração em resposta ao processo de reparação da barreira epitelial frente ao dano causado pela multiplicação intracelular do protozoário. Em condições de campo pode haver um impacto ainda maior sobre o desempenho das aves, devido à existência de outros fatores estressantes. As infecções naturais por *Eimeria sp*, atuam como fatores condicionantes de enterite necrótica pela destruição

maciça da mucosa. Os tecidos intestinais danificados e as mudanças nas funções do trato intestinal causadas por ela podem desestruturar as barreiras naturais de defesa e permitir a colonização por vários agentes patogênicos, tais como *Clostridium perfringens* ou *Salmonella sp.*

A adição de aminoácidos não afetou ($p>0,05$) o ganho de peso das aves. Davis & Austic (1982) também não observaram diferença no ganho de peso dos pintos de corte dos 7 aos 21 dias que receberam dietas contendo 0,2%, 0,4%, 0,8% e 1,2% de treonina total. Também Nery (2009), não observou efeito no ganho de peso utilizando relações de 60, 65 e 70% de treonina:lisina digestíveis, entre 1 e 21 dias de idade.

Na 2ª semana pós-infecção (28 dias), o ganho de peso ainda se manteve menor ($p<0,05$) para as aves desafiadas em relação às aves controle, apesar do consumo de ração já ter se igualado. Em relação às dietas, observou-se efeito ($p<0,05$) tanto para o consumo de ração quanto ao ganho de peso. A dieta suplementada com o maior nível de aminoácidos levou ao menor consumo de ração quando comparado com as demais dietas. Já para o ganho de peso, a dieta com o nível intermediário levou ao maior ($p<0,05$) ganho de peso em comparação a dieta controle.

No desdobramento da interação entre as dietas e o desafio experimental, observou-se tanto para as aves desafiadas, quanto para as não desafiadas, melhor conversão alimentar ($p<0,05$) com a suplementação de aminoácidos em relação a dieta controle. Comparando-se as dietas em relação ao desafio experimental, observou-se pior conversão alimentar apenas no grupo que sofreu desafio e não recebeu suplementação de aminoácidos na dieta.

A recuperação da integridade intestinal pode ter contribuído no reestabelecimento do consumo das aves, o que interferiu positivamente na conversão alimentar das aves suplementadas pelos aminoácidos funcionais. Por outro lado, Gonzales (2002) ao discorrer sobre a teoria aminostática, afirmou que o controle do consumo de alimento pode estar em função da quantidade e do balanceamento dos aminoácidos na proteína da ração. Segundo a autora, os níveis plasmáticos dos aminoácidos podem interferir na ativação do sistema nervoso central, uma vez que eles podem atuar como precursores na formação de neurotransmissores envolvidos no controle do consumo alimentar.

Para o período total de 1 a 42 dias, observou-se menor ($p < 0,05$) consumo de ração pelas aves suplementadas com os aminoácidos, independente do desafio experimental. Já para o ganho de peso, não houve diferença ($p > 0,05$) entre as aves da dieta controle e daquelas que receberam o nível intermediário de aminoácidos. A maior inclusão de aminoácidos afetou negativamente ($p < 0,05$) o ganho de peso das aves. O que pode ter sido atribuído ao desequilíbrio entre aminoácidos ou aos processos de desaminação e eliminação dos resíduos nitrogenados do excesso de aminoácidos. Este custo é relativamente alto, considerando que, para incorporar um aminoácido na cadeia protéica, estima-se em torno de quatro moles de ATP e para excretar cada N do aminoácido são gastos seis moles de ATP (LECLERQ, 1996).

Este menor consumo de ração, influenciou diretamente a conversão alimentar das aves, sendo que o índice foi melhor quando as aves foram suplementadas com aminoácidos em comparação com o controle. Esse resultado se manteve para a conversão alimentar corrigida para 2,5 kg, quando se exclui a interferência do peso vivo sobre a conversão alimentar (dados não demonstrados na tabela).

Resultados similares são encontrados na literatura. Mendes et al., (1997), Brake et al., (1998) e Murakami et al., (2012), que observaram melhor conversão alimentar à medida que a Arg foi adicionada as dietas dos frangos de corte e com Sakamoto et al., (2011) com adição de glutamina associado ao ácido glutâmico. Carvalho (2009) observou efeito linear com o aumento das relações treonina:lisina digestíveis, assim como Paez (2004), em que a conversão alimentar foi melhorada a medida que a relação treonina:lisina digestíveis aumentou de 60 para 70%. Por outro lado, Martinez-Lopes (2007) que ao desafiar frangos de corte com *Eimeria sp.* e suplementar as aves com glutamina, não encontrou diferença significativa no desempenho nesse período.

Houve uma economia de 77g de ração para cada kg de ganho de peso das aves suplementadas com aminoácidos tróficos, em relação às aves que receberam dieta controle. Resultado este, com grande importância já que a conversão alimentar é o índice que tem maior importância para medir a eficiência produtiva das aves, e sabe-se que pequenas alterações na taxa de conversão, qualquer que seja o preço da ração, exercerão um impacto substancial nas margens financeiras de qualquer empresa do setor avícola.

Tabela 02 - Desempenho produtivo de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.

	Consumo de ração, g			Ganho de peso, g			Conversão alimentar		
	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiados	Não Desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média
					14 a 21 dias				
Controle	664,83	671,79	668,31 ^A	483,19	480,45	481,82	1,377	1,399	1,388 ^A
Nível AA 1	610,90	657,81	634,36 ^B	464,15	488,80	476,47	1,317	1,347	1,332 ^{AB}
Nível AA 2	593,53	625,52	609,53 ^C	456,18	474,24	465,21	1,303	1,319	1,311 ^B
Média	623,09 ^b	651,71 ^a		467,84 ^b	481,16 ^a		1,332	1,355	
CV, %		3,21			3,25			3,96	
Interação		Ns			Ns			ns	
					21 a 28 dias				
Controle	825,84	853,82	838,27 ^A	607,21	667,35	637,28 ^B	1,361 ^{aA}	1,291 ^{bA}	1,326 ^A
Nível AA 1	825,87	828,62	827,25 ^A	671,81	696,20	684,00 ^A	1,230 ^{aB}	1,191 ^{aB}	1,210 ^B
Nível AA 2	781,94	793,13	787,53 ^B	653,93	665,60	660,42 ^{AB}	1,150 ^{aC}	1,178 ^{aB}	1,164 ^C
Média	813,31	825,45		643,63 ^b	676,38 ^a		1,247	1,220	
CV, %		2,84			4,17			3,22	
Interação		ns			Ns			p<0,05	
					28 a 35 dias				
Controle	1212,59	1182,06	1197,33 ^A	525,93	507,94	516,94 ^A	2,313	2,337	2,325
Nível AA 1	1117,41	1153,63	1135,52 ^B	483,81	506,69	495,25 ^{AB}	2,320	2,279	2,299
Nível AA 2	1068,04	1019,30	1043,67 ^C	459,12	442,22	450,67 ^B	2,334	2,436	2,380
Média	1132,68	1118,33		489,62	485,62		2,322	2,345	
CV, %		4,14			4,72			5,27	
Interação		ns			Ns			ns	
					1 a 42 dias				
Controle	5011,24	5004,50	5007,87 ^A	2856,99	2855,13	2856,06 ^A	1,754	1,752	1,753 ^A
Nível AA 1	4750,42	4881,46	4815,94 ^B	2788,34	2891,97	2840,15 ^A	1,704	1,688	1,696 ^B
Nível AA 2	4536,25	4495,47	4515,86 ^C	2735,56	2676,01	2705,79 ^B	1,659	1,680	1,669 ^B
Média	4765,97	4793,81		2793,63	2807,70		1,706	1,707	
CV, %		2,49			2,69			1,56	
Interação		ns			Ns			ns	

Nível AA 1: Nível intermediário de suplementação de aminoácidos - 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina; Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

As análises da morfometria intestinal estão demonstradas na Tabela 03. Aos 21 dias, para o comprimento do vilo e a superfície de absorção, não houve efeito ($p>0,05$) da dieta ou do desafio. Em relação à profundidade da cripta e relação vilo:cripta, houve interação significativa ($p<0,05$). As aves desafiadas e suplementadas com aminoácidos tróficos apresentaram criptas mais profundas em relação às aves da dieta controle, o que conseqüentemente levou a menor relação vilo:cripta. Em resposta a uma agressão ocorre um processo denominado de restituição, que é mediado por células epiteliais que revestem a margem da zona epitelial danificada. Estas células têm como função migrar e revestir a área danificada, de modo a restaurar rapidamente a integridade da camada epitelial. Em seguida, a cripta alonga-se para permitir o aumento da proliferação da população de células progenitoras. Essa resposta de "cripta intestinal", segundo Okamoto (2011) permite que o tecido epitelial restaure o número de células epiteliais para re-constituir sua estrutura.

Diferentemente de uma situação sem desafio experimental, Murakami et al., (2012), ao suplementar Arg em diferentes níveis na dieta inicial, observaram aumento da relação vilo:cripta no duodeno e redução da profundidade da cripta em resposta ao incremento de Arg na dieta. Em outros estudos, também sem desafio infeccioso, foi observado que a suplementação de dietas para frangos de corte com 1% de glutamina resultou em maior peso intestinal, maior altura de vilo e profundidade de cripta em comparação com frangos que não receberam a suplementação de glutamina (BARTELL E BATAL, 2007; FISCHER DA SILVA et al., 2007; MURAKAMI et al., 2007; YI et al., 2005; SOLTAN, 2009).

Segundo Maiorka et al., (2003), em casos de desafio entérico, há uma maior renovação celular da mucosa intestinal, o que leva a maior profundidade de cripta, em virtude da hiperplasia, resultante da atividade mitótica. Porém, quando ocorre um aumento na taxa de mitose com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, há um aumento no número de células e, conseqüentemente, um aumento na altura dos vilos (MAIORKA et al., 2002).

Na segunda semana pós-desafio, houve efeito significativo ($p<0,05$) das dietas independente do desafio experimental. A suplementação com o maior nível de aminoácidos levou ao menor comprimento do vilo em relação às demais dietas. Este resultado foi similar ao observado para a profundidade da cripta. Comparando-se

com o resultado de ganho de peso (Tabela 1) pode ser observado menor ganho de peso pelas aves suplementadas com estas dietas.

Na avaliação realizada aos 42 dias foi verificada interação significativa ($p < 0,05$) entre dieta e desafio para a relação vilo:cripta. Observou-se, que para as aves que haviam sido desafiadas, a dieta com o nível intermediário resultou numa maior relação vilo:cripta que a dieta controle. Para as aves não desafiadas não houve efeito significativo das dietas. Esses dados confirmam o encontrado por Bartel e Batal (2007), que ao suplementarem com 1% e 4% de glutamina, encontraram maiores alturas de vilos nas que receberam a maior inclusão de aminoácidos.

Os dados encontrados estão em concordância com Lopes (2008), que ao desafiar frangos de corte com *Eimeria sp* observou melhor recuperação dos animais quando foram suplementados com glutamina nas primeiras semanas de vida e Martinez-Lopes et al., (2007; 2008) que verificaram que frangos de corte desafiados com *Eimeira* e suplementados com glutamina apresentaram melhor integridade da mucosa intestinal, embora não tenham sido encontradas diferenças para desempenho e digestibilidade dos nutrientes da ração.

Tabela 03 - Morfometria intestinal da mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.

	Vilo, μm			Cripta, μm			Vilo:cripta			Superfície de absorção, μm^2		
	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiadas	Não Desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média
	21 dias											
Controle	915,94	867,99	888,97	146,33 ^{aB}	157,60 ^{aA}	152,67	6,26 ^{aA}	5,64 ^{aA}	5,91	13,71	12,26	12,90
Nível AA 1	842,69	926,69	882,48	185,79 ^{aA}	140,56 ^{bA}	164,37	4,64 ^{bB}	6,67 ^{aA}	5,60	11,52	13,26	12,35
Nível AA 2	929,90	904,39	917,82	170,46 ^{aAB}	146,71 ^{aA}	159,21	5,54 ^{aAB}	6,21 ^{aA}	5,86	12,74	13,20	12,98
Média	893,98	899,69		169,88	148,29		5,39	6,17		12,54	12,92	
CV, %		13,38			16,50			16,33			27,44	
Interação		ns			p<0,05			p<0,05			ns	
	28 dias											
Controle	1159,03	1051,41	1105,22 ^{AB}	166,56	170,28	168,32 ^{AB}	7,03	6,41	6,74	14,77	13,40	13,96
Nível AA 1	1180,93	1150,80	1166,66 ^A	181,17	172,69	177,16 ^A	6,57	6,68	6,63	16,54	15,84	16,23
Nível AA 2	1043,93	15,75	1050,48 ^B	169,50	15,75	158,78 ^B	6,26	7,15	6,71	15,34	15,75	15,53
Média	1125,25	1083,29		172,32	162,60		6,61	6,78		15,62	14,94	
CV, %		13,02			13,07			14,90			19,34	
Interação		ns			ns			ns			ns	
	42 dias											
Controle	1100,86	1277,26	1189,06	177,16	180,17	178,67	6,22 ^{aB}	7,07 ^{aA}	6,65	19,00	21,27	20,14
Nível AA 1	1191,25	1149,95	1168,31	154,91	178,33	167,92	7,75 ^{aA}	6,53 ^{bA}	7,07	21,00	18,60	19,66
Nível AA 2	1157,11	1264,15	1210,63	166,88	186,41	176,65	6,96 ^{aAB}	6,98 ^{aA}	6,97	21,32	21,14	21,23
Média	1148,15	1227,58		166,76	181,52		6,95	6,85		20,42	20,28	
CV, %		20,84			18,77			17,71			27,45	
Interação		ns			ns			p<0,05			ns	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina; Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Na análise histopatológica foi possível verificar uma incidência de lâminas com fusão nos vilos, conforme ilustrado na Figura 02. Teirlynck et al., (2009) explicam que essa alteração nos vilos pode ser desencadeada pela colonização por patógenos que induz ao dano epitelial e inflamação. Gholamiandehkordi, et al., (2007) citam que as bactérias podem induzir ao dano epitelial e fusão de vilos através da produção de toxinas e indução da inflamação. Nesse experimento foi utilizado como desafio além da vacina de oocistos de coccidias, a inoculação de *E. coli*, o que pode ter levado a essa maior incidência de fusão de vilos.

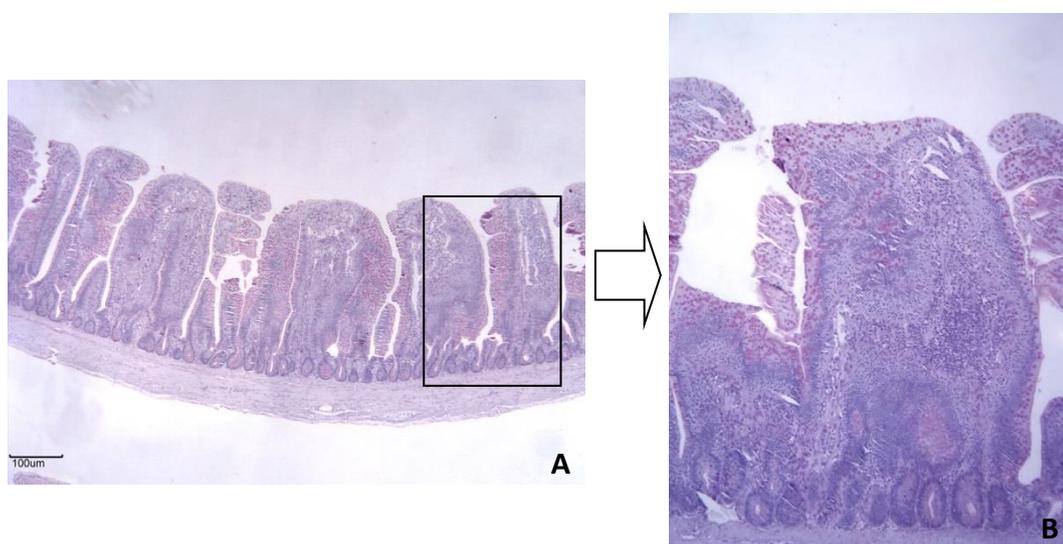


Figura 02: Fotomicrografia das vilosidades intestinais de jejuno de frangos de corte de 21 dias, apresentando fusão de vilos (aspecto polipóide) em aumento de 10x (A), e aumento de 40x (B).

A contagem de células PCNA-positivas na mucosa do jejuno de frangos de cortes está apresentada na Tabela 04. A contagem foi realizada em 3 regiões distintas: base, meio e ápice do vilos, também sendo realizada ao longo do vilos. As células PCNA-positivas ficam marcadas com coloração castanha, já nos controles negativos, onde se omitiu o anticorpo primário na etapa correspondente, os núcleos não apresentaram reação, demonstrando a especificidade do anticorpo utilizado (Figura 03).

As células PCNA-positivas são células que expressam antígenos da fase G1 tardia e durante a fase S do ciclo celular. Esta técnica utiliza anticorpos

monoclonais contra antígenos específicos de células proliferativas, e é uma das formas de fazer a avaliação da proliferação celular, permitindo medições acuradas sem a necessidade da administração de nenhuma substância ao animal em estudo (RABENHORST, BURINI e SCHMITT, 1993).

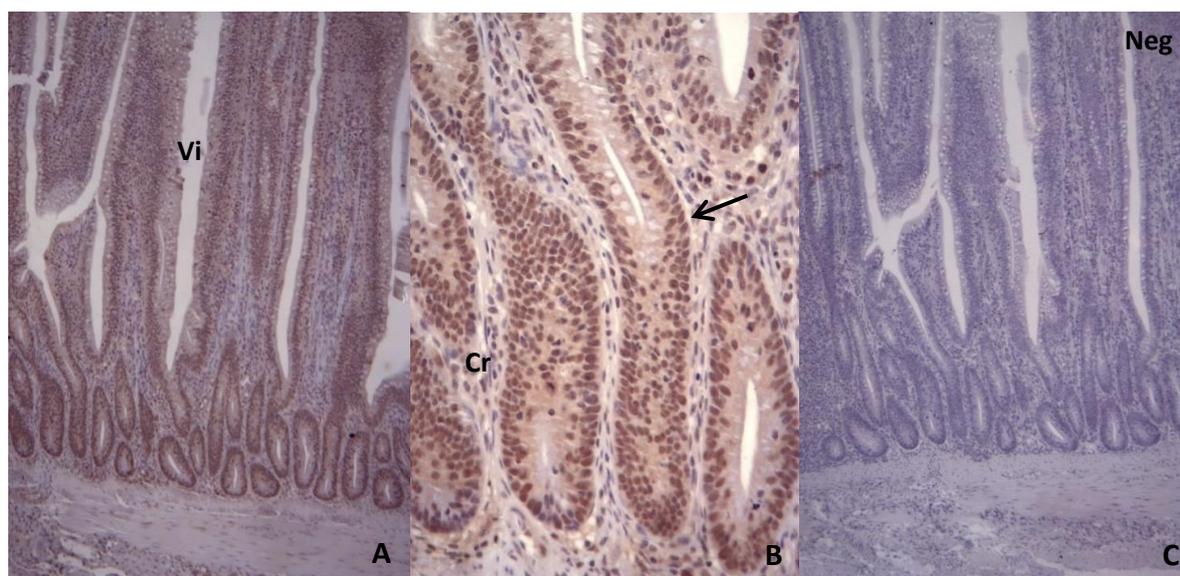


Figura 03: Fotomicrografia do jejunum de frangos de corte com idade de 42 dias. É possível visualizar as células PCNA-positivas nas vilosidades (Vi) com aumento de 10x (A), e na região das criptas (Cr), com aumento de 40x (B). Na figura C está a fotomicrografia do controle negativo (Neg) em que se omitiu o anticorpo primário, que não apresentou imunomarcagem.

Uma semana após o desafio experimental observou-se interação significativa ($p < 0,05$) entre as dietas e o desafio experimental para todas as contagens de células PCNA-positivas. No desdobramento da interação, observou-se que a contagem na base e meio do vilo, foi maior para o grupo de aves desafiadas em relação as não desafiadas, entretanto não foi afetada pelas dietas. Por outro lado, o número de células PCNA-positivas no grupo de aves não desafiadas foi menor quando alimentadas com a dieta controle. As aves suplementadas com aminoácidos apresentaram um número elevado de células marcadas, mostrando que houve um maior número de células em proliferação. Para a contagem ao longo do vilo, observaram-se resultados semelhantes ao relatado para a contagem de células na base e no meio do vilo.

A rápida proliferação de células epiteliais é fundamental na reposição do epitélio intestinal, enquanto que a profundidade da cripta é um indicativo da

capacidade compensatória ou hiperplasia das células epiteliais em virtude de um maior nível de agressão à estrutura morfológica da mucosa intestinal causada pelo desafio entérico (UNI et al., 1998). A maior taxa de multiplicação celular, através da maior contagem de células PCNA positivas nas aves que receberam os aminoácidos na dieta e foram desafiadas, sete dias após o desafio, demonstra a maior capacidade de reparo da mucosa lesada a partir do desafio das *Eimerias* e bactérias inoculadas.

Aos 28 dias as aves desafiadas apresentaram ainda menor ($p < 0,05$) contagem de células PCNA-positivas no meio do vilo, demonstrando que ainda não houve recuperação total da capacidade funcional da mucosa. Para o número de células marcadas ao longo do vilo houve interação ($p < 0,05$). Para as aves desafiadas observou-se maior número de células marcadas com o uso da dieta controle e para as desafiadas o resultado foi oposto. Este mesmo resultado foi observado aos 42 dias

Aos 42 dias de idade das aves, na contagem das células por área específica do vilo, houve interação ($p < 0,05$) entre o desafio e as dietas. As aves não desafiadas que receberam o maior nível da suplementação apresentaram maior contagem de células PCNA-positivas por vilo. Entretanto, para aves desafiadas e suplementadas, a contagem de células foi menor, em comparação às aves controle. É possível considerar que a suplementação fez com que o reparo fosse mais intenso logo após o desafio nas aves suplementadas com aminoácidos, observado pela maior profundidade das criptas (Tabela 03). Desta forma, na fase final, menor proliferação de células foi necessária para atender a demanda e a homeostase da mucosa intestinal. É preciso também considerar, que o excesso de aminoácidos pode interferir negativamente no *turnover* celular, visto a competição por receptores na absorção e o antagonismo entre aminoácidos (BUTTERY & D'MELLO, 1994).

Segundo Dignass (2001), a população de células epiteliais da mucosa intestinal é modulada por um número diverso de fatores que estão presentes dentro do lúmen intestinal, no próprio epitélio e ainda na lâmina própria. O efeito positivo da suplementação aminoacídica pode ser atribuído à simples presença de nutrientes no lúmen intestinal. Isso implica que os nutrientes não precisam ser necessariamente absorvidos para exercerem o seu efeito trófico.

Segundo Wu et al., (2009), aminoácidos podem induzir mecanismos de transcrição gênica pela ativação de enzimas importantes no processo mitótico intestinal, como a Glu na indução da ornitina-descarboxilase, enzima responsável pela descarboxilação da ornitina na síntese das poliaminas. Estas aminas biogênicas são também consideradas de importância nutricional no crescimento e desenvolvimento do intestino do neonato (QUINN et al., 2002). Ruemmele et al. (1999) já haviam constatado que a falta de poliaminas inibe a proliferação, migração e apoptose das células intestinais.

A Glu é essencial para células de proliferação rápida, tais como células intestinais e linfócitos ativos, é o principal metabólito que nutre os enterócitos (PADOVESE, 2000) e, em altas concentrações, é precursor para a formação dos ácidos nucleicos, permitindo resposta imediata para a proliferação das células sem entrar em outras rotas do metabolismo (SZONDY E NEWSHOLME, 1989).

Tabela 04 - Contagem de células PCNA-positivas na base e meio dos vilos, e ao longo do vilo da mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental

	Base			Meio			vilo		
	células/mm ²			Células/vilo					
	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média
	21 dias								
Controle	4,48 ^{aA}	2,71 ^{bB}	3,59	3,36 ^{aA}	1,64 ^{bB}	2,50	169,44 ^{bB}	277,11 ^{aB}	231,38
Nível AA 1	4,63 ^{aA}	4,94 ^{aA}	4,82	3,61 ^{aA}	3,30 ^{aA}	3,41	254,3 ^{bA}	329,28 ^{aA}	288,44
Nível AA 2	4,17 ^{aA}	4,86 ^{aA}	4,30	2,75 ^{aA}	3,55 ^{aA}	2,93	265,92 ^{aA}	240,33 ^{bC}	253,47
Média	4,43	4,20		3,24	2,80		282,34	239,14	
CV, %		39,25			53,33			2,46	
Interação		p<0,05			p<0,05			p<0,05	
	28 dias								
Controle	5,24	6,43	5,71	2,13	3,51	2,85	439,31 ^{aA}	321,34 ^{bB}	380,03
Nível AA 1	4,71	5,54	5,12	1,22	3,13	2,17	322,79 ^{aC}	179,11 ^{bC}	248,10
Nível AA 2	5,52	5,48	5,50	2,41	2,93	2,65	362,13 ^{bB}	433,11 ^{aA}	398,22
Média	5,17	5,76		2,00 ^b	3,17 ^a		319,88	370,88	
CV, %		35,23			60,30			1,91	
Interação		ns			ns			p<0,05	
	42 dias								
Controle	7,43 ^{aA}	8,37 ^{aA}	7,91	3,06 ^{aA}	4,59 ^{aA}	3,55	522,7 ^{aA}	477,71 ^{bA}	502,47
Nível AA 1	4,48 ^{bB}	7,52 ^{aA}	5,83	2,50 ^{bAB}	3,61 ^{aAB}	2,99	455,32 ^{aB}	399,81 ^{bB}	427,67
Nível AA 2	8,08 ^{aA}	7,60 ^{aA}	7,85	4,09 ^{aB}	2,88 ^{bB}	3,57	344,19 ^{bC}	480,58 ^{aA}	411,55
Média	6,61	7,86		3,26	3,47		448,62	439,45	
CV, %		37,46			49,42			2,81	
Interação		p<0,05			p<0,05			p<0,05	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina; Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Outra perspectiva importante em alternativas ao uso tradicional de antimicrobianos melhoradores de desempenho é a associação de aditivos alternativos, como os probióticos, ácidos orgânicos, entre outros. Essa linha de pesquisa baseia-se fortemente na observação de que nenhuma das alternativas atualmente é tão eficiente quanto os antimicrobianos melhoradores de desempenho (NIEWOLD, 2007). Menconi et al., (2013) associaram a suplementação de 0,5% de glutamina com probióticos frente a um desafio com *Salmonella*, e verificaram diferenças na altura e largura dos vilos, e aumento da área de superfície das vilosidades intestinais.

Este resultado é bastante promissor e pode servir de base para outros estudos envolvendo aminoácidos e a modulação do bioma entérico das aves. A modulação do bioma luminal pode ser regulada pelo influxo de nutrientes a partir da dieta, pela taxa de passagem do conteúdo intestinal, nível e atividade de substâncias antimicrobianas (KAUTSOS; ARIAS, 2006). Componentes dietéticos com efeitos biológicos podem atuar como substrato para diferentes populações microbianas. Estudos buscam soluções dietéticas que controlem patógenos intestinais e mantenham a microbiota benéfica (TIIHONEN et al., 2010).

Foram avaliados os pesos absolutos e relativos de carcaça, peito, perna e gordura, os resultados estão demonstrados na Tabela 05. Houve interação ($p < 0,05$) para peso da carcaça, peito e perna. Para o peso da carcaça, de peito e de pernas, não houve diferença entre as dietas para aves desafiadas. As aves que não foram desafiadas apresentaram menor peso de carcaça, de peito e de pernas quando suplementadas pelo maior nível de aminoácidos. Isto demonstra que em situações onde não há demanda, o excesso de aminoácidos pode interferir com a deposição de proteína corporal. Sklan & Plavnik (2002) acrescentam que o excesso de aminoácidos nas dietas de frangos de corte reduz a eficiência de utilização e aumenta a exigência dos aminoácidos essenciais, especificamente sobre a lisina. O desbalanço gerado representa um gasto adicional de energia para a excreção deste excesso na forma de ácido úrico (cerca de 335 cal/mol de ácido úrico sintetizado), segundo Buttery & Boorman (1976) citados por Nieto et al., (1995).

Quando foram considerados os valores relativos de peso de carcaça e de cortes nobres, bem como de gordura abdominal não houve efeito ($p > 0,05$) da dieta ou do desafio experimental. Este resultado corrobora com o observado para o desempenho produtivo (Tabela 02). O excesso de aminoácidos em situações que

não ocorrem desafio piora o resultado em termos de ganho de peso, apesar da conversão alimentar ser otimizada.

Nery (2009) não encontrou efeito ao utilizar diferentes níveis de relação treonina/lisina, para deposição de gordura abdominal, assim como Barbosa et al., (2001) não observaram efeitos significativos no desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte quando alimentados com rações com relações treonina/lisina que variavam de 61% a 89% na fase final de criação. Entretanto, Mendes et al., (1997) verificaram que o aumento da relação Arg:Lis melhorou o rendimento de carcaça e reduziu a gordura abdominal em frangos de corte, criados sob diferentes condições ambientais.

Os resultados de estudos com relação aos requerimentos para deposição de peito são bastante contraditórios. Kidd e Kerr (1996) conduziram experimentos de doses respostas com a treonina em frangos de 30 a 42 dias de idade e verificaram que a treonina necessária para maximizar o ganho de peito é 11 % maior que a necessária para a melhora na conversão alimentar. Kidd et al., (2001) concluíram que a treonina necessária para máxima deposição de carne de peito na fase final não foi superior ao necessário para a conversão alimentar.

Tabela 05 – Pesos absolutos e rendimento de carcaça e de cortes nobres de frangos de corte aos 42 dias, suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.

	Carcaça, g			Peito, g			Pernas, g			Gordura, g		
	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média	Desafiados	Não desafiados	Média
Controle	2329,20 ^{bA}	2436,20 ^{aA}	2382,70	764,80 ^{bA}	834,40 ^{aA}	799,60	641,40 ^{aA}	668,00 ^{aA}	654,70	34,54	36,77	35,71
Nível AA 1	2296,00 ^{bA}	2428,20 ^{aA}	2362,1	745,40 ^{bA}	842,60 ^{aA}	794,00	632,20 ^{bA}	668,00 ^{aA}	650,10	35,09	32,32	33,70
Nível AA 2	2296,80 ^{aA}	2232,20 ^{aB}	2264,50	752,80 ^{aA}	740,22 ^{aB}	746,84	647,80 ^{aA}	607,56 ^{bB}	628,74	30,58	31,74	31,16
Média	2307,33	2365,53		754,33	808,00		640,47	649,24		33,36	33,61	
CV %		4,15			7,34			6,66			33,13	
Interação		p<0,05			p<0,05			p<0,05			ns	
	Carcaça, %			Peito, %			Pernas, %			Gordura, %		
Controle	74,88	75,18	75,03	32,82	34,23	33,53	28,29	27,43	27,84	1,47	1,50	1,49
Nível AA 1	74,94	75,35	75,16	33,58	34,70	34,20	27,54	27,56	27,55	1,54	1,32	1,43
Nível AA 2	74,62	74,79	74,71	32,73	33,36	33,03	28,22	27,43	27,84	1,34	1,43	1,39
Média	74,81	75,11		33,01 ^b	34,12 ^a		28,01	27,47		1,45	1,42	
CV %		3,04			4,76			6,26			32,63	
Interação		Ns			ns			ns			ns	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina; Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina
Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Os resultados da avaliação dos teores de matéria seca, proteína bruta e nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total, de amostras da cama estão descritos na tabela 06. Foi possível verificar que o fornecimento de determinados aminoácidos em maiores níveis, levou ao aumento ($p < 0,05$) da excreção de proteína na cama, independente do desafio. Não houve efeito ($p > 0,05$) sobre matéria seca e nível de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total, o que ameniza o efeito poluidor sobre a produção de amônia dentro das instalações avícolas.

Berres et al., (2007) ao trabalharem com aumentos nos níveis da relação treonina/lisina, também não encontraram diferença da matéria seca da cama. A eliminação de ácido úrico em relação à uréia e amônia dispense pouca água (BUTTERY & D'MELLO, 1994), dessa forma não é esperado que houvesse alterações significativas na umidade da cama com o aumento do catabolismo protéico em aves.

Na avaliação por contrastes, os resultados de proteína bruta na cama das aves que receberam a suplementação de aminoácidos, com relação às camas do tratamento controle, foram diferentes, independente do desafio.

Tabela 06 - Avaliação da quantidade de matéria seca, proteína bruta e nitrogênio amoniacal na cama em que estavam as aves suplementadas com aminoácidos, desafiadas ou não.

	MS, %			PB, %			NH ₃ /N, %		
	D	ND	Média	D	ND	Média	D	ND	Média
Controle	67,55	69,59	68,57	15,29	14,63	14,95 ^B	6,85	7,57	7,25
Nível AA 1	73,27	73,86	73,57	23,87	21,49	22,68 ^A	4,69	4,03	4,36
Nível AA 2	71,20	69,48	70,34	26,95	25,20	26,07 ^A	4,54	5,10	4,82
Média	70,67	70,98		22,03	20,44		5,25	5,57	
CV, %		10,19			18,20			57,96	
Interação		ns			ns			ns	

D: desafiados, ND: não desafiados. Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina. Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Há uma perspectiva otimista em relação ao uso de aminoácidos funcionais como ferramentas para o reestabelecimento do status sanitário dos frangos de corte. Entretanto, devem ser ajustados níveis adequados que não

interferiram com o desempenho produtivo já que o excesso, além de representar desperdício, gera gasto calórico adicional relativo à excreção destes na forma de ácido úrico. A associação de níveis mais baixos a aditivos como os probióticos, óleos essenciais, extratos de plantas e enzimas podem trazer melhores resultados e manter um equilíbrio entre a regeneração da mucosa e o desempenho produtivo.

Em situações de desafio sanitário e sem a suplementação de aminoácidos tróficos, a conversão alimentar foi pior em relação às dietas suplementadas. Já para as aves suplementadas, observou-se melhor regeneração da mucosa intestinal, o que pode ter contribuído positivamente com a conversão alimentar. Na formulação das dietas nas companhias avícolas, onde não é possível saber se irá ocorrer ou não um desafio entérico e considerando o curto tempo de vida e a inviabilidade de uma nova formulação da dieta, o uso preventivo de aminoácidos tróficos nas dietas além das exigências nutricionais, pode ser efetivo e ser uma alternativa ao uso de promotores de crescimento que estão sendo paulatinamente retirados das dietas.

Conclusão

As aves que consumiram as dietas suplementadas com aminoácidos glutamina, arginina e treonina apresentaram uma melhor conversão alimentar no período de 1 a 42 dias, sem alterar o ganho de peso. Os níveis elevados de aminoácidos nas rações experimentais se refletiram nos maiores níveis proteicos na cama do aviário, sem, no entanto, interferir na produção de amônia.

Os aminoácidos utilizados apresentaram efeito sobre a proliferação das células da mucosa intestinal frente ao desafio entérico. Porém em situações de desafio por coccidiose, somente a suplementação com os aminoácidos não foi suficiente para combater o desafio e atuar no reparo da mucosa após o desafio. O rendimento de carcaça e cortes comerciais não foi alterado pelo desafio ou suplementação.

REFERÊNCIAS

- Albino, L. F. T., Feres, F. A., Dionizio M. A., Rostagno H. S., Vargas JR. J. G., Carvalho D. C. O., Gomes, P. C., Costa, C. H. R. 2006. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. *Rev Bras de Zootec.* 35:742-749.
- Allen, P. C., Fetterer, R. H. 2002 Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Micr Rev.*15:58-65.
- Aletor, V. A., Hamid I.I, Niess E. 2000. Low protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens: Effect on performance, carcass characteristics, whole body composition and efficiencies nutrient utilization. *J Sci Food Agric.* 80:547-554.
- Atencio, A., Albino L. F. T., Rostagno, H. S., Oliveira, D. C., Vieites, F. M., Pupa, J. M. R. 2004. Exigência de arginina digestível para frangos de corte machos em diferentes fases. *Rev Bras Zootec.* 33(6):1456-66.
- Austic R. E., Nesheim M. C. 1971. Arginine, ornithine and proline metabolism of chicks: Influence of diet and heredity. *J Nutr.* 101(10):1403-13.
- Ball, R. O., Urschel, K. L., Pencharz, P. B. 2007. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and Lisinaine metabolism. *J Nutr.* 137(6):1626–41.
- Bartell, S. M., Batal, A. B. 2007. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poult Sci,* 86:1940-1947.
- Berres, J., Vieira, S.L., Coneglian J. L. B., Olmos A. R., Freitas D. M., Bortolini T.C.K., Silva G. X. 2007. Respostas de frangos de corte a aumentos graduais na relação treonina:lisina. *Cienc Rur. Santa Maria.* 37(2):510-517.
- Brake J., Balnave D., Dibner J. J. 1998. Optimum dietary arginine:lysine ratio for broiler chickens is altered during heat stress in association with changes in intestinal uptake and dietary sodium chloride. *Br Poult Sci.* 39(2):693-47.
- Buttery, P. J., D’Mello, J. P. F. 1994. Amino acid metabolism in farm animals: an overview. Pag. 1-10. In: D’Mello, J. P. F. (Ed.). *Amino Acid in farm nutrition.* Wallingford: Cab International.
- Carvalho, T. A. 2009. Avaliação de dietas com glutamina e glicina para pintos de corte contendo diferentes relações treonina:lisina. 105f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).Univ. Fed. de Viçosa, Viçosa – MG.

Corzo, A., Kidd, M. T., Dozier, W. A, Pharr, G. T. Koutsos, E. A. 2007. Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. *J Appl Poult Res.* 16:574-582.

Davis, A. T., Austic, R. E. 1982. Threonine imbalance and threonine requirement of the chicken. *J Nutr.* 112:2170-2176.

Dignass, A. D. 2001. Mechanisms and Modulation of Intestinal Epithelial Repair. *Inflamm Bowel Dis.* 7(1):68–77.

Fischer da Silva, A. V., Maiorka, A., Borges, S. A, Santin, E., Boleli, I. C., Macari, M. 2007. Surface area of the tip of the enterocytes in small intestine mucosa of broilers submitted to 23 early feed restriction and supplemented with glutamine. *Intern J Poult Sci* 6:31–35.

Fu, W. J., T. E. Haynes, R. Kohli, J. Hu, W. Shi, T. E. Spencer, R. J. Carroll, C. J. Meininger, and G. Wu. 2005. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* 135:714–721.

Gholamiandehkordi, A. R., Timbermont L., Lanckriet A. 2007 Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 36:375-382.

Gonzalez-Esquerra R. And Leeson S. 2006. Effect of Arginine:Lysine Ratios and Source of Methionine on Growth and Body Protein Accretion in Acutely and Chronically Heat-Stressed Broilers. *Poult Sci* 85:1594–1602.

Gonzalez, E. 2002. Ingestão de alimentos: mecanismos regulatórios. Pages: 187-199. In: *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.* Jaboticabal: FUNEP/UNESP.

Jobgen W., Meininger C. J., Jobgen S. C., LI P., Lee M. J., Smith S. B., Spencer T. E., Fried S. K., Wu G. 2009. Dietary L-arginine supplementation reduces white-fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr* 139:230–7.

Kidd, M. T, Kerr B. J. 1996. Threonine and broiler nutrition. In: *Meeting Arkansas Nutrition Conference.* Fayetteville. Proceedings... Fayetteville: The Poult Fed, p. 203-228.

Kidd, M. T., Gerard P. D., Heger, Kerr B. J., Rowe D., Sistan E K., Burnham. D. J. 2001. Threonine and crude proteine responses in broiler chicks. *Anim Feed Sci Technol.* New York. 94:57-64.

Li P., Yin Y. L., Li D. F., Kim S. W., Wu G. 2007. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 98:237-252.

Lobley G. E., Hoskin S. O. E Mcneil C. J. 2001. Glutamine in animal science and production. *J Nutr*, 131:2525S-2531S.

Maiorka, A. 2002. Efeitos da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade

enzimática do pâncreas de pintos de corte. Tese (Doutorado em Zootecnia).Univ. Est. Paulista. Jaboticabal.

Maiorka, A., Santin E., Dahlke, F., Boleli, I. C., Furlan, R. L., Macari, M. 2003. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. J Appl Poult Res. 12:483-492.

Martinez-Lopes, K. L. A., Leandro, N. S. M., Stringhini, J. H., Rocha, F. R. T., Oliveira, W. L., Chaves, L. S. 2007. Glutamina em dietas de frangos de corte desafiados com *Eimeria acervulina*– desempenho. Rev Bras Cien Avic, Campinas: FACTA, supl. 9, p. 93.

Martinez-Lopes, K. L. A., Leandro, N. S. M., Stringhini, J. H., Rocha, F.R.T., Castro, D. P. O.; Oliveira, F. P. 2008. Glutamina em dietas de frangos de corte desafiados com *Eimeria acervulina* - digestibilidade de nutrientes e histomorfometria intestinal. Rev Bras Cien Avic, Campinas: FACTA, supl. 10:157.

Menconi, A., Kallapura, G., Hernandez-velasco, X., LA Torre J., Morgan M., Pumford, N. R., Layton, S., Urbano T., Caseres, M. Pixley, C, Barton, J., Hargis, B. M., Tellez G. 2013. Effect of Glutamine supplementation associated with probiotics on Salmonella Typhimurium and Nitric Oxide or Glutamine with perinatal supplement on growth performance and intestinal morphology in broiler chickens. Clin Micr. V.2: 5. doi:10.4172/2327-5073.1000120

Mendes, A. A., Watkins, S. E., England J. A. 1997. Influence of dietary lysine levels and arginine:lysine ratios on performance of broilers exposed to heat or cold stress during the period of three to six weeks of age. Poult Sci. 76(3):472-81.

Murakami A. E., Sakamoto M., I., Natali M., R., M., Souza L. M. G. e Franco J. R. G. 2007. Supplementation of Glutamine and Vitamin E on the Morphometry of the Intestinal Mucosa in Broiler Chickens. Poult Sci. 86: 488-495.

Murakami, A. E., Fernandes, J. I. M., Hernandez, L., Santos, T. C. 2012. Effects of starter diet supplementation with arginine on broiler production performance and on small intestine morphometry. Pesq Vet Bras. 32(3):259-266.

Nery, L. R. 2009. Relações treonina:lisina digestível em rações suplementadas ou não com anticoccidiano, glicina e glutamina/ácidoglutâmico para frangos de corte alojados em ambiente de desafio sanitário. 101p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Univ. Fed. de Viçosa, Viçosa.

Nieto R., Prieto C., Fernández-Fígares I. & Aguilera J.F. 1995. Effect of dietary protein quality on energy metabolism in growing chickens. Br. J. Nutr. 74:163-172.

Padovese R. 2000. Aplicações clínicas da glutamina. Rev. Bras. Cien. Farm. 36(1):23-25.

Páez L. E. B. 2004. Relação Treonina:lisina em rações de alta e de baixa digestibilidade para frangos de corte criados em ambiente limpo e sujo. 82p.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Parsons, C. M., Baker, D. H. 1994. The concept and use of ideal proteins in the feeding of non-ruminants. Pages 119-128. In: simpósio internacional de produção de não-ruminantes. Maringá. Anais... Maringá: SBZ.

Primot, Y, Corrent, E, Melchior, D, Relandeau, C. 2008. Threonine in pigs and broilers: A crucial amino acid for growth and gut function. Ajinomoto Eurolysine. Technical information nº31, Disponível em: http://www.ajinomoto-eurolysine.com/bulletin_31_en.pdf. Acesso em 10/12/2013

Pulici, P. M. M. 2012. Avaliação da resposta do uso do óleo essencial de orégano comparado com promotores de crescimento convencionais e anticoccidianos no desempenho de frangos de corte. Dissertação (Mestrado em Ciências). Fac. Med. Vete. Zootec. Univ. São Paulo, Pirassununga, SP. 67f.

Rabnhorst, S. H.; Burini, R. C.; Sdhmitt, F. C. L. 1993. Marcadores da proliferação celular. Rev. Bras. Pat. Clin. Rio de Janeiro. 29(1):24-29.

Sakamoto I. M. 2009. Desempenho, desenvolvimento e atividade enzimática da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com glutamina e nucleotídeos. Tese (Doutorado em Zootecnia). Fac. Zootec Eng. Alim. – Univ. de São Paulo.

Sakamoto, M. I., Faria, D. E., Nakagi, V. S., Negrão, J. A., Araújo, R. B., Souza, K. M. R., & Previero, T. C. 2011. Utilização da glutamina, associada ao ácido glutâmico, sobre o desenvolvimento e a atividade enzimática em frangos de corte. Arq Bras Med Vet Zootec, 63(4).

Santúrio, J. M., Santurio, D. F., Pozzatti, P., Moraes, C., Francin, P. R., Alves, S. H. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* enterica de origem avícola. Cienc Rural, Santa Maria. 37(3):803-808.

SAS INSTITUTE. Software and services: system for Windows, version 8.0 software Cary, 2002.

Scheppach W., Dusel G, Kuhn T, et al. 1996. Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. Gut. 38:878–85. doi: 10.1136/gut.38.6.878.

Sklan D. & Plavnik I. 2002. Interactions between dietary crude protein and essential amino acid intake on performance in broilers. Br. Poult. Sci. 43:442-449.

Soltan, M. A. 2009. Influence of Dietary Glutamine Supplementation on Growth Performance, Small Intestinal Morphology, Immune Response and Some Blood Parameters of Broiler Chickens. Int. J. Poult Sci 8(1):60-68.

Szondy e Newsholme E. A. 1989. The effect of glutamine concentration on the activt of carbomoyl-phosphate synthetase II and on the incorporation of [3H]

thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Biochem. J.* 261:970-983.

Teirlinck E., Bjerrum L., Eeckhaut V., Huygebaert G., Pasman S. F., Haesebrouck F., Dewulf J., Ducatelle R., Van Immerseel F. 2009. The cereal type in feed influences gut wall morphology and intestinal immune cell infiltration in broiler chickens. *Br J Nutr* 102:1453-1461.

Toledo, G. S. P., Costa, P. T. C, Da Silva, L. P., Pinto D., Ferreira, P., Poletto C. J. 2007. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápicos como promotores, adicionados isoladamente ou associados. *Cien Rural. Santa Maria.* 37(6):1760-1764.

Uni Z, Platin R, Sklan D. 1998. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J. Comp. Phys.* 168: 241-7.

Viola, E. S., Vieira, S. L. 2007. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. *Rev. Bras. Zootec.* 36(4):1097-1104.

Wang J., Chen L., Li P., Li X., Zhou H., Wang F., Li D., Yin Y., Wu G. 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr.* 138:1025–32.

Wang J. Y., Mc Cormack S. A., Viar M. J., Johnson L. R. 1991. Stimulation of proximal small intestinal mucosal growth by luminal polyamines. *Am J Physiol.* 261:504–511.

Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr.* 128:1249-1252.

Wu G. and Morris S. M. Jr. 1998. Arginine Metabolism: Nitric oxide and beyond. *Bioch. J.* 336:1-17.

Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 37:1-17.

Yi, G. F., Allee, G. L., Knight, C. D., Dibner. J. J. 2005. Impact of glutamine and oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria Maxima*. *Poult Sci* 84:283-293.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DA ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE O SISTEMA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A UM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

RESUMO - O epitélio da mucosa do trato digestivo representa uma importante barreira entre um vasto espectro de substâncias imunogênicas presentes no lúmen intestinal. A perda da integridade da mucosa compromete a homeostase orgânica, levando a ativação do sistema imune, redirecionando os nutrientes importantes ao crescimento, para os processos de mecanismos de defesa. O objetivo do projeto foi avaliar o sistema imune de frangos de corte submetidos a um modelo de infecção experimental e suplementados com aminoácidos: glutamina, arginina e treonina. Foram 600 pintos de corte da linhagem Cobb, machos, de 1 dia de idade. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (com e sem desafio experimental e 3 dietas). Uma dieta comercial foi utilizada como controle e outras duas dietas foram elaboradas com glutamina, associada ao ácido glutâmico (1,5 e 3% de Aminogut[®]), arginina (1 e 2% de L-Arginina) e treonina (1 e 2% de L-treonina). Foi realizada a avaliação das medidas morfométricas dos órgãos linfóides baço, timo e bolsa cloacal, contagem dos aglomerados linfóides do fígado, e contagem das IgA de mucosa do jejuno. Também foi avaliada a concentração sérica das enzimas hepáticas AST, GGT e albumina, além da concentração sérica do ácido úrico e uréia. A análise estatística foi realizada pelo procedimento GLM do software SAS. As aves que consumiram as dietas suplementadas com aminoácidos apresentaram aos 28 dias, menor absorvância para IgA de mucosa, e as que receberam nível maior dos aminoácidos na dieta, tiveram maior número de células calciformes que as que receberam nível intermediário. Aos 28 dias, entre as aves não desafiadas, as que receberam os níveis mais altos de aminoácidos tiveram menores, área e índice esplênicos. Não houve diferença ($p > 0,05$) nas medidas da bolsa cloacal. Aos 28 dias, as aves que receberam o nível intermediário da suplementação de aminoácidos tiveram a maior contagem de aglomerados linfóides, entre as aves desafiadas. Os níveis séricos de AST, uréia e ácido úrico foram afetados pela

suplementação dos aminoácidos ($p < 0,05$), de modo que as maiores contagens séricas foram nas aves que receberam os maiores níveis dos aminoácidos.

Palavras-Chave: Sistema Imune, Aminoácidos Tróficos, IgA de mucosa, frango de corte.

CHAPTER 2 – EFFECT OF ADDITION OF AMINO ACIDS ON THE IMMUNE RESPONSE IN BROILERS SUBJECTED TO AN EXPERIMENTAL INFECTION MODEL

ABSTRACT- The mucosal epithelium of the digestive tract is an important barrier between several immunogenic substances in the intestinal lumen. When the integrity of this barrier is lost, organic homeostasis is impaired, and the immune system is activated, which direct important nutrients for growth to defense mechanisms. This study aimed to analyze the immune response of broilers experimentally infected and supplemented with the amino acids glutamine, arginine and threonine. 600 one-day-old male Cobb broilers were distributed in a completely randomized design with a 2x3 factorial arrangement (with and without challenge and 3 diets). A commercial diet was the control and two diets were prepared with glutamine associated with glutamic acid (1.5 and 3% Aminogut[®]), arginine (1 and 2% L-Arginine) and threonine (1 and 2% L-threonine). We evaluated the morphometric measurements of the spleen, thymus and cloacal bursa; counted the lymphoid clusters in the liver, and determined the IgA in the jejunum mucosa. Also, we measured the serum concentrations of liver enzymes AST, GGT and albumin, and serum uric acid and urea. Statistical analyses were run using the GLM procedure of SAS. Birds that received diets supplemented with amino acids, showed, at 28 days, a lower absorbance for mucosal IgA, and those that consumed higher level of amino acids, had a greater number of goblet cells than those receiving intermediate level. At 28 days, among non-challenged broilers, those that received the highest level of dietary amino acids showed lower values of spleen area and index. No significant difference ($p>0.05$) was detected in the measurements of the cloacal bursa. Birds challenged and supplemented with the intermediate level of amino acids showed an increased number of lymphoid clusters at 28 days. Serum AST, urea and uric acid were influenced by amino acid supplementation ($p<0.05$), with higher values in birds that consumed the highest level of amino acids.

Key words: Immune system, Trophic Amino acids, mucosal IgA, broilers.

Introdução

O padrão sanitário é decisivo para permitir que as aves expressem ao máximo o potencial genético, já que quando o sistema imune é ativado ocorrem alterações fisiológicas e metabólicas no organismo, as quais alteram o consumo de alimento e conseqüentemente o ganho de peso e conversão alimentar. O perfil de nutrientes utilizado nas formulações de rações para frangos está baseado em pesquisas que avaliam as funções produtivas economicamente importantes como: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e rendimento de corte, porém a imunidade e a resistência a doenças são pouco consideradas (KIDD, 2004).

Nas criações comerciais de frangos de corte, os agentes estressores ambientais, incluindo excesso de lotação, umidade, pior qualidade do ar, assim como a presença de agentes estressores infecciosos podem modificar o metabolismo e a utilização dos nutrientes (NORUP et al., 2008).

O epitélio da mucosa do trato digestivo representa uma importante barreira entre um vasto espectro de expressivas substâncias imunogênicas dentro do lúmen intestinal e o epitélio da mucosa intestinal (DIGNASS, 2001). A perda da integridade da mucosa compromete dramaticamente a homeostase orgânica, visto as inúmeras funções desse sistema e por isso a integridade precisa ser rapidamente restabelecida.

Nos estados inflamatórios da mucosa, o aumento do *turnover* da proteína corporal, talvez seja a alteração mais significativa e com maior impacto sobre o crescimento e ganho de peso (HILL e HILL, 1998). A síntese proteica muscular é interrompida e há um aumento concomitante do catabolismo proteico visando aumentar o fluxo de aminoácidos para a síntese de proteínas de fase aguda e para os órgãos viscerais, os quais são utilizados para fornecer energia e para ativar processos envolvidos nos mecanismos de defesa (OBLED, 2004).

Entretanto, o perfil de aminoácidos liberado a partir da proteólise muscular pode não atender as exigências específicas nestas condições, resultando em excessiva mobilização de proteínas com elevado custo

metabólico para o organismo (REEDS et al., 1994). Um expressivo incremento da síntese de proteína no intestino corresponde às células imune, as quais representam aproximadamente 25% das células da mucosa intestinal (OBLET, 2004). Desta forma, o fornecimento de aminoácidos potencialmente importantes para a resposta imune pode reduzir a perda muscular e acelerar a recuperação em processos inflamatórios.

A glutamina (Gln) é considerada um aminoácido essencial em algumas espécies sob condições inflamatórias (NEWSHOLME, 2001). Já é bem reconhecido o papel desse aminoácido como principal combustível para a mucosa intestinal e células imune (CALDER, 1995; WU, 1998). O nitrogênio amínico da glutamina é utilizado para a síntese de nucleótidos e isso explica a alta exigência de Gln pelas células que proliferam rapidamente, como aquelas do sistema imune e da mucosa intestinal (NEWSHOLME, 2001).

Nas aves, a treonina é precursora da glicina e da serina está envolvida na resposta imune, compondo as globulinas do sistema imunitário e é necessária na produção gastrintestinal de mucina (LEMME, 2001; WALDRUP, 2002). A barreira de muco, da mucosa intestinal representa a primeira linha de defesa contra translocação de agentes patogênicos (GARDINER et al., 1995). A produção de mucina intestinal e a sua secreção é um processo dinâmico, sendo continuamente degradada e renovada (MONTAGNE et al., 2003; SMIRNOV et al., 2004). Este equilíbrio pode ser influenciado pela natureza da dieta (MONTAGNE et al., 2004; SHARMA et al., 1997), ou pela presença de organismos patogênicos.

A participação da treonina no aumento dos títulos de anticorpos séricos bem como nas concentrações de IgA e IgG e no decréscimo de IL-6, citocina associada à diminuição do apetite, na mucosa do jejuno de frangos de corte desafiados com *E. coli* foi documentada por Wang et al. (2006). Bartell e Batal (2007) já reportam que a inclusão de 1% de glutamina na dieta de frangos de corte proporcionou o aumento na produção de IgA e IgG.

A suplementação dietética com Arg e Glu reduzem a expressão de genes pró inflamatórios no intestino delgado (FU et al., 2005; WANG et al., 2008) e elevam as concentrações de poliaminas que têm efeito direto sobre a divisão celular, síntese protéica e crescimento tecidual (GONZALEZ-ESQUERRA & LEESON, 2006). A Arg é considerada um aminoácido essencial

para aves, pelo fato de que o ciclo bioquímico da uréia não ser funcional em aves (AUSTIC & NESHEIM, 1971), portanto são dependentes da Arg dietética.

Para que a Arg possa ser utilizada para a síntese das poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) ou prolina, precisa ser hidrolisada para uréia e ornitina pela arginase (MEIJER et al., 1990; WU & MORRIS, 1998). A uréia plasmática é associada com a suplementação de Arg, sendo que entre 40 a 60% da uréia, excretada pelas aves, é resultado da síntese de ornitina (RUIZ-FERIA et al., 2001).

Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO (óxido nítrico) a partir da Arg e intermediários reativos do oxigênio. Entretanto, Hartman et al., (2006) relatam que as células das aves são menos propensas aos efeitos nocivos do ataque destes radicais livres por terem altos níveis circulantes de ácido úrico. O ácido úrico vem, recentemente, sendo considerado um importante antioxidante (HARE & JOHNSON, 2003). A concentração plasmática de ácido úrico, em aves, é excepcionalmente alta quando comparada com outros vertebrados e, por isso, os elevados níveis de NO não teriam as mesmas conseqüências relatadas para os mamíferos (HARTMAN et. al., 2006).

A resposta imune direcionada a infecção pela coccidiose envolve a resposta inespecífica garantida pela resposta inata, e resposta de caráter específico, que envolve a atividade de citocinas, hormônios, leucócitos, tecidos linfóides associados ao intestino (GALT), macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (RUFF, 1999). Logo após a infecção por *Eimeria* spp, as células β , presentes na mucosa intestinal iniciam a produção de anticorpos. Nos frangos, as imunoglobulinas predominantes nas secreções intestinais são as IgA, que é capaz de atravessar diretamente a superfície epitelial.

O melhor entendimento da participação dos aminoácidos na resposta imune frente a situações de desafio à mucosa intestinal e a compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune é fundamental para manter a saúde, o desempenho e o retorno econômico da atividade avícola. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o sistema imune de frangos de corte

submetidos a um modelo de infecção experimental e suplementados com aminoácidos: glutamina, arginina e treonina.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em Aviário Experimental e todos os procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação. Foram utilizados 600 pintos de corte da linhagem Cobb, machos, de 1 dia de idade. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (com e sem desafio experimental e 3 dietas) totalizando 6 tratamentos, 5 repetições com 20 aves cada.

Até os 10 dias as aves foram alimentadas com ração comercial, e a partir dos 11 dias, as dietas experimentais passaram a ser fornecidas. Uma dieta comercial foi utilizada como controle e outras duas dietas foram elaboradas com glutamina, associada ao ácido glutâmico (1,5 e 3% de Aminogut[®]), arginina (1 e 2% de L-Arginina) e treonina (1 e 2% de L-treonina). Aos 14 dias de idade, O grupo de aves desafiadas recebeu vacina comercial para coccidiose com as espécies *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. praecox*; *E. tenella* e *E. mitis*. Previamente à aplicação foi realizada a esporulação dos oocistos pela injeção de O₂ diretamente em tubos Falcon com a vacina, os quais foram rapidamente lacrados e mantidos em estufa BOD a 28°C durante 48 horas. A vacina foi inoculada diretamente no inglúvio de cada ave na dose de 20 vezes a recomendada pelo fabricante da vacina (± 80.000 oocistos). Dois dias após, um inóculo contendo *Escherichia coli*, cepa isolada de fezes de frangos de corte adultos, confirmada por série bioquímica e PCR, cedida pela Universidade Estadual de Londrina – Laboratório de Medicina Aviária, com uma concentração calculada de 10⁸ UFC/dia/ave foi preparado e fornecido na água de bebida das aves por dois dias seguidos.

As aves foram mantidas em temperatura de conforto térmico, de acordo com sua fase de vida, em aviário climatizado, com placa evaporativa e alojadas em boxes com maravalha. Ração e água foram fornecidas a vontade

durante todo o período de criação. As dietas, à base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais adotadas pelas integrações avícolas da região (Tabela 1). O programa de alimentação foi dividido em três fases: inicial (1 a 10 dias de idade), crescimento (11 a 29 dias) e a abate (30 aos 42 dias de idade).

Tabela 01. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período de crescimento (11 a 29 dias) e abate (30 a 42 dias).

Ingredientes (%)	Ração crescimento	Ração abate
Milho 7,5%	41,55	45,78
Farelo de soja 46%	39,30	35,10
Oleo Soja	8,10	8,20
Sal comum	0,31	0,38
Calcáreo calcítico 38,5%	1,08	1,03
Fosfato Bicálcico 20%	1,72	1,70
Bicarbonato de Sódio	0,10	0,00
DL-Metionina 98%	0,35	0,33
L- Lisina 50,7%	0,23	0,23
L-Treonina 98%	0,08	0,07
Colina 60%	0,08	0,08
Premix mineral e vitamínico ^{1,2}	0,10	0,10
Caulim*	0 – 7	0 – 7
Valores calculados		
Proteína, %	21,63	19,98
EM, Kcal/Kg	3,000	3,050
Cálcio, %	0,929	0,900
Fósforo, %	0,440	0,410
Lisina Dig., %	1,200	1,100
Metionina Dig., %	0,625	0,590
Met + Cis Dig., %	0,912	0,859
Treonina Dig., %	0,791	0,726
Triptofano Dig., %	0,237	0,216
Arginina Dig., %	1,356	1,240

* Substituído pela inclusão dos aminoácidos tróficos na dieta Nível AA 1 (1,5kg de Aminogut[®], 1kg de L-Arginina e 1 kg de L-Treonina) e na dieta Nível AA2 (3kg de Aminogut[®], 2kg de L-Arginina e 2 kg de L-Treonina).

¹Mistura Vitamínica Inicial (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg, Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

²Mistura mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

Aos 21, 28 e 42 dias 2 aves por unidade experimental foram sacrificadas por deslocamento cervical. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento do jejuno (a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel), os quais foram presos abertos longitudinalmente em placas de isopor, e lavados com soro fisiológico. As amostras foram fixadas em solução de formol tamponado e após foram emblocadas em parafina. Cada fragmento foi submetido à cortes semi-seriados de 5 μm de espessura e corados por PAS (Ácido Periódico de Schiff). Para a contagem das células caliciformes, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (Olympus BX 50), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética), em aumento de 40x. A contagem de células caliciformes foi feita nas imagens capturadas em aumento de 40x por mm^2 de área de vilos.

Destas mesmas aves, obteve-se um raspado da mucosa intestinal que foram analisados para determinação dos níveis de imunoglobulina A (IgA) pelo método de enzimo-imunoensaio (ELISA). Para a realização do teste ELISA, a placa foi adsorvida com a mucosa intestinal na diluição de 1000ng/100mL/cavidade, após a determinação da concentração protéica pelo método de Bradford. A diluição do extrato foi realizada em tampão carbonato 0,05M (pH 9,6) e a adsorção ocorreu em refrigeração por 14 horas. Foram utilizadas placas de polietileno (Nunc Brad Products), constituída de 96 cavidades (12X8) com o fundo chato.

A primeira lavagem para remover o excesso de antígeno que não se fixou na placa, foi realizada com solução de lavagem (tampão fosfato – PBS contendo 0,05% Tween). A operação de lavagem foi repetida por três vezes. Para o bloqueio da placa foi usada solução de bloqueio (caseína 2%; 0,05% tween 20; diluídas em PBS), incubando-se a mesma em estufa, a 37°C, por 60 minutos.

Após repetir processo de lavagem, foi adicionado o anticorpo marcado anti IgA (G x-ChickenIgG HRP conjugate – A30-103P - Bethyl®) diluído na proporção de 1:20.000 distribuídos em 100uL/cavidade, incubando em estufa por 60 minutos. O substrato usado para leitura da placa foi o TMB (Sinapse®), seguindo-se a leitura em leitor de microplacas, após a interrupção da reação

com a adição de ácido fosfórico 1M. A leitura foi realizada com filtro primário em 450nm e secundário de 630nm de comprimento de onda.

Para a medida morfométrica da bolsa cloacal, timo e baço, os órgãos foram fixados em solução de formol tamponado. As peças foram inclusas em parafina e levadas ao micrótomo rotativo para a realização dos cortes transversais no centro do órgão com cinco micrômetros de espessura e corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Para a captura das imagens dos órgãos foi utilizada uma lupa acoplada a um estereomicroscópio. As imagens foram preparadas e analisadas por meio do sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Foram obtidas as medidas da área total de cada órgão (mm²), área de tecido linfóide (bolsa cloacal) e eixo longitudinal e transversal do baço e timo (mm). A partir dessas medidas foram realizadas as medidas do índice tímico e esplênico pela multiplicação dos eixos longitudinal e transversal de cada órgão, baseado na metodologia de Ishibashi (1991) adaptado por Janini, et al., (2003).

Para contagem dos aglomerados linfóides de fígado, o tecido foi também fixado em formol tamponado com a posterior inclusão em parafina. Cortes de cinco micrômetros foram realizados com o auxílio do micrótomo rotativo, sendo corados em seguida pelo método de hematoxilina e eosina (HE). Com auxílio de um microscópio óptico, dez campos foram observados no aumento de 400x. O número de aglomerados linfóides encontrados em cada um dos dez campos foi somado, compondo o número de aglomerados linfóides de cada amostra.

Aos 28 e 35 dias de idade, uma e duas semanas pós-infecção, de 2 aves por repetição (10 aves/trat) foi feito a coletado sangue para o estudo do perfil bioquímico sérico das aves. As amostras de soro permaneceram congeladas até o momento das análises bioquímicas, que foram realizadas no analisador químico BS-200 Mindray® (Mindray Medical International Limited). Foram utilizados kits comerciais da marca DIALAB® específicos para determinação das concentrações séricas dos indicadores do metabolismo de aminoácidos: uréia e ácido úrico, além dos testes da função hepática: albumina, AST (Aspartato transaminase) e GGT (Gama glutamiltransferase ou GAMA-GT).

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (“outliers”) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Depois de constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002) com nível de 5% de significância, para se descrever o efeito do desafio experimental e da suplementação de aminoácidos sobre a regeneração da mucosa intestinal, e em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Para a variável contagem dos aglomerados linfóides, foi realizada transformação dos dados por meio de logaritmo na base dez. Para a variável IgA da mucosa, procedeu-se a análise utilizando modelos generalizados, assumindo distribuição binomial negativa com a função de ligação padrão, sendo realizada pelo teste t de Student.

Resultados e discussão

A participação de aminoácidos funcionais na resposta imune da mucosa intestinal de frangos de corte submetidos a um modelo de infecção experimental foi investigada. Na tabela 02 estão demonstrados os valores de absorbância do teste ELISA para IgA da mucosa do jejuno. Pode ser observado que uma semana após a infecção, houve um menor valor ($p < 0,05$) de IgA na mucosa intestinal das aves desafiadas, independente das dietas. Já aos 28 dias, as aves que receberam o nível maior de aminoácido nas dietas, apresentaram menor nível de IgA ($p < 0,05$), quando comparado com o controle. Da mesma forma, independente do desafio, os níveis de IgA decresceram de acordo com a inclusão dos aminoácidos.

Isto demonstra aparentemente, uma resposta rápida e eficiente das aves suplementadas por aminoácidos, diante do dano causado pelas Eimerias à mucosa intestinal. Devido ao complexo ciclo de vida que o parasita desenvolve dentro do hospedeiro, a resposta imune é também bastante complexa, envolvendo imunidade mediada por células, produção de anticorpos

e de citocinas. Segundo Galha et al., (2008), os anticorpos circulantes, específicos para vários estágios do parasita, são detectáveis dentro de uma semana após a inoculação dos oocistos, alcançando o nível máximo em um ou dois meses e, então, declinando, apesar de persistirem na circulação.

Outro fator que dificulta o entendimento é que durante cada estágio do ciclo de vida, a *Eimeria* utiliza nichos diferentes dentro do hospedeiro, desde os espaços extracelulares das mucosas até as áreas intracelulares dos enterócitos e de outras células do epitélio. Na fase extracelular, o parasita é suscetível a anticorpos, complemento, citocinas, mediadores inflamatórios e à fagocitose. No interior da célula, o parasita é afetado pela atividade citotóxica e por mecanismos intracelulares de defesa, tais como pela produção de radicais livres e por enzimas (ALLEN E FETTERER, 2002).

Em concordância, Bartell e Batal (2007), ao suplementarem frangos de corte com níveis de 1 e 4% de glutamina, encontraram menor nível de IgA de mucosa quando utilizado 4% do aminoácido.

Tabela 02 - Valores de absorvância do teste ELISA para IgA na mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental

	21 dias			28 dias		
	Desafiados	Não Desafiados	Média	Desafiados	Não Desafiados	Média
			21 dias			
Controle	0,069	0,074	0,071	0,094	0,085	0,089 ^A
Nível AA1	0,057	0,071	0,064	0,086	0,084	0,085 ^{AB}
Nível AA2	0,059	0,076	0,067	0,068	0,083	0,076 ^B
Média	0,061 ^b	0,073 ^a		0,083	0,084	
CV, %		20,39			21,28	
Interação		ns			ns	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey. Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Na tabela 03 está demonstrado o número de células caliciformes/mm de vilo. No período de uma semana após a infecção, as aves que foram desafiadas pela vacina de coccidiose e inoculadas com *E. coli*, apresentaram maior ($p < 0,05$) número de células caliciformes. Isso é o esperado já que as células caliciformes são secretoras de muco glicoprotéico (Figura 1). Tais células protegem o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos

abrasivos da digesta (ROBERTIS E HIB, 2001), e de agentes agressores. Devido à natureza dinâmica da síntese e degradação de mucina, essa taxa de *turnover* não é regular, assim, a espessura da camada de muco pode variar dependendo do equilíbrio entre ambos eventos. Este equilíbrio pode ser influenciado pela natureza da dieta (MONTAGNE et al., 2004; SHARMA et al., 1997), pela presença ou o estado de virulência de organismos patogênicos presentes no lúmen intestinal.

Aos 28 dias, o nível intermediário de suplementação dietética de aminoácidos resultou no menor número de células caliciformes em comparação a dieta com nível maior de suplementação. Esse efeito justifica-se pelo fato de que a treonina tem participação importante na composição da mucina, assim como a glutamina é necessária para a glicosilação.

Tabela 03 - Contagem de células caliciformes na mucosa do jejuno de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental

	21 dias			28 dias			42 dias		
	D	ND	Média	D	ND	Média	D	ND	Média
Controle	15,15	12,75	13,95	13,95	13,19	13,55 ^{AB}	16,75	18,98	17,93
Nível AA 1	16,75	11,78	14,26	12,25	11,75	12,01 ^B	18,22	18,58	18,39
Nível AA 2	13,55	10,50	12,11	15,50	13,76	14,63 ^A	18,81	16,93	18,29
Média	15,15 ^a	11,72 ^b		13,89	12,94		18,32	18,12	
CV, %		25,64			21,90			27,17	
Interação		ns			ns			ns	

D: desafiados, ND: não desafiados. Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina
Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey. Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

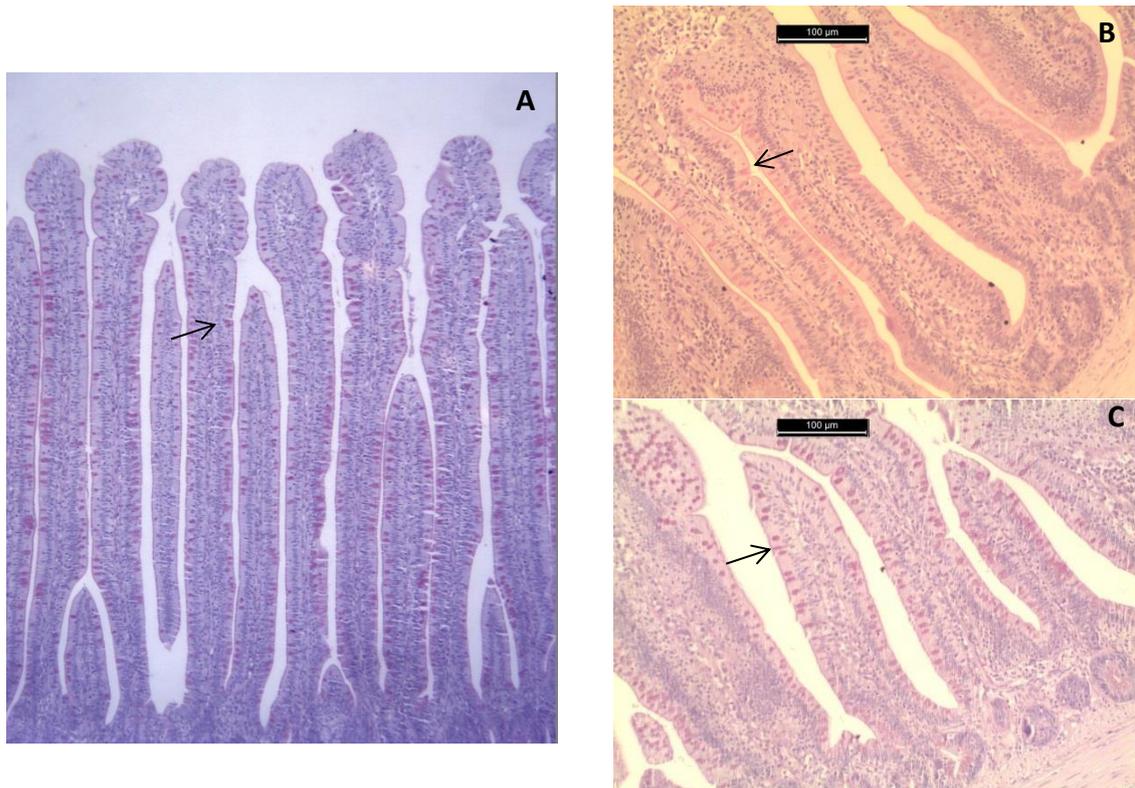


Figura 1: Jejunum de frangos de corte com 21 dias de idade. Observar corte transversal dos vilos do jejunum corados com PAS, para visualizar as células caliciformes (setas). Figura A: aumento de 10x, jejunum de uma ave que consumiu a dieta controle. Figura B e C: aumento de 40x, parte intermediária dos vilos do jejunum de frango de corte que consumiu o nível intermediário de aminoácidos, e superior respectivamente.

As medidas morfométricas do timo e do baço estão na Tabela 04 e 05 respectivamente. Foram avaliadas a área do timo e baço, assim como o índice tímico e índice esplênico. No período de 1 semana após o desafio (21 dias), houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores da área do timo e o índice tímico, no entanto, aos 28 dias não houve efeito ($p > 0,05$) para tais parâmetros. Aves desafiadas apresentaram menores medidas do timo que as aves não desafiadas.

O timo é um órgão linfóide primário responsável pela diferenciação e maturação das células T. Evidências crescentes demonstram que a imunidade mediada por células desempenha o papel principal na resistência contra a coccidiose, incluindo tanto a ativação não-específica de linfócitos, macrófagos e células natural killer (NK), como a ativação de células T antígeno específicas, o que explica a redução do órgão em situações de envolvimento do sistema imune celular como observado neste trabalho.

Tabela 04: Medidas morfométricas do timo em frangos de corte recebendo dietas com adição de aminoácidos, desafiados ou não, em coletas aos 21 e 28 dias.

	Área do timo (mm ²)			Índice Tímico (mm ²)		
	Desafiados	Não Desafiados		Desafiados	Não Desafiados	
		Desafiados	Média		Desafiados	Média
			21 dias			
Controle	1111,84	1397,12	1254,48	1,04	1,74	1,39
Nível AA 1	1087,41	1626,28	1433,83	1,27	2,07	1,78
Nível AA 2	1084,21	1454,40	1232,29	1,32	1,76	1,50
Média	1094,18 ^b	1506,49 ^a		1,21 ^b	1,88 ^a	
CV, %		39,44			44,13	
Interação		ns			ns	
			28 dias			
Controle	1902,58	2039,91	1976,53	2,29	2,16	2,22
Nível AA 1	2311,22	1800,10	2055,66	2,14	2,20	2,17
Nível AA 2	1504,16	1559,74	1526,39	1,85	1,94	1,88
Média	1905,99	1842,29		2,09	2,12	
CV, %		37,51			39,66	
Interação		ns			ns	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Na semana pós-infecção (21 dias) não foi observado efeito ($p > 0,05$) das dietas ou do desafio experimental sobre as medidas morfométricas do baço. Houve interação ($p < 0,05$) entre os fatores dieta e desafio, para os dados de área do baço e índice esplênico aos 28 dias (Tabela 5). Para as aves desafiadas, a inclusão de aminoácidos não afetou as medidas morfométricas esplênicas. Entre as aves não desafiadas observou-se diminuição das medidas esplênicas apenas no tratamento com o maior nível de aminoácidos. Os maiores valores foram correlacionados às aves controle que não foram desafiadas.

O baço corresponde à maior unidade do sistema mononuclear fagocitário, constituindo-se no maior acúmulo de tecido linfóide do organismo e o único órgão dessa natureza interposto na circulação sanguínea. A alteração esplênica mais freqüentemente detectada é a esplenomegalia, que corresponde a um sinal clínico importante e pode estar relacionada com processos infecciosos e condições imunológicas inflamatórias (JANINI et al., 2003).

Por outro lado, Sakamoto et al., (2006), ao suplementarem as aves com Glu, encontraram maior peso relativo do baço das aves suplementadas na dieta inicial. É importante a interpretação destes dados em relação às condições sanitárias de cada um dos experimentos. Estes autores não utilizaram desafio infeccioso, além de utilizarem apenas 1% de Glu.

Bartell e Batal (2007), nestas mesmas condições sanitárias adicionaram de 1 a 4% de Glu na dieta e não verificaram alteração em peso do timo, baço e bolsa cloacal.

Tabela 05: Medidas morfométricas do baço em frangos de corte recebendo dietas com adição de aminoácidos, desafiados ou não, em coletas aos 21 e 28 dias.

	Área do Baço (mm ²)			Índice Esplênico (mm ²)		
	Desafiados	Não Desafiados	Média	Desafiados	Não Desafiados	Média
	21 dias					
Controle	1738,62	1827,55	1773,20	2,13	2,31	2,21
Nível AA 1	1783,03	1540,47	1648,27	2,38	1,99	2,15
Nível AA 2	1712,26	1713,88	1713,12	2,13	2,16	2,15
Média	1743,97	1677,79		2,20	2,13	
CV, %		27,42			27,74	
Interação		ns			Ns	
	28 dias					
Controle	2497,98 ^{bA}	3204,11 ^{aA}	2777,58	3,05 ^{bA}	4,25 ^{aA}	3,51
Nível AA 1	2206,23 ^{aA}	2945,61 ^{aA}	2547,48	2,80 ^{aA}	3,85 ^{aA}	3,28
Nível AA 2	2330,19 ^{aA}	2014,37 ^{aB}	2160,14	2,86 ^{aA}	2,48 ^{aB}	2,66
Média	2370,94	2710,16		2,93	3,51	
CV, %		23,37			27,88	
Interação		p<0,05			p<0,05	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Soltan (2009) ao utilizar 1% de glutamina na dieta de frangos de corte, encontrou maior atividade fagocítica, assim como maior contagem de linfócitos e melhoria da resposta imune humoral. Observaram maiores índices esplênicos e da bursa. Já ao utilizar níveis maiores de glutamina (1,5-2,0%), não foi observado diferença significativa nesses fatores.

Na tabela 6 estão descritos os resultados para área total da bolsa cloacal, a área de tecido linfóide, e a porcentagem de tecido linfóide em relação à área total. Aos 21 e 28 dias não foi observada diferença ($p>0,05$) entre os

tratamentos, possivelmente pelo fato de que a resposta imune à coccidiose envolve principalmente a resposta imune celular e não humoral, relacionado com o bolsa cloacal.

O lúmen interno da bolsa é delimitado por “prolongamentos” de tecido epitelial que forma pregas de diferentes tamanhos e é onde ocorre a formação dos folículos linfóides, que, segundo Montassier (2000), se constituem nas principais estruturas onde ocorrem fases importantes do desenvolvimento dos linfócitos B em células imunocompetentes maduras e funcionais.

A proteção por anticorpos produzidos na bolsa cloacal, parece não ser relevante na proteção contra a coccidiose, pois aves bursectomizadas, que produzem pouco ou nenhum anticorpo, tornam-se resistentes à reinfecção por coccídias (GALHA et al., 2008). A resposta imune direcionada a infecção pela coccidiose envolve a resposta inespecífica garantida pela resposta inata, e resposta de caráter específico, que envolve a atividade de citocinas, hormônios, leucócitos, tecidos linfóides associados ao intestino (GALT), macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (RUFF, 1999). Possivelmente esse fato justifique a ausência de alteração nas medidas morfométricas da bolsa cloacal, já que esta está envolvida com a imunidade humoral.

Fernandes et al., (2011) também não encontraram efeito significativo em peso relativo de timo e bolsa cloacal, produção de anticorpos, e medidas das pregas cloacais em várias idades ao suplementarem as aves com arginina, desafiadas com a vacina de Gumboro.

Pesquisas em espécies aviárias suplementadas com arginina apontaram ações regulatórias (TAYADE et al., 2006; LEE et al., 2002) e melhorias no sistema imune, como pelo aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos (SUNG et al., 1991). Entretanto, essas melhorias muitas vezes têm sido conseguidas com níveis bem superiores (2 a 3% de arginina na ração) ao recomendado pelo NRC (1994) que é de 1,25% (KIDD, 2004). Os efeitos imunoestimulatórios são ainda mais expressivos em animais estressados ou imunossuprimidos. Segundo Abdukalykova e Ruiz-Feria (2006), níveis elevados de Arg podem ainda acelerar a produção de anticorpos em frangos de corte. Kidd et al., (2001) verificaram que níveis próximos ao recomendado (90 a 120% do NRC), apesar de elevar os níveis plasmáticos de

arginina, não melhoraram a resposta imune humoral e celular das aves ou o peso dos órgãos linfóides.

Tabela 06: Medidas histomorfométricas da bolsa de cloacal de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.

	Área Total			Área de tecido linfóide			% Tecido linfóide		
	D	ND	Média	D	ND	Média	D	ND	Média
	21 dias								
Controle	751,24	655,52	695,40	677,63	584,85	623,51	90,01	89,68	89,82
Nível AA 1	751,40	690,77	717,30	666,80	611	636,75	89,39	89,60	89,50
Nível AA 2	767,26	807,51	780,68	687,12	733,42	702,56	89,29	90,72	89,76
Média	757,70	701,78		678,21	628,04		89,51	89,88	
CV,%		17,14			18,20			3,85	
Interação		ns			ns			ns	
	28 dias								
Controle	798,19	1165,21	1060,34	879,34	1083,51	1046,39	86,56	91,44	90,55
Nível AA 1	856,67	943,82	894,15	711,08	836,09	767,90	85,82	89,05	87,29
Nível AA 2	915,73	978,29	940,75	782,35	979,25	810,48	85,93	83,56	85,61
Média	864,58	1067,60		765,66	994,09		85,97	90,12	
CV,%		27,22			26,91			5,41	
Interação		ns			ns			ns	

D: desafiados, ND: não desafiados. Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina.

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si pelo teste de Tukey; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Os resultados obtidos para contagem dos aglomerados linfóides estão dispostos na tabela 07. Não houve efeito significativo dos tratamentos na 1ª semana pós-infecção ($p < 0,05$). Aos 28 dias, houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as dietas e o desafio experimental. Para as aves não desafiadas não foi observada nenhuma diferença. Entretanto, para aves desafiadas houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos aglomerados linfóides. Este resultado pode ser correlacionado aos valores observados aos 28 dias, duas semanas pós-infecção para a IgA detectada na mucosa intestinal das aves desafiadas. A diminuição de IgA e aglomerados linfóides demonstraram uma resposta menos agressiva e portanto menos dispendiosa para o organismo, porém efetiva.

Em concordância, Fernandes et al., (2013) adicionaram Arg à dieta de frangos de corte e observaram que as aves que não receberam suplementação de Arg na dieta, apresentaram um maior número de aglomerados linfóides quando comparado as aves que receberam dietas suplementadas.

Existe relação direta entre o fígado e a bolsa cloacal. Nas aves, os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos envolvidos na resposta imunológica humoral, são produzidos no fígado do embrião, no saco vitelínico e na medula óssea na fase inicial da incubação. Após isso, migram para a bolsa cloacal e sofrem amadurecimento e diferenciação por até 10 semanas. Daí partem para colonizar outros órgãos, como o baço, e a glândula de Harder (BUTCHER & MILES, 2003).

Tabela 07: Contagem dos aglomerados linfóides do fígado de frangos recebendo dietas com adição de aminoácidos, desafiados ou não, em coleta aos 21 dias e 28 dias.

	21 dias		Média	28 dias		Média
	Desafiados	Não Desafiados		Desafiados	Não Desafiados	
Controle	2,55	1,28	2	0,11 ^{Bb}	0,88 ^{Aa}	0,47
Nível AA 1	1,25	0,33	0,76	1,13 ^{Aa}	1,33 ^{Aa}	1,21
Nível AA 2	1,33	1,12	1,24	0,66 ^{ABa}	0,25 ^{Aa}	0,47
Média	1,73	0,87		0,62	0,77	
CV,%		148,04			129,85	
Interação		ns			p<0,05	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina

Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha deferem entre si estatisticamente p<0,05; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si estatisticamente p<0,05.

Diversos autores verificaram relação entre o fornecimento de níveis superiores de aminoácidos e sua interação com a resposta imune. Kidd et al., (2002) verificaram redução da mortalidade em frangos desafiados com *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella*, e *Eimeria maxima*, quando as dietas estavam com a relação Arg:Lys de 1,3 comparado com as aves que receberam relação de 0,9 e 1,1. Rubin, et al., (2007) ao utilizarem níveis de arginina de 1,33 e 1,83% para 1 a 21 dias, e 1,14 e 1,64% para 22 a 42 dias, verificaram que os níveis utilizados não influenciaram na performance e resposta imune dos frangos de corte. Kidd et al., (1997) avaliaram a resposta humoral e celular em pintos alimentados com diferentes níveis de treonina na dieta (0,68 a 0,86) e não

verificaram melhora na imunidade. Por outro lado, Tayade et al., (2006a), mostraram que a suplementação de 2% de arginina na dieta aumentou a contagem de anticorpos e a proteção contra o Vírus da Doença Infecciosa da Bursa, e melhorou a resposta imune intestinal e sistêmica contra o vírus da bronquite infecciosa (TAYADE et al., 2006b).

Vários estudos já demonstraram o efeito imunomodulatório da associação de nutrientes, como Lisina e treonina (KIDD et al., 1997), arginina e vitamina E (ABDUKALYKOVA e RUIZ-FERIA, 2006), arginina e triptofano (EMADI et al., 2011), arginina e metionina (RUBIN, 2007). Esses experimentos demonstram a interrelação entre os aminoácidos suplementados sobre a resposta imune. Desta forma, os resultados obtidos neste experimento não podem ser atribuídos a um único aminoácido suplementado. Entretanto, mais estudos são necessários, visto a complexidade da interrelação dos aminoácidos e dos componentes da resposta imune celular e humoral.

Os resultados das análises bioquímicas da uréia e ácido úrico sérico estão demonstrados na Tabela 08. Não houve interação significativa entre os fatores analisados. Na análise do soro das aves na semana seguinte após o desafio (21 dias), verificou-se que os níveis de uréia sanguínea foram crescentes ($p < 0,05$) ao comparar as aves que não receberam a suplementação com as que receberam as dietas 1 e 2, respectivamente. Aos 28 dias, os níveis de uréia foram similares entre as duas dietas suplementadas, entretanto os valores foram maiores quando comparados à dieta controle. Estes níveis não foram influenciados ($p > 0,05$) pelo desafio experimental.

O aumento dos níveis de uréia associados à suplementação de Arg demonstra que houve síntese de Ornitina. A Arg em níveis elevados estimula a atividade da arginase que degrada Arg em ornitina e uréia. Cerca de 40 a 60% da uréia excretada pelas aves é resultado da síntese da ornitina (RUIZ-FARIA et al., 2001). A ornitina é precursora das poliaminas que, por sua vez, estão associadas com a divisão celular, síntese protéica e crescimento tecidual (SEILER, 1992 citado por GONZALEZ-ESQUERRA & LEESON, 2006).

Os níveis de ácido úrico não se alteraram apesar da suplementação com aminoácidos na 1ª semana pós-infecção (21 dias). Já aos 28 dias, os níveis de ácido úrico foram proporcionais à adição de aminoácidos às dietas. Neste período houve a mobilização dos aminoácidos para a resposta imune e o

excesso passou a ser excretado a partir da 2ª semana após o desafio. A maior parte dos aminoácidos é metabolizada no fígado e parte da NH_3 assim gerada é reciclada e empregada em uma grande variedade de processos biossintéticos, sendo o excesso excretado diretamente ou convertido em uréia ou ácido úrico (NELSON E COX, 2008). Por serem animais uricotélicos, as aves produzem o ácido úrico e o gasto para excretar ácido úrico é estimado em quase duas vezes mais do que utilizado na excreção de uréia (MAPES & KREBS, 1978 citados por KLASING, 1998).

O ácido úrico vem, recentemente, sendo considerado um importante antioxidante (HARE & JOHNSON, 2003), principalmente em situações de desafio infeccioso onde são produzidos níveis elevados de NO. O NO pode reagir com radicais livres e formar o peroxinitrito (ONOO-) que pode levar à injúria celular.

Tabela 08 – Concentrações séricas de uréia e ácido úrico de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental.

	Uréia, mg/dL			Ácido úrico, mg/dL		
	Desafiados	Não Desafiados	Média	Desafiados	Não Desafiados	Média
			21 dias			
Controle	6,650	6,510	6,580 ^C	1,450	1,490	1,470
Nível AA 1	10,290	9,400	9,845 ^B	1,640	1,330	1,485
Nível AA 2	14,170	12,560	13,365 ^A	1,578	1,510	1,542
Média	10,370	9,490		1,555	1,443	
CV, %		19,88			32,28	
Interação		ns			ns	
			28 dias			
Controle	11,400	9,667	10,482 ^B	4,500	5,489	5,024 ^B
Nível AA 1	11,610	12,280	11,945 ^{AB}	6,670	6,130	6,400 ^{AB}
Nível AA 2	14,570	13,130	13,850 ^A	8,650	8,110	8,380 ^A
Média	12,607	11,762		6,757	6,614	
CV, %		34,08			38,01	
Interação		ns			ns	

Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina. Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Os resultados referentes às provas de função hepática estão dispostos na Tabela 09. Não houve interação entre o desafio e a suplementação com os aminoácidos. Aos 21 dias, não houve efeito dos tratamentos sobre os níveis de albumina e Gama GT séricas. Para os níveis da enzima AST (Aspartato transaminase) foi observado diferença significativa entre as aves alimentadas

com a dieta controle, e as aves que receberam a suplementação em nível superior, que apresentaram maiores níveis de AST. Aos 28 dias foi verificada diferença ($p < 0,05$) nos níveis de AST, sendo que as aves que receberam os aminoácidos dos níveis 1 e 2 apresentaram maiores níveis de AST do que as aves controle. Para a enzima Gama GT, as aves que receberam a suplementação em nível intermediário, apresentaram os menores níveis do que as aves do controle.

A enzima AST faz parte de um grupo de enzimas que catalisam a interconversão dos aminoácidos e oxiaácidos por transferência do grupo amino (HOCHLEITHNER, 1994). Isso explica o fato de que, nas aves suplementadas com os aminoácidos, as concentrações séricas dessa enzima hepática foram maiores, pela maior taxa de metabolização dos aminoácidos ou ao efeito atribuído ao desequilíbrio entre aminoácidos (BUTTERY & D'MELLO, 1994).

Os valores médios dos níveis séricos das enzimas AST, encontram-se próximos aos observados por Gonçalves et al., (2014) ao utilizarem extrato de pimenta rosa em substituição a aditivos promotores de crescimento. E também por Borsa et al., (2006) que foram 202-325, e 9-17 UI/L aos 21 dias e 202-229, e 17-24 UI/L aos 42 dias para AST, e GGT, respectivamente para frangos de corte clinicamente saudáveis.

Tabela 09 – Concentrações séricas de Albumina, AST (Aspartato transaminase) e GGT (Gama glutamil transferase ou GAMA-GT), de frangos de corte suplementados com aminoácidos e submetidos ou não ao desafio entérico experimental

	Albumina, g/dL			AST, UI/L			Gama GT, UI/L		
	D	ND	Média	D	ND	Média	D	ND	Média
21 dias									
Controle	1,330	1,360	1,345	203,620	192,900	198,542 ^B	14,310	14,811	14,736
Nível AA1	1,300	1,290	1,295	239,930	202,756	222,321 ^{AB}	13,520	12,933	13,242
Nível AA2	1,233	1,290	1,263	233,833	234,378	234,106 ^A	13,856	13,070	13,442
Média	1,290	1,313		225,517	210,011		13,897	13,586	
CV, %		34,00			18,94			15,06	
Interação		ns			ns			ns	
28 dias									
Controle	1,350	1,250	1,300	208,313	217,763	213,038 ^B	8,400	6,125	7,263 ^A
Nível AA1	1,220	1,200	1,211	283,530	261,930	272,730 ^A	4,590	4,930	4,760 ^B
Nível AA2	1,322	1,290	1,305	311,960	312,870	312,415 ^A	5,390	7,190	6,290 ^{AB}
Média	1,293	1,248		272,193	267,504		5,964	6,079	
CV, %		12,96			22,94			49,41	
Interação		ns			ns			ns	

D: desafiados, ND: não desafiados. Nível AA 1: 1,5% de Aminogut + 1% de L-Arginina + 1% de L-Treonina. Nível AA 2: 3% de Aminogut + 2% de L-Arginina + 2% de L-Treonina

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

A disponibilidade de substratos é atualmente considerada a principal ferramenta na manutenção da estrutura e funcionalidade da barreira mucosa (SUCHNER et al., 2000). As potenciais atividades funcionais reguladoras dos aminoácidos devem ser incluídas na determinação das exigências nutricionais dos frangos de corte. Entretanto, os níveis ótimos que permitam a melhor expressão destas atividades ainda não são claros.

Melhorar a saúde dos animais é importante não somente sob o ponto de vista ético, mas para a segurança da alimentação humana e para a maior rentabilidade da cadeia avícola. Os transtornos metabólicos que acompanham um processo inflamatório redirecionam os nutrientes dos processos fisiológicos importantes para o crescimento. Por isso, o impacto de uma resposta inflamatória ou infecciosa sobre as necessidades da dieta devem ser consideradas. É evidente que o tipo de proteína sintetizada em resposta a uma enfermidade altera as necessidades de aminoácidos. Quais e quantos aminoácidos estão envolvidos? Muitos estudos ainda são necessários para responder esta questão.

CONCLUSÃO

A suplementação dietética de frangos de corte com arginina, glutamina e treonina em situação de desafio infeccioso influenciou o sistema imune, pela alteração nas medidas morfométricas do baço e timo. A adição de aminoácidos à dieta resultou na diminuição dos níveis de IgA como resultado de uma resposta imune humoral rápida e eficiente, além disso, levou ao aumento da concentração sérica de ácido úrico, uréia e também da enzima hepática AST, independente do desafio.

REFERÊNCIAS

- Abdukalykova S., Ruiz-fria C. 2006. Arginine and vitamin E improve the cellular and humoral immune response of broiler chickens. *Int J Poult Sci*, 5:121-127.
- Allen P. C., Fetterer, R. H. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev*. 15(1): 58-65.
- Austic R. E., Nesheim M. C. 1971. Arginine, ornithine and proline metabolism of chicks: Influence of diet and heredity. *J Nutr*. 101(10):1403-13.
- Bartell S. M., Batal A. B. 2007. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poult Sci* 86:1940-1947.
- Buttery, P. J., D'Mello, J. P. F. 1994. Amino acid metabolism in farm animals: an overview. Pag. 1-10. In: D'Mello, J. P. F. (Ed.). *Amino Acid in farm nutrition*. Wallingford: Cab International.
- Calder, P. C. 1995. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc.Nutr. Soc*. 54:65–82.
- Corzo, A, Kidd M .T., Dozier, W. A, Pharr G. T, Koutsos E. A. 2007. Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. *J Appl Poult Res*. 16:574-582.
- Dignass, A. D. 2001. Mechanisms and Modulation of Intestinal Epithelial Repair. *Inflamm Bowel Dis*. 7(1):68–77.
- Emadl, M., Jahanshiri, F., Kaveh, K. Hair-Bejo, M., Ideris, A., Alimon, A. R. 2011. Nutrition and immunity: the effects of the combination of arginine and tryptophan on growth performance, serum parameters and immune response in broiler chickens challenged with infectious bursal disease vaccine. *Avian Pathol*. 40(1):63-72.
- Fernandes, J. I. M.; Rosa D. D., Ribeiro M. V.; Lima, E. T., Fernandes N. L. M. 2011. Avaliação da arginina dietética sobre a resposta imunológica de frangos de corte imunizados contra a Doença de Gumboro. *Acta Sci Animal Sci. Maringá*. 33(2):151-155.
- Fernandes, J. I. M., Murakami, A. E., Souza, L. M. G., Ospina-Rojas, I.C.; Rossi, R. M. 2014. Effect of arginine supplementation of broiler breeder hens on progeny performance *Can. J. Anim. Sci*. 94: 1-9.
- Fu, W. J., T. E. Haynes, R. Kohli, J. Hu, W. Shi, T. E. Spencer, R. J. Carroll, C. J. Meininger, and G. Wu. 2005. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr*. 135:714–721.

Galha V., Bondan E. F., Lallo M. A. 2008. Relação entre imunossupressão e coccidiose clínica em frangos de corte criados comercialmente. Rev Inst Cienc. Saúde. 26(4):432-7.

Gardiner, K .R., Kirk, S. J., Rowlands, B. J. 1995. Novel substrates to maintain gut integrity. Nutr Res Review. 8:43-66.

Gonçalves, F. G., Zanini, S. F., de Sousa, D. R., Da Silva, M. A., Colnago, L. G. 2014. Sinergia entre aditivo vegetal e níveis crescentes de promotores de crescimento sobre o desempenho produtivo e morfometria intestinal de frangos de corte. Cienc. Rural, 44(2):340-345.

Gonzalez-Esquerra R. And Leeson S., 2006. Effect of arginine:lysine ratios and source of methionine on growth and body protein accretion in acutely and chronically heat-stressed broilers. Poult Sci 85:1594–1602.

Hare JM, Johnson RJ. Uric acid predicts clinical outcomes in heart failure: Insights regarding the role of xanthine oxidase and uric acid in disease pathophysiology. Circulation 2003; 107:1951–1953.

Hartman S, Taleb SA, Geng T, Gyenai K, Guan X, Smith E. Comparison of Plasma Uric Acid Levels in Five Varieties of the Domestic Turkey, *Meleagris gallopavo*. Poult Sci 2006; 85(10):1791–4.

Hill, A.G. y Hill, G.L. (1998) Metabolic response to severe injury. Br. J. Surg. 85: 884-890

Hochleithner, M,. 1994. Biochemisteris. In: Ritchie, B. W., Harrison, G. J., HArrison, L. R. Avian Medicine: principles and application, Florida: Wingers, p.229.

Ishibashi H, Higuchi N, Shimamura R, Hirata Y., Kudo J, Niho Y. 1991. Sonographic assessment and grading of spleen size. J of Clin Ultras.19:21–5.

Janini, D. S., Oliveira, I. R. S., Widman A., Ianhez, L. E., Cerri, G.G. 2003. Aspectos morfológicos e hemodinâmicos do baço em indivíduos normais: Estudo por Ultra-som Doppler. Radiol Bras. 36(4):213-218.

Kidd, M. T., Kerr, B. J. & Anthony, N. B. 1997. Dietary interactions between lysine and threonine in broilers. Poult Sci, 4:608-614

Kidd M. T., Peedles E. D., Whitmarsh S. K., Yeatman J. B., Wideman R. F. Jr. 2001. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. Poult Sci. 80:1535-1542.

Kidd, M. T., J. P. Thaxton, J. B. Yeatman, S. J. Barber, and W. S. Virden. 2002. Arginine responses in broilers: Live performance. Poult Sci 80 (Suppl.1):114. (Abstr.).

- Kidd M. T. 2004. Nutrition Modulation of Imunne Function in Broilers. *Poult Sci.* 83: 650- 657.
- Kisielinski, K., Willis, S., Prescer, A., Kloterhalfen, B., Schumpelick, V. A. 2002. Simple method to calculate small intestine absortive surface in the rat. *Clin. Exp. Med. Aachen, Germany.* 2:131-135.
- Lebow, B. I., Souba, W. W. 2000. Glutamine. *World J Surg.* 24:1503-1513.
- Lee, J. E., Austic, R. E., Naqi S. A., Golemboski K. A., Dietert R. R. 2002. Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. *Poult Sci,* 81:793-798.
- Lemme, A., 2001. Responses of Broilers to DietaryThreonine: A Survey of the International Literature.*Amino News* 02 (01):1-6, Degussa Corporation.
- Li, P., Yin, Y., Li, D., Kim, S. W. and Wu G. 2007. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 98:237-252.
- Mapes, J. P. & Krebs, H. A. (1978) *Biochem. J.* 172, 193-203
- Medina, M. A. 2001. Glutamine and cancer. *J Nutr* 131(9)2539S-2542S.
- Meijer A. J., Lamers W. H., and Chamuleau A. F. M. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews* 1990; 70(3):701–748.
- Montagne, L., Pluske, J. R., Hampson, D J. 2003. A review of interactions between dietary fibre and intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young no-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.,* 108:95-117.
- Montassier H. J. 2000. Enfermidades do sistema imune. Pág. 134-150. In: Berchieri Jr A, Macari M, editores Doenças das aves. Campinas: FACTA.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 5th ed. W. H. Freeman: New York, 1100.
- Nesheim, M. C. 1968. Kidney arginine activity and lysine tolerance in strains of chickens selected for a high or low requirement for arginine. *J Nutr,* 95:79-87.
- Newsholme, P., 2001. Whyis L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J. Nutr.* 131:2515S-2522S.
- NRC (National Research Council).*Nutrient Requirements of Poultry.* 9th Ed. National Academy Press: Washington D.C. 1994.
- Norup, L., Jensen, K. H., Jorgensen, E., Sorensen, P., Juul-Medsen, H. R. 2008. Effect of mild heat stress and mild infection pressure on immune responses to an E. coli infection in chickens. *J Anim Sci,* 2:265- 274.

Obled, C. 2004 Necessidades de aminoácidos em estados inflamatórios. Avances en tecnología porcina 1(3):4-20.

Reeds, P. J., Fjeld, C. R., Jahoor, F. 1994. Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? *J. Nutr.* 124: 906-910.

Robertis, E. M. F. de; HIB, J. 2001. Bases da biologia celular e molecular. Págs. 408. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Rubin, L. L., Canal C. W, Ribeiro A. M. L., Kessler, A., Silva I., Trevizan L., Viola T., Raber M., Gonçalves T. A., Krás R. 2007. Effect of methionine and arginine levels on the immunity of broiler chickens submitted to immunological stimuli. *Braz J Poult Sci.* 9(4):241-247.

Ruiz-Feria C. A., Kidd M. T., Widemann, R. F.. 2001. Plasma Levels of Arginine, Ornithine and Urea and Growth Performance of Broilers Fed Supplemental L-Arginine During Cool Temperature exposure. *Poult Sci* 80(3):358-69.

Ruff, M. D. 1999. Important parasites in poultry production systems. *Vet Paras.* 84:337-347.

Sakamoto, M. I., Murakami, A. E. Silveira, T. G. V., Fernandes, J. I. M., Oliveira C. A. L. de. 2006. Influence of Glutamine and Vitamin E on the Performance and the Immune Responses of Broiler Chickens. *Braz J Poult Sci.* 8(4):243-249. Dec.

Seiler, N. 1992 The role of polyamines in cell biology, in: *Chemistry of the Living Cell*. JAI Press, Greenwich, CT, USA

Sharma, J. M., 1997. The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet Hungarica.*,45: 229-238.

Smirnov, A., Sklan, D., Uni, Z. 2004. Mucin dynamics in the chick small intestines are altered by starvation. *J Nutr.* 134:736-742.

Soltan, M. A. 2009. Influence of Dietary Glutamine Supplementation on Growth Performance, Small Intestinal Morphology, Immune Response and Some Blood Parameters of Broiler Chickens. *Inter J Poult Sci* 8 (1): 60-68.

Suchner, U., K. S. Kuhn, et al. 2000. The scientific basis of immuno nutrition. *Proc Nutr Soc*, 59(4):553-63.

Sung, Y. J., Hotchkiss, J. H. Austic, R. E. Dietert, R. R. 1991. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *J Leukocyte Biol.* 50:49-56.

Tayade C, Jaiswal T. N., Mishra S. C., Koti M. 2006a. L-Arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease virus. *Vaccine*. 24(5):552–560.

Tayade C., Koti M, Mishra S. C. 2006b. L-Arginine stimulates intestinal intraepithelial lymphocyte functions and immune response in chickens orally immunized with live intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. *Vaccine*. 24:5473-5480.

Wang X., Qiao S. Y, Liu M & Ma Y. X. 2006. Effects of graded levels of true ileal digestible threonine on performance, serum parameters and immune function of 10-25kg pigs. *Anim Feed Sci Tech*, 129:264-2787.

Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li D., Yin Y., Wu G. 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr*.138:1025–32.

Wu G. and Morris S. M. Jr. 1998. Arginine Metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem. J*. 336:1-17.

Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R.; Turner, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134-489.

CONCLUSÕES GERAIS

Na formulação das dietas nas companhias avícolas, não é possível conhecer o status sanitário de cada granja, considerando o curto tempo de vida e a inviabilidade de uma nova formulação da dieta. Devido a isso, o uso preventivo de aminoácidos nas dietas além das exigências nutricionais, pode ser efetivo e ser uma alternativa ao uso de promotores de crescimento que estão sendo paulatinamente retirados das dietas.

Em situações de desafio sanitário e sem a suplementação dos aminoácidos arginina, treonina e glutamina, a conversão alimentar foi pior em relação às dietas suplementadas. Já para as aves suplementadas, observou-se melhor regeneração da mucosa intestinal, o que pode ter contribuído positivamente com a conversão alimentar. Houve alteração nas medidas morfométricas dos órgãos linfóides timo e baço, mostrando a interferência da suplementação dos aminoácidos sobre a resposta imune mediada por células.

A suplementação com os aminoácidos levou ao aumento da concentração sérica de ácido úrico, uréia e também da enzima hepática AST. O aumento da uréia demonstrou que houve a síntese da ornitina, que é precursora de poliaminas, que estão associadas a divisão celular e crescimento tecidual.

Há uma perspectiva otimista em relação ao uso de aminoácidos funcionais como ferramentas para o reestabelecimento do status sanitário dos frangos de corte. Entretanto, devem ser ajustados níveis adequados que não interfiram com o desempenho produtivo já que o excesso, além de representar desperdício, gera gasto calórico adicional relativo à excreção destes na forma de ácido úrico. A associação de níveis mais baixos a aditivos como os probióticos, óleos essenciais, extratos de plantas e enzimas podem trazer melhores resultados e manter um equilíbrio entre a regeneração da mucosa e o desempenho produtivo.