

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITOS DA METIONINA E DA ARGININA SOBRE A RESPOSTA IMUNE  
E O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

Lauricio Librelotto Rubin

PORTO ALEGRE  
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITOS DA METIONINA E DA ARGININA SOBRE A RESPOSTA IMUNE  
E O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Lauricio Librelotto Rubin

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de Medicina Veterinária  
Preventiva, especialidade Sanidade Avícola

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Co-orientadora: Andréa M. L. Ribeiro

PORTO ALEGRE  
2007

Lauricio Librelotto Rubin

EFEITOS DA METIONINA E DA ARGININA SOBRE A RESPOSTA IMUNE E O  
DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

Aprovada em 27 FEV 2007

APROVADO POR:

---

**Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal**

**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Alexandre Kessler**

**Membro da Comissão**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Paula Ravazzolo**

**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque**

**Membro da Comissão**

**“Morrer, mas morrer peleando,  
Jamais frouxar o garrão,  
Com a pampa no coração  
E as inquietudes por diante...”**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valdomir e Idalina, pelo exemplo de vida, amor e confiança. Aos meus irmãos Leandro, Cristiane, Leonardo e Cassiana, pelo carinho, aconchego e grande amizade. À Luise pelo companherismo, apoio e estímulo por todos esses anos.

Aos professores Cláudio Wageck Canal e Andréa Machado Leal Ribeiro, pela orientação, companherismo e amizade.

Aos meus colegas de mestrado e doutorado do laboratório de ensino zootécnico (LEZO) e do laboratório de virologia da UFRGS, pelo grande apoio, compreensão, ajuda, atenção, convívio e pela grande amizade firmada durante esses anos.

Aos funcionários, estagiários e bolsistas do LEZO e da virologia, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao LEZO pelo amparo.

E, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização de mais esta conquista.

## RESUMO

Nosso conhecimento de nutrição em avicultura é relativamente maduro, incluindo uma completa lista de exigência de nutrientes, o estabelecimento dos níveis mínimos de cada nutriente necessários para uma máxima produtividade e os níveis e a biodisponibilidade desses nutrientes, contidos nas matérias-primas utilizadas no fábriço das rações. No entanto, não sabemos se os níveis adequados de nutrientes para um ótimo crescimento, em animais saudáveis, são adequados para uma ótima resposta imune ou imunocompetência durante um desafio infeccioso.

Um dos mecanismos através dos quais a nutrição interfere na imunidade é a regulação pela disponibilidade de substrato, sendo estabelecido pelo fornecimento de nutrientes necessários para uma resposta imune. Um dos exemplos implicados nesse grupo são os aminoácidos e, dentre esses, a metionina e a arginina. A metionina é importante para a síntese protéica, para a formação de glutatona e poliaminas e é a principal fonte doadora de grupos metila para a formação do DNA. A arginina é importante para a produção de óxido nítrico nos macrófagos. O óxido nítrico tem ação bactericida, cumprindo importante papel na atividade citotóxica celular.

Este trabalho teve como objetivo verificar se níveis de metionina e arginina usualmente utilizados na indústria avícola influenciam a resposta imune de frangos de corte submetidos a estímulos imunológicos. O primeiro experimento avaliou a influência da metionina, expressa em aminoácidos sulfurados totais (AAS). Na fase inicial de criação (1 a 21 dias) foram utilizados 0,72; 0,82 e 0,92% de AAS e na fase final (22 a 42 dias) 0,65; 0,75 e 0,85% de AAS. Os estímulos empregados nesse experimento foram as vacinas comumente utilizadas na indústria avícola, *micobacterium avium* inativado e tuberculina aviária. Como resultado tivemos que os níveis de AAS testados não influenciaram a resposta imune. Porém, as vacinas realizadas prejudicaram o desempenho dos frangos até os 21 dias de idade. De 1 a 42 dias de criação, houve uma interação entre os estímulos e os níveis de AAS, onde o maior nível de AAS do grupo não estimulado mostrou melhor ganho de peso.

O segundo experimento avaliou a influência de diferentes níveis de metionina (0,31; 0,51 e 0,66% de 1 a 21 dias e 0,29; 0,49 e 0,64% de 22 a 42 dias de criação) e arginina (1,33 e 1,83% de 1 a 21 dias - 1,14 e 1,64% de 22 a 42 dias) sobre a resposta imune e sobre o desempenho de frangos de corte. O programa de estímulos foram vacinas comumente utilizadas na indústria avícola, eritrócito de carneiro a 10%, *micobacterium avium* inativado e tuberculina aviária. Como resultado desse experimento tivemos que os níveis de arginina testados não influenciaram o desempenho nem a resposta imune das aves, e em relação a metionina, não houve influência sobre a resposta imune humoral, mas o nível intermediário de metionina obteve melhor resposta celular. Além disso, as vacinas realizadas no primeiro dia prejudicaram o desempenho dos frangos até os 21 dias de idade.

Com base nos dois estudos é possível concluir que os níveis de metionina e arginina utilizados atualmente na nutrição de frangos de corte, podem ser adequados para atender a demanda do sistema imune. Em termos de desempenho, os níveis de metionina (AAS) utilizados na agroindústria, podem ser aumentados, aliados a um bom programa sanitário. Além disso pode-se observar que os programas de vacinação, embora necessários, certamente interferem negativamente no desempenho das aves.

**Palavras-chave:** metionina, arginina, resposta imune, nutrição, frangos de corte.

## ABSTRACT

Our knowledge of nutrition of poultry and livestock is relatively mature, including a very complete listing of the required nutrients, a quantitative accounting of the minimal level of each nutrient that is needed to maximize production characteristics, and the levels and bioavailabilities of the essential nutrients supplied by feedstuffs. However, it is not known if the requirement values that maximize productivity in healthy, unchallenged animals are optimal for immunocompetence and disease resistance.

The regulation by substrate availability (diet nutrients) is one of mechanisms through which nutrition interferes on immune response. Amino acids like methionine and arginine are two examples of this. Methionine is important for protein synthesis, glutathione and polyamines production and is the principal source of methyl groups to DNA formation. Arginine is important to nitric oxide production by macrophages. Nitric oxide has bactericidal action, playing an important role in cellular cytotoxic activity.

This study aims to evaluate the influence of supplementation at different methionine and arginine levels on performance and the immune response in broiler chickens immunologically stimulated. The first experiment evaluated methionine (as sulfur amino acids – SAA). In the initial phase (1 to 21 days) the levels tested were 0.72, 0.82 and 0.92% and in the final phase (22 to 42 days) the levels were 0.65, 0.75 and 0.85%. The stimulation program was constituted of vaccines routinely adopted in large-scale bird husbandry, inactivated *Mycobacterium avium* and avian tuberculin. As a result, SAA levels tested did not influence immune response. Yet, vaccines administered impaired bird performance upon the 21<sup>st</sup> day of age. In total, an interaction between immunological stimulation and SAA levels was observed, at which the greatest level of SAA in the non-stimulated group showed better weight gain.

The second experiment tested the influence of methionine levels (0.31, 0.51 and 0.66% in the initial phase and 0.29, 0.49 and 0.64% in the final phase) and arginine levels (1.33 and 1.83% in the initial phase and 1.14 and 1.64% in the final phase) on bird performance and immune response. The stimulation program was vaccines routinely adopted in large-scale bird husbandry, inactivated *Mycobacterium avium*, Sheep Red Blood Cells 10% (SRBC), and avian tuberculin. It was observed that arginine levels tested influenced neither bird performance nor immune response. For methionine, no effect was observed on humoral immune response, however the intermediate methionine level caused better immune cellular response. Moreover, the vaccines administered on the first day impaired bird performance upon the 21<sup>st</sup> day of age.

Based on these two experiments' results it's possible to conclude that methionine and arginine levels here tested which are similar to those used on current poultry nutrition could be adequate to attend immune system requirements. For performance, these practical levels of methionine could be increased if a good sanitation program is used. Moreover, it's possible to see that vaccination programs are necessary but certainly interfere on bird performance in a negative way.

**Keywords:** methionine; arginine; immune response; nutrition; broiler chickens.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	10
1 SISTEMA IMUNE .....	13
1.1 Resposta imune .....	15
1.1.1 Resposta imune inata .....	15
1.1.2 Resposta imune adquirida .....	16
1.2 NUTRIÇÃO E IMUNIDADE .....	18
1.3 ADITIVOS .....	21
1.3.1 Probióticos .....	22
1.3.2 Prebióticos .....	22
1.3.3 Ácidos orgânicos .....	23
1.3.4 Vitamina E .....	23
1.3.5 Vitamina A .....	24
1.3.6 Vitamina C .....	24
1.3.7 Zinco .....	24
1.3.8 Selênio .....	25
1.3.9 Cobre .....	25
1.3.10 Ferro .....	25
1.3.11 Aminoácidos .....	26
1.3.11.1 Aminoácidos sulfurados .....	27



1.3.11.2 Arginina .....	31
1.3.11.3 Outros aminoácidos .....	32
<b>CAPÍTULO 2: Influence of Methionine Levels in Diets of Broiler Chickens Submitted to Immunological Stress .....</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 3: Effect of Methionine and Arginine Levels on the Immunity of Broiler Chickens Submitted to Immunological Stimuli .....</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE: Changes in body, carcass and liver weights during inflammatory response in broiler chickens .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>
<i>Curriculum Vitae</i> resumido .....	90

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

É preciso concordar com o ex-ministro da Fazenda Maílson da Nóbrega quando ele diz, em livro publicado recentemente, que “O Futuro Chegou” (NÓBREGA, 2005). De fato, ao menos nos domínios da agropecuária, o futuro pode ser entendido como já sendo o dia de hoje. Uma visão global do momento histórico vivido pelo agronegócio nacional mostra a veracidade desta assertiva por tornar mais clara a percepção do extraordinário avanço do setor agropecuário para economia brasileira. O Brasil é hoje o maior exportador mundial de carne de frango, o primeiro em carne de bovinos e o quarto do mundo em exportação de suínos. A produção de carnes do Brasil alcançou a marca de 21,7 milhões de toneladas em 2006, sendo esse volume composto por 44,85% de carne de frango, 42,57% de carne bovina e 12,58% de carne suína (AGÊNCIA BRASIL, 2007). Em 2006, as exportações brasileiras de carne de frango, considerando apenas o produto *in natura*, somaram 2,585 milhões de toneladas e geraram receita total de US\$ 2,922 bilhões, valores que representam um recuo de 6,38% no volume e de 12,08% na receita, em relação a 2005 (AVISITE, 2007b).

Não podemos esquecer que de quarto principal produto básico exportado pelo Brasil em 2005, no ano passado (2006) a carne de frango caiu para a sexta posição, uma situação determinada não só pela queda de 12% na receita do produto, mas também pelo melhor desempenho da carne bovina e do café em grão. Com a crise de demanda no mercado externo e a redução dos embarques, a receita proporcionada pela carne de frango *in natura* retrocedeu de US\$3,324 bilhões em 2005 para US\$2,922 bilhões em 2006. Com isso, a participação do produto na pauta brasileira de exportações apresentou retrocesso de 7,5%, caindo de 2,8% para 2,1% (Tabela 1) (AVISITE, 2007a).

A gripe aviária e a febre aftosa são apontadas como as causas principais da diminuição das exportações de frango do Brasil, no ano de 2006. Uma menor venda de carne de frango ocorreu mesmo sem registro de gripe aviária em nosso País. O problema é que com o temor de uma pandemia, o mercado de frango diminuiu em todo o mundo, tendo conseqüências sobre a participação brasileira no mercado internacional. Algumas estimativas apontam para algo em torno de 20% de redução no consumo

mundial. Os consumidores asiáticos, do Oriente Médio e europeus foram os que mais retraíram o consumo (IBGE, 2007). Mesmo com a crise, no ano de 2006, o campo tornou-se responsável pela geração de cerca de 2,8% do PIB nacional, empregando aproximadamente 3,7% da população economicamente ativa de nosso país (BCB, 2007).

Tabela 1 – Exportação brasileira de produtos básicos, receita anual em 2005 e 2006 (milhões de dólares).

POSIÇÃO	PRODUTO	2005	2006	VAR.	PARTICIPAÇÃO	
					2005	2006
1 (1)*	Minério de ferro	7.297	8.949	22,64%	6,2 %	6,5%
2 (3)	Petróleo bruto	4.164	6.894	65,56%	3,5%	5,0%
3 (2)	Soja em grão	5.345	5.664	5,97%	4,5%	4,1%
4 (7)	Carne bovina	2.419	3.134	29,56%	2,0%	2,3%
5 (6)	Café em grão	2.516	2.926	16,38%	2,1%	2,1%
<b>6 (4)</b>	<b>Carne de frango</b>	<b>3.324</b>	<b>2.922</b>	<b>-12,09%</b>	<b>2,8%</b>	<b>2,1%</b>
7 (5)	Farelo de soja	2.865	2.420	-15,53%	2,4%	1,8%
8 (8)	Fumo em folhas	1.660	1.694	2,05%	1,4%	1,2%
9 (9)	Carne suína	1.123	990	-11,84%	0,9%	0,7%
10 (-)	Minério de cobre	299	520	73,91%	0,3%	0,4%
	Sub-total	31.012	36.115	16,45%	26,1%	26,2%
	Demas Básicos	3.709	4.157	12,08%	3,2%	3,1%
	<b>TOTAL BÁSICOS</b>	<b>34.721</b>	<b>40.272</b>	<b>15,99%</b>	<b>29,3%</b>	<b>29,3%</b>
	<b>TOTAL GERAL</b>	<b>118.308</b>	<b>137.471</b>	<b>16,20%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

Fonte: SECEX/MDIC

Elaboração e análise: AVISITE

\*Os números entre parênteses indicam a posição do produto em 2005.

É inquestionável que para chegar ao que o Brasil é hoje, a pecuária brasileira teve de fazer uso de modernas tecnologias ligadas a aperfeiçoamentos significativos introduzidos na seleção genética, na nutrição, no manejo e no controle adequado de doenças. Por exemplo, a indústria avícola trabalha hoje com custos de produção inferiores a sessenta centavos de dólar para obtenção de um quilo de carne, valores estes inimagináveis há 10 anos atrás. Isto mostra que a agropecuária praticada no Brasil atingiu níveis tecnológicos e de competitividade muito superiores aos de outros países, em especial dos europeus (PALERMO-NETO, 2006). Mas essa competitividade vem sendo encarada como uma ameaça no que tange a questão comercial, principalmente pelos países europeus, que tornam cada vez mais difícil a entrada de nossos produtos. Atualmente, a “bola da vez” são os antibióticos promotores de crescimento (APCs). Como diz Desouzart (2005) sobre a exportação de carnes do Brasil: “nossa exportação é vista com admiração por poucos, reserva por alguns, preocupação por muitos e, como um mal a ser contido e extirpado pelos protecionistas de plantão”. O que parece certo é

que, em 2007, uma nova realidade estará presente, não só para europeus, mas para toda a produção avícola que deseja ingressar naquele mercado. O princípio da equivalência fará com que os países exportadores criem frangos nas mesmas condições da Europa (NORDESTE RURAL, 2007).

A nutrição vem acompanhando de maneira eficiente as mudanças ocorridas na avicultura nacional. Segundo Rostagno et al. (1999) as primeiras rações da década de 20 eram deficientes em vários nutrientes e proporcionavam um baixo desempenho dos animais. Os primeiros nutrientes a serem identificados como "causadores" do baixo desempenho dos animais, pela sua deficiência, foram as vitaminas e os minerais. No início da formulação de rações, estas não eram deficientes em riboflavina e tinham excesso de cálcio e fósforo, pela inclusão de altos níveis de produtos de origem animal. Um fato importante foi a descoberta da deficiência de manganês, responsável pela perose das aves, adotando-se a inclusão de sulfato de manganês na década de 40. Foi detectada, também, a deficiência de vitamina E, causadora da encefalomalácia; entretanto, com o aumento da utilização do farelo de soja nas rações, esta deficiência foi suprida.

Nos anos 50, a utilização de gorduras e/ou óleos nas rações, estimulou os estudos sobre antioxidantes para prevenir a rancificação e também a ocorrência de encefalomalácia. Os suplementos de microminerais só foram adicionados às rações no final da década de 50, dando início aos suplementos completos (vitamínicos e minerais) como parte das rações de aves e suínos. A fabricação comercial de suplementos vitamínicos e minerais e a disponibilidade dos aminoácidos sintéticos (lisina e metionina, por exemplo), permitiram a elaboração de rações simples à base de milho e farelo de soja, o que resultou em ganhos ótimos. Após a adoção dessa tecnologia, foi possível evoluir para a utilização de alimentos alternativos, com o objetivo principal de reduzir custos, sem comprometer o desempenho animal.

A moderna avicultura de hoje caracteriza-se pela intensificação dos processos de criação, pelo aumento no volume de produção e pela demanda de maximização da eficiência técnico-econômica do investimento. Na medida em que se concretizou essa tendência da atividade avícola pela intensificação e pelo crescimento em escala, fez-se necessário o desenvolvimento e a aplicação de técnicas que combatessem com eficácia o crescente desafio sanitário que invariavelmente acompanha os modelos de produção animal intensiva. Fatores ambientais, tais como condições térmicas, manejo nutricional e padrão sanitário definem qual a proporção do potencial genético que os animais

podem efetivamente expressar. Dentre essas variáveis não genéticas, o padrão sanitário é uma das mais decisivas para a otimização do desempenho zootécnico alcançado com um determinado genótipo. Com isso, na ocorrência de doenças infecciosas, os processos inflamatórios desencadeados podem resultar em uma diminuição no ganho de peso e na eficiência alimentar.

Interação entre a nutrição e a imunidade é particularmente importante para o crescimento e para a produtividade animal. A nutrição pode modular quantitativamente e qualitativamente aspectos da resposta imune contra patógenos. Respostas do sistema imune contra patógenos influencia a homeostase metabólica e as necessidades nutricionais do frango, mas pouca atenção tem sido dada a esse mecanismo ou a sua significância prática. Fatores relatados como a genética, a frequência de exposição a patógenos e a eficácia do programa de vacinação são predominantemente importantes na incidência de doenças infecciosas em lotes de frangos de corte. Entretanto, características da dieta podem modular a susceptibilidade da ave contra desafios infecciosos. Essa susceptibilidade pode ser subdividido em dois componentes: resistência e resiliência. A resistência refere-se a capacidade de uma variedade de sistemas anatômicos e fisiológicos, incluindo o sistema imune, de excluir o patógeno. Resiliência refere-se a capacidade da ave de manter a produtividade (ganho de peso, eficiência alimentar, produção de ovos, etc) durante um desafio infeccioso. A função da nutrição em maximizar a resiliência, há pouco tempo tem despertado o interesse dos pesquisadores ligados a avicultura (MACHADO & FONTES, 2003).

## 1 SISTEMA IMUNE

Muito do conhecimento do sistema imune das aves deriva do estudo em galinhas (*Gallus gallus domesticus*). Existem muitas similaridades entre o mecanismo geral da imunidade de aves e mamíferos, mas existem também importantes diferenças.

A imunidade em aves, como em mamíferos, é desenvolvida através do sistema linfóide. Este é constituído de vários órgãos linfóides, tecido linfóide periférico e vasos linfáticos. Dependendo da característica funcional, os órgãos linfóides são classificados em primários e secundários. Os primários são o timo e a bolsa de Fabricius (GLICK et al., 1956). A principal função desses órgãos é promover ideal condição para a maturação dos linfócitos. Os secundários são o baço, a glândula pineal e os nódulos linfóides. Dentro desses também são incluídos os tecidos linfóides periféricos, que são: a glândula de Harder, o divertículo de Meckel, as tonsilas cecais e as placas de Peyer.

O timo está situado de cada lado do pescoço, próximo a veia jugular e o nervo vago. É um órgão multilobulado e cada lóbulo consiste de um córtex externo e de uma medula interna. O córtex contém uma quantidade maior de linfócitos que a medula. O timo é visível em aves jovens, diminuindo de tamanho com o aumento da idade, podendo até ser ausente em aves velhas. O timo é o principal local de maturação das células T.

A bolsa de Fabricius tem uma importante função na imunidade das aves e está localizada na posição dorso-distal da região sacral, no final da cloaca. Na bolsa, 90% dos linfócitos são células B. A involução da bolsa parece começar concomitantemente com a maturação sexual da ave, que ocorre por volta da 20ª semana de idade. A bolsa tem por função controlar a maturação dos linfócitos B, e também é responsável pela mudança de classe das imunoglobulinas, de IgM para IgY (LARSSON & CARLANDER, 2002).

O baço é um órgão linfóide secundário, e está localizado na junção do proventrículo e moela. No baço, as células B são localizadas na polpa branca e o número de linfócitos T e B no baço tem uma proporção aproximada de 50:50 (GLICK, 1979). O baço é o sítio principal da resposta imune aos antígenos originários do sangue, e é também um importante “filtro” para o sangue, onde os macrófagos da polpa vermelha depuram do sangue as substâncias estranhas indesejáveis, mesmo na ausência de imunidade específica (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Os tecidos linfóides periféricos são compostos pela glândula de Harder, tonsilas cecais, divertículo de Meckel e as placas de Peyer. A glândula de Harder, situada na órbita do olho, é um local de produção de anticorpos. Os anticorpos locais, produzidos ali, são excretados através de fendas promovendo uma imunidade local (BANG & BANG, 1968). As tonsilas cecais se constituem na massa de tecido linfóide mais concentrada do intestino, sendo compostas de duas áreas ovais situadas nas paredes do ceco (PAYNE & POWELL, 1984). O divertículo de Meckel é outra estrutura anatomo-histológica linfóide no trato intestinal das galinhas. O afluxo de células linfóides ao divertículo de Meckel se inicia com cerca de duas semanas de idade, evoluindo para a formação de centros germinativos com cinco a sete semanas de idade, os quais mantêm suas funções até cerca de 20 semanas de idade. São encontrados nesse órgão grande quantidade de plasmócitos desenvolvidos a partir de linfócitos B, que sofreram estímulo antigênico, semelhantemente ao que ocorre na glândula de Harder (OLAH et al., 1984).

As placas de Peyer (PP) são agregados linfóides presentes no intestino, contendo

células com micro-pregas (células M), folículos linfóides, uma zona B-dependente e uma zona T-dependente. Nas galinhas, as PP estão localizadas na porção mais distal do íleo e a maior parte dos linfócitos B das PP expressam em sua superfície IgY (IgG) e alguns IgM e IgA (BURNS, 1982).

### 1.1 Resposta imune

A resposta imune pode ser dividida em duas partes: uma não específica (inata) e outra específica (adquirida).

#### 1.1.1 Resposta imune inata

O sistema imune inato consiste de diversas partes. A via mais simples de se evitar uma infecção é prevenir com que o microrganismo ganhe acesso ao corpo. Para isso, a pele e as mucosas proporcionam a primeira barreira para a maioria dos agentes infecciosos, quando intacta. O baixo pH no proventrículo (estômago) também tem uma função protetora. A flora bacteriana normal tem uma importante função protetora por suprimir o crescimento de muitas bactérias potencialmente patogênicas, competindo por nutrientes essenciais ou produzindo substâncias inibitórias. Se a primeira linha de defesa é penetrada, o microrganismo pode ser neutralizado por células fagocíticas tais como, heterófilos (neutrófilos dos mamíferos) e macrófagos. Essas células fagocíticas removem e destroem o material estranho (LARSSON & CARLANDER, 2002).

Os microrganismos também podem disparar a ativação do sistema complemento, resultando na lise e morte celular.

Seguindo a infecção, a concentração de diversas proteínas no plasma são alteradas substancialmente, tanto em aves como nos mamíferos. Essa resposta característica é chamada de resposta de fase aguda, e pode ser observada em diversas situações que envolvem uma resposta inflamatória, incluindo trauma, injúrias e infecções (LARSSON & CARLANDER, 2002).

As células matadoras naturais (NK) são células brancas do sangue e também estão envolvidas no sistema imune inato. As células NK seletivamente identificam e matam células infectadas por vírus e células tumorais, e não necessitam prévia exposição ao antígeno para reconhecimento do alvo (GOBEL et al., 1996; TELFER & ROTHENBERG, 2001). Diferente das células T citotóxicas, as células NK não são restritas ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (LINEAR & PHILLIPS, 1992). A atividade das NK tem sido associada com resistência contra doenças virais

neoplásicas (HELLER & SCHAT, 1987). Em frangos jovens (menos que quatro semanas), a atividade das células NK parece ser muito baixa, mas é detectável em frangos mais velhos e poedeiras (JEURISSEN et al., 2000).

Outro componente importante da imunidade inata da ave é o sistema monócito-macrófago. Os macrófagos são uma parte importante da defesa imune inata, agindo imediatamente quando um microrganismo entra no corpo, limitando assim o crescimento do patógeno (QURESHI et al., 2000). O macrófago é também uma célula efetora da resposta imune adquirida. Os macrófagos possuem funções microbicidas, tumorílicas e fagocíticas, e também atuam como células regulatórias por produzir citocinas e outros metabólitos. Os macrófagos originam-se da medula óssea e diferenciam-se em monoblastos, pró-monócitos e monócitos. Os monócitos são as células fagocíticas em maior número no sangue das aves, enquanto nos tecidos, os macrófagos estão presentes em quase todos os órgãos. Tanto os frangos como os perus possuem os macrófagos funcionalmente ativos quando eclodem (JEURISSEN & JANSE, 1989). A capacidade do macrófago em matar bactérias, vírus e parasitas varia dependendo do patógeno (QURESHI et al., 2000).

Os mecanismos não específicos respondem rapidamente contra um invasor estranho, mas não têm a habilidade de responder com uma maior força numa exposição repetida do mesmo imunógeno. Se o sistema imune inato não for capaz de prevenir o acesso ou destruir o microrganismo invasor, a imunidade adquirida é desencadeada.

### 1.1.2 Resposta imune adquirida

Existem dois tipos de imunidade adquirida em mamíferos e aves: a resposta imune humoral adaptativa e a imunidade celular. A imunidade adquirida específica depende da habilidade em reconhecer a molécula estranha, responder contra ela, produzir células linfóides de memória e em caso de uma futura exposição, desencadear uma resposta imune específica. O sistema imune específico funciona através de dois mecanismos que interagem, a resposta imune humoral e a resposta imune celular.

A resposta humoral envolve a interação da célula B com um antígeno e a subsequente proliferação e diferenciação em células secretoras de anticorpos (plasmócitos), com ou sem a ajuda das células T auxiliares (Th), dependendo do antígeno. Por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS) é um antígeno T independente, ou seja, não depende das células Th2 para desencadear a produção de anticorpos. Em aves os anticorpos são classificados dentro de três principais grupos: IgA, IgM e IgY (IgG).



A resposta de células B para antígenos dependentes de células T, requer que a célula Th2 reconheça o antígeno processado combinado com o MHC classe II na superfície da célula (LARSSON & CARLANDER, 2002). O MHC de galinha contém três grupos de genes, B-F, B-L e B-G, que codificam as glicoproteínas da superfície celular de classe I, classe II e classe IV, respectivamente (PINK et al., 1977). As glicoproteínas de classe I e II são similares a dos mamíferos em sua estrutura, função e distribuição nos tecidos (GUILLEMOT & AUFRAY, 1989) e apresentam antígenos aos linfócitos T. A de classe IV é expressa primariamente nos eritrócitos, mas também pode ser detectada na células do epitélio intestinal (MILLER et al., 1990).

A maioria dos estudos de Ig aviária tem sido feita com galinhas. Existem três classes principais de Ig nas aves: IgA, IgM e IgY (IgG), homologas às Ig dos mamíferos (WARR et al., 1995). Bienenstock et al. (1973) estudaram a síntese de Ig nos tecidos das galinhas e demonstraram que a IgA é produzida predominantemente no intestino e principalmente no duodeno das galinhas. Nas tonsilas cecais, foram encontrados maiores quantidades de células que secretam IgY seguidos de IgM e poucas células que secretam IgA. O baço também mostrou a mesma distribuição de Igs das tonsilas cecais. O timo mostrou IgY sem nenhum IgA. A bolsa de Fabricius mostrou IgY e IgM e a glândula de Harder mostrou IgY e IgM, semelhante à bolsa.

A IgY é geralmente chamada de IgG das galinhas porque é principal anticorpo no soro das galinhas e é transferido da matriz para o pinto (embrião). Entretanto, o termo IgG das galinhas tem sido questionado e IgY é sugerido como o nome mais apropriado (LESLIE & CLEM, 1969). A razão para isso é que a IgY tem um maior peso molecular e um menor ponto isoelétrico que a IgG dos mamíferos. Também, não existe similaridade imunológica entre a IgY e a IgG, e a sequência de DNA da IgY das galinhas assemelha-se mais com a IgE do que com a IgG dos humanos. Aves e mamíferos estão filogeneticamente muito distantes e a IgY é provavelmente o ancestral (antepassado) evolucionário da IgG e da IgE dos mamíferos (WARR et al., 1995). Como as Igs dos mamíferos, a IgY possui 2 cadeias leves e 2 cadeias pesadas, contendo um peso molecular de aproximadamente 180 kD (LARSSON et al., 1993). No lugar da região da dobradiça da IgG dos mamíferos, a IgY possui uma sequência mais rígida, dando à IgY uma flexibilidade limitada, afetando sua capacidade de precipitar ou aglutinar antígenos. A IgY medeia as reações anafiláticas, uma função que é atribuída à IgE em mamíferos (FAITH & CLEM, 1973). Similar a IgG, a IgY é o mais importante anticorpo na defesa contra uma infecção sistêmica e é responsável pela proteção da

prole.

A resposta imune celular envolve a interação de receptores das células T (TCR) e o antígeno processado. Os linfócitos T, ao contrário dos linfócitos B, são incapazes de ligar-se aos antígenos na forma original, somente através de seus receptores de membrana. Existem duas rotas principais da imunidade celular. A primeira é a reação do linfócito T auxiliar (Th- CD4<sup>+</sup>) com o antígeno englobado e processado pelas células apresentadoras de antígeno (APC), as quais podem ser macrófagos, células dendríticas, células do endotélio vascular, enterócitos e linfócitos B, que apresentam o antígeno ao linfócito Th. A secreção de linfocinas pelas células Th ativadas, atraem macrófagos para o sítio da reação, fagocitando o antígeno. As células Th reconhecem os antígenos específicos em associação à molécula de classe II do MHC (LUHTALA et al., 1993). A segunda rota é a interação da célula T citotóxica (Tc-CD8<sup>+</sup>) com o antígeno processado e apresentado por um MHC classe I na superfície de uma célula. Essa reação leva à lise celular (ARSTILA et al., 1994).

## 2 NUTRIÇÃO E IMUNIDADE

A resposta inata é responsável pela proteção imediata e a adaptativa pela proteção duradoura do hospedeiro. A inata tem moléculas pré-formadas e células que são efetivas no combate inicial da infecção. Na primeira exposição ao patógeno, a resposta imune adaptativa requer proliferação de linfócitos durante vários dias antes de contribuir significativamente na proteção do hospedeiro. Estimulação de uma resposta imune inata resulta na liberação de citocinas que coordenam a inflamação e a imunidade adaptativa. Entretanto essas citocinas não atuam exclusivamente no sistema imune, mas também atuam no gerenciamento endócrino para modular a homeostase metabólica de todo o animal (KOUTSOS & KLASING, 2001).

Altos níveis de desafio infeccioso em ambiente de baixa condição sanitária resulta em constante ativação da resposta inflamatória, incluindo a resposta de fase aguda (APR). APR é caracterizada pela diminuição do apetite, aumento da taxa metabólica basal, aumento da degradação do músculo esquelético e aumento da síntese hepática de proteínas de fase aguda (KLASING & KORVER, 1997). Essas mudanças metabólicas associadas com a APR são mediadas pelas citocinas: interleucina-1 (IL-1) , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o hormônio glicocorticóide (KLASING et al., 1987). Esses fatores regulatórios produzidos pelo sistema imune tem efeito sistêmico alterando o partilhamento dos nutrientes associados com os processos de crescimento e

resposta imune (KLASING & KORVER, 1997).

A nível genético, a taxa de crescimento é inversamente proporcional ao nível de imunidade adaptativa (PARMENTIER et al., 1996). Em geral, elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) pelos macrófagos prejudica o crescimento. Existe uma clara relação antagônica entre os processos fisiológicos da imunidade e do crescimento. O impacto mais importante de um desafio infeccioso no crescimento é o declínio no consumo de alimento. Em frangos de corte, ao redor de 70% da redução da taxa de crescimento que ocorre durante a resposta inflamatória pode ser atribuída à diminuição no consumo de alimento e os restantes 30% são devido a redução da eficiência no metabolismo e absorção dos nutrientes (KLASING et al., 1987). Essa ineficiência metabólica associada com um desafio infeccioso pode ser devido às citocinas pró-inflamatórias. Em aves, a IL-1 mostrou prejudicar o crescimento, mas as outras ainda não foram testadas (HUMPHREY & KLASING, 2004).

As citocinas também desencadeiam a liberação de hormônios que induzem uma resposta endócrina. Por exemplo, linfócitos T ou macrófagos estimulados liberam citocinas que irão agir sobre o eixo hipotálamo-hipófise liberando ACTH (hormônio Adenocorticotrófico), o qual aumenta a liberação de glicocorticóide da adrenal. O glicocorticóide age sobre a musculatura esquelética (proteólise) liberando aminoácidos tanto para a gliconeogênese como para a síntese de proteínas de fase aguda, afetando o metabolismo de nutrientes e o crescimento (KLASING & KORVER, 1997).

O efeito da ativação do sistema imune no perfil hormonal do animal reduz efetivamente a taxa de crescimento e o desempenho reprodutivo (McCANN et al., 1998). Por exemplo, quando receptores específicos para o TNF- $\alpha$  do cérebro das aves são ativados, a liberação de hormônios como GHRH (hormônio de liberação do hormônio de crescimento) e TRH (hormônio de liberação da tireotropina) é significativamente reduzida, reduzindo assim, a taxa metabólica e o crescimento (ELSASSER et al., 1997)

Substratos (aminoácidos, enzimas, etc) são necessários para suportar a proliferação clonal de linfócitos dirigida ao antígeno, o recrutamento de novos monócitos e heterófilos da medula óssea, a síntese de moléculas efetoras (imunoglobulinas, óxido nítrico, lisozima, complemento, etc) e moléculas mediadoras (eicosanóides e citocinas, por exemplo). O custo nutricional de manutenção do sistema imune e o custo adicional de uma vigorosa resposta imune contra um desafio não é

conhecido para as diferentes espécies. Uma estimativa grosseira do tamanho do sistema imune pode ser obtido pela soma do número de leucócitos do corpo da ave. Esse cálculo revela que por volta de 0,42% do corpo é feito de leucócitos e seus progenitores (KLASING, 1998). O total de anticorpos encontrados no sangue contribue com menos que 0,10% do peso do corpo de um frango (LEBACQ-VERHEYDEN et al., 1974; LERNER et al., 1971).

Muitas células do sistema imune são de vida longa (meia vida de semanas a meses), incluindo as células dendríticas, os macrófagos e linfócitos. Outras células, por outro lado, têm vida curta, tais como os heterófilos, com meia vida de somente alguns poucos dias, e os linfócitos encontrados no timo, bursa e centros germinativos, os quais sofrem apoptose após divisão celular. As taxas normais de síntese de imunoglobulinas (Ig) em frangos jovens são menores que 0,02% do peso do corpo/dia. A taxa de síntese de Ig específicas aumentam drasticamente durante um desafio infeccioso, enquanto a taxa de síntese de Ig totais aumentam moderadamente. Com essas quantificações em mente, a quantidade aparente de substrato (nutrientes) necessários para suprir o sistema imune é muito menor comparados com as necessidades para o crescimento ou para a produção de ovos (KLASING, 1998). Por exemplo, o peso de novos leucócitos e Igs normalmente produzidas cada dia (por volta de 800 mg/kg de peso vivo) parecem ser menos que 1% do aumento total do peso do corpo de frangos de corte de 2 semanas de idade e menos que 10% da quantidade de proteína muscular sintetizada por dia no músculo do peito (KLASING, 1998). Klasing & Calvert (1999) verificaram o consumo de lisina em frangos de corte desafiados com LPS comparados com controles. No grupo controle, a manutenção do sistema imune utilizou 1,2% da lisina consumida, divididos entre a leucopoiese (41%) e a síntese de imunoglobulinas (59%). Já, no grupo desafiado, 6,7% da lisina consumida foi utilizada para manter a resposta imune, e a maior parte deste percentual (ao redor de 70%), foi utilizada para a síntese de proteínas de fase aguda.

Durante uma resposta de fase aguda, perda de proteína, retardo no crescimento e anorexia são observados em humanos e animais (BREUILLE et al., 1999; VOISIN et al., 1996). A perda de proteína do corpo ocorre principalmente no músculo por uma combinação de acentuada proteólise e diminuição da síntese proteica (BARACOS, 2000; BREUILLE et al., 1998). Aminoácidos liberados do músculo são utilizados para a síntese de proteínas de fase aguda, defesa contra estresse oxidativo e ativação do sistema imune (REEDS & JAHOOR, 2001). Ativação do sistema imune induz um

marcado aumento na síntese proteica do baço (BREUILLE et al., 1998), bursa (KLASING & AUSTIC, 1984), linfócitos (PAPET et al., 2002) e o fígado (BREUILLE et al., 1998; KLASING & AUSTIC, 1984) em particular, com as proteínas de fase aguda (BREUILLE et al., 1998; VARY & KIMBALL, 1992). Breuille et al. (1994) indicaram, em ratos, que a contribuição do fígado na síntese total de proteínas do corpo aumentou de 15 para 33% durante um quadro séptico, sugerindo um maior requerimento de aminoácidos para o fígado durante uma infecção.

Tem sido sugerido que os requerimentos de certos aminoácidos são aumentados durante uma infecção. Entre eles estão os aminoácidos aromáticos (REEDS et al., 1994), a cisteína, a glicina e a serina (GRIMBLE, 1989; GRIMBLE et al., 1992). Entretanto, pouco sucesso tem sido observado com a suplementação de aminoácidos, como método para atenuar o catabolismo protéico durante uma resposta de fase aguda, especialmente em frangos (KLASING & BARNES, 1988; TAKAHASHI et al., 1997; WEBEL et al., 1998a,b). Claramente, a resposta de fase aguda é um processo tanto liberador (catabolismo do músculo esquelético), quanto consumidor de nutrientes (síntese de proteínas de fase aguda, febre). Devido ao marcado aumento na demanda hepática de aminoácidos para suportar a gliconeogênese e a síntese de proteínas de fase aguda, provavelmente o custo de aminoácidos de uma resposta de fase aguda seja maior que as relativas necessidades dos leucócitos que respondem a um desafio infeccioso. Por outro lado, é sabido que para diversos nutrientes tais como zinco, ferro, cobre e lisina, as quantidades liberadas (principalmente do músculo) são suficientes para manter as necessidades de ambas, resposta de fase aguda e resposta imune, durante um desafio (KLASING & BARNES, 1988; LAURIN & KLASING, 1987; KOH et al., 1996).

### 3 ADITIVOS

No campo dos aditivos, durante os últimos anos, estamos assistindo a proliferação de produtos de diversas origens, cujo objetivo está em proporcionar ao animal, seja de forma exógena, seja estimulando suas próprias defesas, um estado de saúde para diminuir cada vez mais o uso de antimicrobianos. A preocupação mundial com a ocorrência de resistência bacteriana e a conseqüente proibição do uso dos antibióticos promotores de crescimento (APC) na alimentação animal levaram a uma busca por aditivos que possam substituir os antibióticos na produção de aves em todo o mundo. Entre estes compostos estão os prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos, enzimas, alguns nutrientes utilizados e conhecidos na alimentação animal, porém usados em

níveis mais elevados que os estritamente nutricionais, como alguns aminoácidos, vitaminas e minerais.

### 3.1 Probióticos

Probióticos são suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos (*Bacillus*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces*, por exemplo) que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal. Os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem resistência às drogas, o que o faz candidato para substituir os antimicrobianos como aditivos alimentares. Embora existam vários estudos que mostram seus benefícios como aditivos na alimentação animal (CUEVAS et al., 2000; SANTOSO, 1995; FRITTS et al., 2000; KALAVATHY, 2003; MORENO et al., 2002; OZCAN et al., 2003; GIL de los SANTOS, 2004), ainda há uma certa resistência por parte do setor industrial avícola em sua utilização.

### 3.2 Prebióticos

Prebióticos são definidos como ingredientes nutricionais (carboidratos) não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade de bactérias benéficas intestinais, melhorando a saúde do seu hospedeiro (GIBSON & ROBERFROID, 1995; MILTENBURG, 2000). Os prebióticos são representados, principalmente, pelos frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS). A ação biológica dos prebióticos é exercida pela redução da capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal, além de estimular o sistema imune. De acordo com Oryfo et al. (1989), os patógenos utilizam fímbrias para adesão à mucosa intestinal, que ocorre através dos receptores constituídos de mananos. Assim sendo, os prebióticos adicionados à dieta podem aderir às fímbrias bacterianas, bloqueando adesão destas à superfície intestinal. Muitos oligossacarídeos, quando administrados aos animais, alcançam o cólon sem sofrerem degradação, proporcionando substrato particularmente disponível para bactérias benéficas. Gil de los Santos (2004) verificou que os aditivos promotores de crescimento, tais como MOS e FOS podem ser usados na alimentação para frangos de corte, em substituição aos APCs, sem comprometer o desempenho e características de carcaça.

### 3.3 Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos são substâncias que contêm uma ou mais carboxilas em sua molécula. Nessa classificação podem ser incluídos os aminoácidos e os ácidos graxos. Em geral, quando o termo ácido orgânico é empregado na produção animal, refere-se aos ácidos fracos, de cadeia curta (C1-C7) que produzem menor quantidade de prótons por molécula ao se dissociarem (DIBNER & BUTTIN, 2002). Os ácidos lipofílicos fracos como láctico, acético ou propiônico são capazes de passar através da membrana celular de microrganismos em seu estado não dissociado e dissociar-se no interior da célula, produzindo íons  $H^+$  que diminuem o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano. Por sua vez os ânions  $RCOO^-$  do ácido, impedem a síntese de RNA, impedindo a síntese protéica. Estes ácidos orgânicos curtos têm um efeito antibacteriano semelhante ao dos antibióticos, sendo particularmente efetivos contra *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter* (RICKE, 2003).

### 3.4 Vitamina E

A vitamina E (Vit E) é conhecida primariamente pela sua função antioxidante, reduzindo o dano celular causado pelos radicais livres. Estudos têm encontrado uma alta concentração de vitamina E na membrana das células imunitárias (BLUMBERG, 1994). Essas células são particularmente vulneráveis aos danos causados pelos radicais livres devido à alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados contidos em sua membrana celular. A vitamina E também apresenta papel vital na redução da produção de prostaglandinas ao antagonizar a peroxidação do ácido araquidônico (inibe a cicloxigenase), reduzindo principalmente a liberação de  $PGE_2$  (COOK, 1991). Leshchinsky & Klasing (2001) determinaram os níveis ótimos de Vit E utilizada na imunidade de frangos de corte. Eles demonstraram que o nível mais imunomodulador ficou entre 25 e 50 UI/kg de dieta e, que níveis mais elevados foram menos efetivos. Maior título de anticorpos contra SRBC (eritrócito de ovelha) foi conseguido com 50 UI/kg de ração. O NRC – *National Research Council* (1994) preconiza um nível de 10 UI/kg de ração para a criação de frangos de corte, no entanto, níveis bem mais elevados são usados pela indústria avícola.

### 3.5 Vitamina A

Dalloul et al. (2002) demonstraram que frangos alimentados com dietas deficientes em vitamina A tiveram menor resposta imune celular, ficando conseqüentemente mais sensíveis a infecção de *E. acervulina*. Verificaram também, que a mortalidade dos frangos de corte, devido à *Salmonella gallinarum* foi reduzida ao suplementar vitamina A. O nível de vitamina A que maximiza o crescimento e a eficiência alimentar de frangos de corte é insuficiente para o desenvolvimento do sistema imune. Sklan et al. (1994) verificaram que para o desenvolvimento de uma máxima resposta imune em frangos, seriam necessários níveis 10 a 20 vezes superiores ao estabelecido pelo NRC (1994).

### 3.6 Vitamina C

O ácido ascórbico melhora a resposta imunológica e a resistência à doenças em aves (RUND, 1989). Na primeira linha de defesa contra os patógenos, a fagocitose por neutrófilos envolve o aumento da utilização de ácido ascórbico. Além disso, infecções virais causam depleção de ácido ascórbico em leucócitos, resultando em vários graus de imunossupressão não específica (RUND, 1989). O ácido ascórbico pode modular a atividade das células B e a adição de ácido ascórbico na dieta antes da imunização resulta em aumento da produção de anticorpos (McCORKLE et al., 1980). A vitamina C e a vitamina E interagem metabolicamente. A vitamina C melhora a atividade antioxidante da vitamina E ao reduzir os radicais de tocoferoxila para a forma ativa da vitamina E (JACOB, 1995). Amakye-Anim et al. (2000) concluíram que a suplementação de 1000 ppm de ácido ascórbico na dieta apresentou efeitos benéficos na produção de anticorpos em aves vacinadas contra gumboro.

### 3.7 Zinco

Durante uma resposta de fase aguda, grandes quantidades de zinco (Zn) são usadas pelo fígado para a síntese de proteínas de fase aguda, como a metalotioneína. Portanto, ocorre uma diminuição das concentrações de Zn no plasma durante uma resposta imune. A baixa concentração de Zn no macrófago reduz o consumo de oxigênio e a fagocitose. O Zn é cofator da timulina, um hormônio do timo (CUI et al., 2004). Linfócitos isolados de animais com deficiência de Zn mostraram prejuízos na resposta a fitohemaglutinina (PHA) e depressão na produção de anticorpos dependentes



de células T. Também causou prejuízos na função de linfócitos T auxiliares (LTh) e T citotóxicos (LTc), e diminuiu a atividade das células matadoras naturais (NK). Pimentel et al. (1991) verificaram que dietas à base de milho e soja, sem a suplementação de Zn, suportaram a demanda normal de Zn da imunidade. Entretanto, Downs et al. (2000) mostraram aumentar a imunidade e reduzir a incidência de celulites em frangos de corte, utilizando um complexo Zn-aminoácido adicionados juntamente com vitamina E. Portanto, mais trabalhos em frangos são necessários para esclarecer as ações do Zn sobre a imunidade.

### 3.8 Selênio

O estresse oxidativo é uma consequência do desbalanço entre a produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e o mecanismo antioxidante de defesa do organismo. Para minimizar esse estresse oxidativo, os antioxidantes e as enzimas antioxidantes do organismo trabalham em conjunto no controle celular dos níveis de ROS. O selênio (Se) da dieta interage com a vitamina E na proteção antioxidante da célula porque é um componente da glutathione peroxidase, que neutraliza o excesso de  $H_2O_2$  produzido pelos fagócitos. Larsen et al. (1997) verificaram uma redução na mortalidade e incidência de lesões, em frangos de corte infectados com *Escherichia coli*, de 86 para 21% quando suplementados com Se (0,4 mg/kg de ração). Reportaram também, que o aumento dos níveis de Se de 0,1 para 0,8 mg/kg aumentaram os títulos de anticorpos contra eritrócitos de ovelha de 2,2 para 3,9 log<sub>2</sub>.

### 3.9 Cobre

O cobre tem um papel importante como um componente do sistema imune. Durante a resposta de fase aguda, grande quantidades de cobre são utilizadas pelo fígado na síntese de proteínas de fase aguda, como a ceruloplasmina, que tem atividade anti-inflamatória. Koh et al. (1996) relataram que maiores níveis de cobre na dieta são necessários durante uma resposta imune inata.

### 3.10 Ferro

Muitas bactérias necessitam de ferro (Fe) para seu crescimento. Após a invasão bacteriana, cessa a absorção de ferro intestinal e a IL-1 produzida pelos macrófagos estimula a secreção de transferrina e haptoglobulina pelos hepatócitos (proteínas de fase aguda) que se conjugam a moléculas de Fe, reduzindo a disponibilidade deste elemento,

inibindo a proliferação bacteriana. Uma redução da concentração de ferro no plasma é considerada uma importante resposta do hospedeiro a uma infecção. O ferro também é necessário para a proliferação de linfócitos T e para a atividade de neutrófilos (SCHLENKER, 1998).

### 3.11 Aminoácidos

Os aminoácidos (Aas) são moléculas nitrogenadas simples, com cadeias hidrocarbonadas de baixo peso molecular, resultantes da hidrólise das proteínas. Mais de 200 Aas que foram isolados da natureza, embora somente 21 sejam componentes das proteínas. Em 2000, a Selenocisteína foi reconhecida ser o 21º aminoácido que pode ser incorporado na formação das proteínas (ATKINS & GESTELAND, 2000).

Os aminoácidos são classificados em essenciais e não essenciais. Os essenciais são aqueles exigidos pelo animal e que não são sintetizados pelo organismo, ou se sintetizados, a velocidade de síntese não é suficiente para preencher as necessidades diárias, portanto, devem vir na ração. Os não essenciais são aqueles igualmente exigidos pelo animal, mas que são sintetizados pelo organismo em quantidades suficientes a fim de preencher as necessidades diárias. Para frangos de corte, os Aas considerados essenciais são a arginina, a fenilalanina, a histidina, a isoleucina, a leucina, a glicina, a metionina, a lisina, a treonina, o triptofano e a valina. Dentre esses, existem ainda os Aas limitantes ou críticos, que são aqueles que além de não serem sintetizados pelo organismo em quantidades suficientes, são Aas que comumente são deficientes nos alimentos (milho e soja, por exemplo). Para frangos de corte, o Aa mais limitante em dietas à base de milho e soja, é a metionina (Met), seguida pela lisina (Lis), pelo triptofano (Trp) e pela treonina (Tre).

Todos os 21 aminoácidos, à exceção da glicina, têm duas formas estruturais ou estereoisômeros: L e D. Nos animais todos os aminoácidos presentes nas proteínas pertencem à forma L. No entanto, em certos casos, o animal dispõe de uma capacidade enzimática precisa para aproveitar a forma D. Dois passos são essenciais para a utilização dos D-aminoácidos: primeiro, o D-isômero deve sofrer desaminação oxidativa transformando-se em seu cetoácido análogo; segundo, esse cetoácido deve sofrer reaminação por meio da reação de uma aminotransferase específica. Não existe aminotransferases para a lisina e para a treonina, portanto os D-isômeros desses aminoácidos não são nutricionalmente ativos. Lisina, metionina, treonina e triptofano

são aminoácidos atualmente utilizados na avicultura industrial também na forma sintética (D'MELLO, 2003).

Uma única sequência de Aas de uma proteína demanda que todos os Aas, essenciais ou não, estejam presentes no sítio da síntese proteica. Na deficiência de um Aa, a utilização dos outros será prejudicada e a síntese daquela proteína não ocorrerá.

No catabolismo dos Aas o esqueleto carbonado é utilizado para a formação de glicose e ou cetose. Aas podem ser glicogênicos, cetogênicos ou ambos.

Os aminoácidos, além de serem biomoléculas constituintes de proteínas e peptídeos em todos os organismos vivos, são precursores de muitos compostos nitrogenados que possuem importantes funções fisiológicas.

### 3.11.1 Aminoácidos sulfurados (AAS)

Dentre os 21 aminoácidos que constituem a estrutura primária das proteínas, dois, metionina (Met) e cisteína (Cis), contêm um átomo de enxofre e, por isso são classificados como aminoácidos sulfurados.

Metionina é nutricionalmente essencial para todas as espécies animais. Já a cisteína, de um ponto de vista nutricional, é classificada como condicionalmente dispensável em muitas espécies animais, incluindo os frangos de corte (*gallus domesticus*). A cisteína é classificada como um aminoácido semi-essencial devido à capacidade do corpo em produzir cisteína a partir metionina (Figura 1). A via metabólica entre esses dois aminoácidos sulfurados contém um produto intermediário, a homocisteína (Hci). A síntese de Hci é influenciada pelo consumo de vitamina B (ácido fólico, Vit B6 e Vit B12). O sulfato e a taurina são os produtos finais do metabolismo desses dois Aas sulfurados. O resultado dessa via metabólica é que a metionina pode ser convertida em cisteína, mas a cisteína não pode ser convertida à metionina (Figura 1) (BROSNAN & BROSNAN, 2006).

Diferentemente da maioria dos Aas, que são produzidos comercialmente por fermentação, a metionina é produzida quimicamente. Isso tem uma importante implicação biológica, porque onde a fermentação produz somente L-isômero, o processo químico produz uma mistura racêmica de D e L-isômeros (DL-metionina).

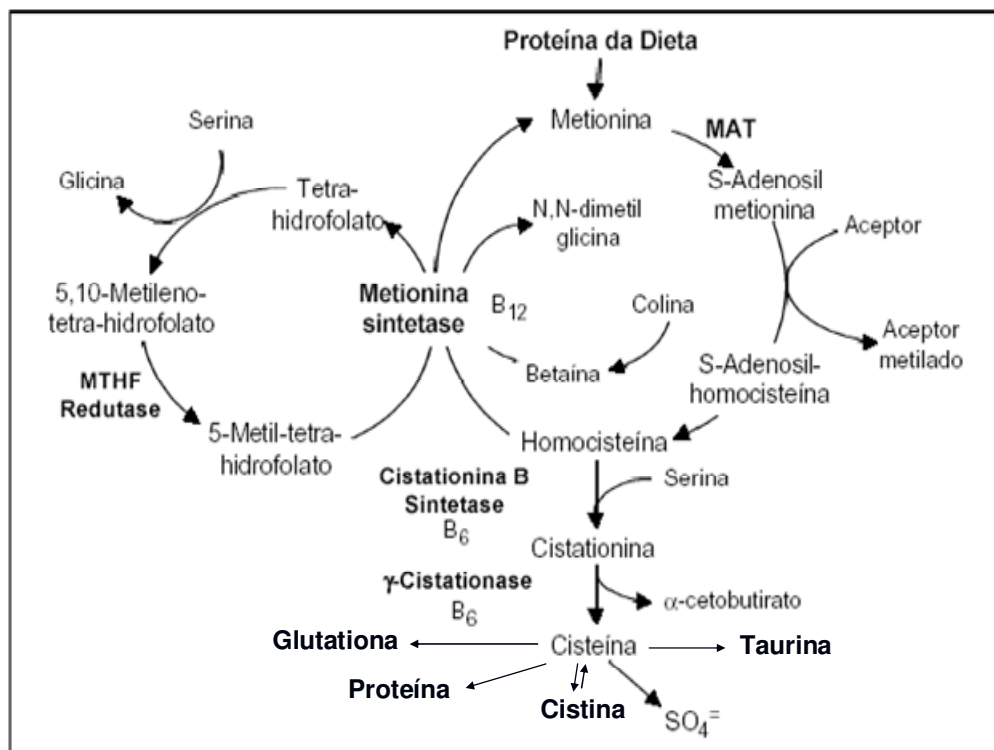


Figura 1- Metabolismo dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína).

Em dietas à base de milho e soja, para aves, a Met é o primeiro aminoácido limitante e assim requer suplementação. Entre outras funções, a Met serve como uma doadora de grupos metila e como fonte de enxofre. Tem sido reportado em pintos, que a suplementação de Met em dietas à base de milho e soja acentuaram a produção de anticorpos e aumentaram a estimulação mitogênica provocada pela fitohemaglutinina (PHA-P) (TSIAGBE et al., 1987). Swain & Johri (2000) indicaram que as necessidades de metionina para uma ótima produção de anticorpos em frangos de corte foi maior que para um ótimo crescimento. Outros autores sugerem que cisteína na dieta pode exercer efeitos específicos na modulação da resposta imune em frangos de corte (TAKAHASHI et al., 1997; KONASHI et al., 2000).

O sistema imune, na sua ação contra organismos invasores, envolve uma interligada série complexa de células e moléculas. A questão importante, entretanto, é como uma variação da disponibilidade tecidual de aminoácidos sulfurados (AAS) e os produtos de seu metabolismo interagem com esse processo (GRIMBLE, 2006). Claramente, um suplemento suficiente de AAS via dieta e a quebra das proteínas teciduais são necessárias para síntese de proteínas e dos peptídeos envolvidos em um funcionamento normal do sistema imune. O impacto de um elevado consumo de AAS

sobre a função imune não tem sido investigada em humanos nem em animais experimentais. Um número limitado de estudos tem sido conduzido, em ratos, verificando o impacto de um consumo de AAS sobre o processo inflamatório (GRIMBLE & GRIMBLE, 1998; GARLICK, 2004).

Elevado consumo de metionina via dieta aumenta a concentração de homocisteína do plasma (DITSCHIED et al., 2005; VERHOEF et al., 2005; WARD et al., 2001). Maior concentração de homocisteína celular pode aumentar a adesão de monócitos nas células endoteliais e o aumento das concentrações de homocisteína no plasma tem sido associado com a ativação do sistema imune (WIDNER et al., 2002; KOGA et al., 2002). Assim, elevadas concentrações dos metabólitos dos AAS podem alterar a função imune. Bianchi et al. (2000) verificaram que humanos saudáveis, quando submetidos a doses de L-metionina na dieta (de 0,01 a 0,68%), mostraram aproximadamente 2,5 vezes mais cisteína no plasma, o dobro de Tau e 2,5 vezes mais de GSH no plasma, quando comparados a paciente com cirrose hepática, recebendo as mesmas doses de L-arginina.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a metionina interfere no sistema imune, acentuando sua resposta, tanto humoral como celular. Constatou-se que a exigência de metionina é maior para uma ótima imunidade do que para um ótimo crescimento (TSIAGBE et al., 1987; SWAIN & JOHRI, 2000; SHINI et al., 2005) e que a restrição de AAS resulta em uma severa depleção de linfócitos do tecido intestinal (placas de Peyer) e lâmina própria (SWAIN & JOHRI, 2000).

Um dos mecanismos propostos para a metionina interferir no sistema imunológico é através da proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, já que essas células são sensíveis a uma variação intracelular de glutatona e cisteína, componentes do metabolismo da metionina (SHINI et al., 2005).

A glutatona (GSH) tem um papel fundamental na defesa antioxidante, protegendo o corpo dos danos oxidativos durante a resposta imune. A síntese de GSH é realizada principalmente no fígado. A enzima utilizada nesta via é a gama-glutamil cisteína sintetase. Sob circunstâncias fisiológicas normais há um “feedback” na atividade deste enzima pela GSH. Assim, a conversão da cisteína à GSH é influenciada fortemente pela taxa de utilização e do transporte de GSH dentro e entre as células do corpo. Ou seja, a síntese de GSH é um processo “conduzido pela demanda”, contanto que a cisteína esteja disponível. GSH é influenciada pelo consumo de AAS via dieta. Em um estudo em ratos, quando dietas com vários níveis de AAS foram utilizadas, sete moléculas de cisteína foram incorporadas na GSH para cada 10 incorporadas nas proteínas

sintetizadas no fígado, num adequado consumo de AAS (GRIMBLE & GRIMBLE, 1998). Em um consumo inadequado a taxa diminuiu para menos de três pra 10. Esse consumo inadequado de AAS não é vantajoso porque as defesas antioxidantes se tornarão comprometidas.

Sob condições de baixa disponibilidade de cisteína, a síntese da proteína será mantida e a síntese de sulfato, Tau e GSH será diminuída. Mudanças na disponibilidade desses dois últimos produtos finais podem potencialmente influenciar a função imune (GRIMBLE, 2006). Em humanos, a administração de NAC (N-acetil cisteína) via oral, aumentou as concentrações intracelulares de GSH, aumentando o número de células T (KINSCHERF et al., 1994).

A taurina e o sulfato são os produtos finais do metabolismo da cisteína. A taurina é o componente nitrogenado mais abundante da célula. É sugerido que a taurina tenha função sobre a imunidade. A taurina interage com o ácido hipocloroso, produzido durante a “explosão oxidativa” dos macrófagos estimulados, formando a taurina cloramina (TauCl). A TauCl pode ter uma importante propriedade imunomoduladora, ela inibe a ativação do NF- $\kappa$ B (fator nuclear-  $\kappa$ B) e a capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias, produzindo um efeito anti-nflamatório. A TauCl inibiu a produção de óxido nítrico, prostaglandina E<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-6 de macrófagos estimulados (HUXTABLE, 1996).

Muitos efeitos metabólicos durante a inflamação são orquestrados pelas citocinas pró-inflamatórias. Durante uma resposta imune, a bioquímica de um animal infectado é modificada, no sentido em que o sistema imune receba todos os nutrientes necessários para produzir uma resposta satisfatória. Para isso, proteína muscular é catabolizada liberando Aas para a síntese de novas células, GSH e proteínas das respotas imune. Além disso, Aas são convertidos à glicose (“combustível” preferido do sistema imune, juntamente com a glutamina). Um aumento de nitrogênio urinário e excreção de enxofre ocorre como um resultado desse processo metabólico (GRIMBLE, 2001). Foi verificado que durante uma infecção, a excreção urinária de enxofre foi menor que a de nitrogênio, sugerindo que os AAS são preferencialmente retidos (CUTHBERTSON, 1931). Tem sido proposto que o aumento da retenção resulte em um maior requerimento de AAS durante uma resposta inflamatória (GRIMBLE, 2001).

Estudos metabólicos em ratos mostraram que a ativação do sistema imune por bactérias inibe a via de transulfuração (homocisteína à cisteína) (MALMEZAT et al., 2000) e aumenta a produção hepática de taurina, com um aumento na concentração de

GSH no fígado, baço, rim e músculo (MALMEZAT et al., 1998). Com isso, o suprimento de cisteína pode não ser suficiente para manter os níveis de GSH sob condições de um aumentado estresse oxidativo.

### 3.11.2 Arginina

A arginina (Arg), um aminoácido básico, pode influenciar a resposta imune e a resistência às doenças. De acordo com Le Floch et al. (2004), duas rotas do metabolismo da arginina são identificadas e conhecidas por ter efeitos imunomodulatórios diretos. A primeira, na qual a arginina é convertida à ornitina gerando poliaminas, que têm papel chave na divisão celular, síntese de DNA e regulação do ciclo celular. A segunda corresponde à síntese do óxido nítrico (NO), um radical livre altamente reativo, permeável às células e membranas que participam de vários processos celulares, incluindo a imunidade. Altas concentrações de NO podem ser induzidas por uma variedade de estímulos inflamatórios como os LPS e as citocinas. Essa rota é essencial para a atividade citotóxica de macrófagos.

Assim, sob condições normais, a NO sintase constitutiva (cNOS) gera baixos níveis intermitentes de NO, consumindo pequena quantidade de L-arginina. Por outro lado, quando ocorre um estímulo do sistema imune, a NO sintase induzível (iNOS), localizada no citosol dos macrófagos, é ativada por citocinas e endotoxinas, produzindo uma grande quantidade de NO (BANSAL & OCHOA, 2003).

A expressão de iNOS é estimulada pela resposta inflamatória sistêmica através da ativação das citocinas (IL-1, IL-2, TNF e INF-gama) produzidas pelos linfócitos T (Th1), as quais são moléculas pró-inflamatórias e suas funções principais são promover a imunidade celular. O óxido nítrico (NO), que resulta da ação do iNOS, é um potente agente microbiocida para os patógenos intracelulares e extracelulares (BANSAL & OCHOA, 2003; HIBBS, 2002). O NO também estimula a vasodilatação local e favorece ainda a reparação tecidual (BREDET & SNYDER, 1994).

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 (espécie uricotélica), estas são dependentes do fornecimento deste aminoácido via dieta (SUNG et al., 1991). As aves não podem formar citrulina a partir da ornitina, pois não possuem a enzima carbamilsulfato sintetase (ALLEN & BAKER, 1972). O quadro é ainda mais grave nas aves, uma vez que dependem de arginina suplementar também para a formação de ornitina, que em mamíferos é obtida através do

ácido glutâmico. A síntese de ornitina é fundamental, pois está envolvida na obtenção de prolina e é utilizada também na formação de poliaminas (espermidina, espermina e putrescina) que são moléculas associadas diretamente ao crescimento e à diferenciação celular (BUTTERY & D'MELLO, 1994).

Pesquisas em espécies aviárias suplementadas com arginina apontaram o aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos (SUNG et al., 1991), aumento do peso dos órgãos linfóides (KWAK et al., 1999), melhora da relação heterófilo:linfócito em pintos suplementados e desafiados com o agente viral da bronquite infecciosa e um maior percentual de células CD8<sup>+</sup> (LEE et al., 2002). Entretanto, muitas dessas respostas benéficas da arginina têm sido conseguidas com níveis muito superiores (2 a 3% de arginina na ração) ao recomendado pelo NRC (1994) que é de 1,25% (KIDD, 2004). Kidd et al. (2001a) verificaram que níveis próximos ao recomendado (90-120% do NRC), apesar de elevar o nível de arginina plasmática, não melhoraram a resposta imune humoral e celular das aves.

Outros autores obtiveram respostas positivas com a suplementação de arginina, na redução da mortalidade de frangos desafiados com *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* e *Eimeria máxima* (KIDD et al., 2001a). Também, Corzo et al. (2003) observaram uma redução linear de arranhões infectados em carcaças de frangos alimentados com níveis crescentes de arginina (0,8 a 1,25% de Arg na dieta).

Tayade et al. (2006) demonstraram recentemente que frangos vacinados com uma vacina intermediária atenuada contra a doença de Gumboro e suplementados com 2% de arginina na ração, mostraram 100% de proteção após desafio com o vírus da doença de Gumboro, comparado com 80% de proteção induzido apenas pela vacina sem adição de arginina suplementar na dieta.

Todas estas investigações estabeleceram uma associação entre arginina, óxido nítrico e resposta imune. Por isso, nas últimas duas décadas, a arginina tem sido o foco de estudos como um regulador de muitos processos imunológicos e fisiológicos (TAYADE et al., 2006).

### 3.11.3 Outros aminoácidos

Bhargava et al. (1971) conduziram experimentos que mediram o crescimento e a produção de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle, em galinhas alimentadas com vários níveis de valina (Val). Concluíram que a necessidade de Val para a produção de anticorpos foi mais elevada do que para o crescimento. Konashi et al.



(2000) avaliaram uma redução dietária severa (50%) nos Aas de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e notaram uma redução no tamanho relativo do timo e da bursa. Kidd et al. (2001b) verificaram que a treonina da dieta não influenciou o desenvolvimento imune dos órgãos linfóides em frangos de corte. Além disso, Kidd et al. (1997) avaliaram a imunidade celular e humoral em pintos alimentados com diferentes níveis de treonina na dieta (0,68 a 0,86%) e não verificaram nenhuma melhoria na imunidade.

Apesar de nosso conhecimento da nutrição ser maduro, incluindo uma completa lista de exigência de nutrientes, o estabelecimento dos níveis mínimos de cada nutriente necessário para uma máxima produção e dos níveis e da biodisponibilidade desses nutrientes nas matérias-primas, não sabemos se os níveis adequados de nutrientes para um ótimo crescimento, em animais saudáveis, são adequados para uma ótima resposta imune ou imunocompetência durante um desafio infeccioso. Além disso, com a possível retirada dos antibióticos promotores de crescimento das rações, substitutos imunoestimulantes terão que ser utilizados, no intuito de minimizar as perdas de produtividade no setor avícola. Nesse sentido, houve a necessidade de investigar o poder imunomodulador da metionina e da arginina, em frangos de corte, utilizando níveis usuais da indústria avícola. Num segundo momento, foi investigado quais aminoácidos são limitantes durante uma resposta inflamatória em frangos de corte.

## **CAPÍTULO 2**

### **Influence of Methionine Levels in Diets of Broiler Chickens Submitted to Immunological Stress**

Submetido para a revista Brazilian Journal of Poultry Science (código NU323)



REVISTA BRASILEIRA  
DE CIÊNCIA AVÍCOLA  
BRAZILIAN JOURNAL OF  
POULTRY SCIENCE

**Campinas, 18 de Janeiro de 2007**

**Prezado(s) Senhor(es),**

Declaramos que o trabalho "**INFLUENCE OF SULFUR AMINO ACID LEVELS IN DIETS OF BROILER CHICKENS SUBMITTED TO IMMUNOLOGICAL STRESS**" está em processo de avaliação pelo corpo editorial da *Brazilian Journal of Poultry Science*, cujos autores são: LAURÍCIO LIBRELOTTO RUBIN, CLÁUDIO WAGECK CANAL, ANDRÉA MACHADO LEAL RIBEIRO, ISABEL C. MELLO DA SILVA, LUCIANO TREVISAN E LILIAN K. VOGT.

Atenciosamente,

**Vitor Oliveira**

**Brazilian Journal of Poultry Science**

# Influence of Sulfur Amino Acid Levels in Diets of Broiler Chickens Submitted to Immunological Stress

Rubin, LL<sup>1</sup>; Canal, CW<sup>1</sup>; Ribeiro, AML<sup>2</sup>; Silva, I<sup>2</sup>; Trevizan, L<sup>2</sup>; Vogt, LK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of de Virology, Veterinary College, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Zootechnic Studies, Department of Zootechnics, Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS – Brazil

## **Abstract**

Several changes in amino acid levels occur during an infection. Such changes may be imputed to the intense consumption of sulfur amino acids (SAA) during the infectious challenge. Methionine plays an important role in the humoral and cellular immune responses. It has been suggested that such effect is exerted by intracellular glutathione and cysteine levels. 432 1-day-old Ross male broiler chickens were tested (from 1 to 42 days of age) for three SAA levels in the diet (0.72, 0.82, and 0.92% from 1 to 21 days of age; 0.65, 0.75, and 0.85% from 22 to 42 days of age) for two immunological stimulus series. Vaccines against Marek's disease, Fowl Pox Virus, infectious bronchitis and Gumboro disease, Freund's Complete Adjuvant and avian tuberculin were used as immunological stimuli. The experiment comprised 6 treatment series, with 6 replications using 12 birds per replicate. Performance data were collected weekly. Gumboro antibodies were enumerated by ELISA, and the cellular immunoresponse measured by the tuberculin test. SAA levels tested did not influence immunoresponse. Nevertheless, the vaccines applied on the 1<sup>st</sup> day impaired chick performance up to the 21 days of age. By analyzing the full breeding period (1 to 42 d) a significant interaction is observed for WG (significance level 8%), pointing to the 0.92/0.85% SAA treatment as affording higher WG figures, and this response was only seen in the non-stimulated group. The methionine levels generally adopted in poultry husbandry may not be enough to guarantee weight gain, especially if the bird is bred in a low-challenge infectious environment.

**Keywords:** immune system; immunological stimulus; methionine; performance, poultry.

## Introduction

The minimum demands for a given nutrient for maximum production have been fully established (NRC, 1994). Yet, it remains to be discovered whether such demands that maximize performance of healthy unchallenged animals are in fact enough to trigger an optimal immunoresponse in newly challenged animals, thus making these individuals more resistant. Therefore, the understanding of the mechanism behind the ways nutrition influences the immune system is paramount to know the complex interactions between diet and disease.

The main role played by the bird immune system is to recognize and to promote the elimination of infectious agents that challenge the system. Alternatively, in the event of failing to do so, the immune system is required to guarantee the compatible conditions of recovery and adaptation with minimum losses to the production cycle (Montassier, 2000). The resistance against infectious challenges requires an intense response orchestrated by the immune system. From the nutritional standpoint, feed substrates (amino acids, energy, enzymes, etc) are needed to trigger such response, which consists in the clonal proliferation of lymphocytes, establishment of germinative centers in the bursa of Fabricius to refine immunoglobulin affinity, recruitment of new bone marrow monocytes and heterocytes, synthesis of effector molecules (immunoglobulins, nitric oxide, lysozyme, complement) and communication molecules (cytokines and eicosanoids, for instance).

Infections lead to several changes in amino acids present in the plasma. Such alterations may be ascribed to a sharp consumption of sulfur amino acids (SAA) during the infectious challenge, imputable to the metabolic relationships these amino acids maintain with one another (Jeevanandam *et al.* 1990; Paaw & Davis, 1990).

Methionine is an essential amino acid that plays at least four main roles. First,

methionine takes part in protein synthesis. Second, methionine is a precursor for glutathione, a tripeptide that reduces reactive oxygen species (ROS) and thus protects cells from oxidative stress. Third, methionine is needed to the synthesis of polyamines (spermine and spermidine), which take part in nucleus and cell division events. Fourth, methionine is the most important methyl group donor to methylation reaction of DNA as well as of other molecules. Therefore, methionine is the first limiting amino acid in broiler chick commercial diets, which are prepared essentially with corn- and soy-based nutrients (Kidd, 2004). Research has shown that methionine interferes in the immune system, improving both humoral and cellular response. It has also been observed that methionine requirements are higher when the purpose is to maintain optimal immunity levels, as compared to growth (Swain & Johri, 2000; Shini *et al.*, 2005), and that lower SAA levels result in a severe lymphocyte depletion in the intestine tissues (Peyer's patches) and in the *lamina propria* (Swain & Johri, 2000).

One of the mechanisms proposed to explain methionine interference in the immune system is based on the proliferation of immune cells, which are sensitive to intracellular variations in glutathione and cysteine levels, compounds which in turn take part in methionine metabolism (Shini *et al.*, 2005). Glutathione is, quantitatively speaking, the most abundant intracellular antioxidant compound, playing a variety of important roles and being vitally important to the protection against the emergence of oxidative stress that follows inflammatory processes (Le Floc'h *et al.*, 2004). Studies carried out with healthy human subjects have hypothesized that oscillations in intracellular glutathione levels are responsible for significant changes in CD4+ T cell counts, a central physiologic parameter negatively affected by either the lack or excess of glutathione (Kinscherf *et al.*, 1994).

This study was planned to find out whether birds undergoing immunological

stress demand specific nutrient intakes as compared to non-stressed animals. Different dietary SAA levels were used, by means of methionine hydroxyl-analog supplementation. The pressure the compound exerts over the immunoresponse as triggered by immunological stimuli in birds was assessed.

## **Materials and Methods**

This study used 432 1-day-old Ross male broiler chickens. The birds were housed in battery brooders placed in a controlled temperature room, and were allowed free access to feed and water throughout the growth period (42 days). Baseline diet (Table 1) was supplemented with three methionine concentrations: 0.12, 0.22, and 0.32%. Supplementation was made as methionine hydroxylanalog (HMTBA – liquid-phase methionine), with 88% methionine content. A 3x2 factorial design was adopted: sulfur amino acid (SAA) levels were 0.72, 0.82, and 0.92% for broiler chickens growing from one to 21 day of age, and were 0.65, 0.75, and 0.85% for 22- and 42-days-old chickens and two immunological stimulus (IS), affording six treatments with six replicates each, in total, with 12 birds per replication.

The birds underwent two IS series: (i) treatment series (comprising the vaccines commonly used in industrial-scale bird husbandry, Freund's Complete Adjuvant and bird tuberculin); and (ii) positive control series (without any stimulus). Vaccines against Marek' disease, Fowlpox, and Infectious Bronchitis were administered on the chicken's first day of age. The Gumboro vaccine was injected on the 14<sup>th</sup> day of age using the live virus vaccine sample V877 with low virus attenuation (minimum doses were  $10^{3.0}$  LD<sub>50</sub>) mixed in drinking water. This vaccine was applied with a view to triggering a severe inflammatory reaction in the bird's bursa of Fabricius, firstly with edema and lymphocyte depletion and next with atrophy. On the 28<sup>th</sup> day of age, twelve birds in each treatment series were challenged with 0.5 mL Freund's Complete Adjuvant (4

mg/mL of *Mycobacterium avium*) via intramuscular injection, in the breast muscle.

Table 1 – Nutrition levels and baseline diet composition of starter (1 to 21 days) and grower phase (22 to 42 days).

<b>NUTRIENTS</b>	<b>Initial Phase</b>	<b>Final Phase</b>
ME (kcal/kg)	3050	3150
Crude protein (%)	22	19
Ca (%)	0.9	0.85
Available P (%)	0.40	0.35
Available Lysine (%)	1.44	1.04
Available Arginine (%)	1.37	1.14
Available Met + Cyst. (%)	0.60	0.53
Available Methionine (%)	0.28	0.25
Available Treonine (%)	0.75	0.65
Available Tryptophane (%)	0.26	0.20
Choline (mg/kg)	1500	1400
Chlorine (%)	0.31	0.28
Sodium (%)	0.20	0.18
Potassium (%)	0.96	0.81
<b>INGREDIENTS(%)</b>		
Maize	52.30	60.70
Soy meal 48	38.50	30.50
Vegetable oil	4.00	4.00
Limestone	1.16	1.20
Dicalcium phosphate	1.59	1.40
Premix vitamin/mineral*	0.50	0.50
Salt	0.46	0.40
Choline	0.04	0.06
Lysine	0.45	0.24
Premix mixture (Vehicle+HMTBA)**	1.00	1.00
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\*Vitamin and mineral/kg diet: Se- 0,3 mg; I- 0,7 mg; Fe- 40 mg; Cu- 10 mg; Zn- 80 mg; Mn- 80 mg; Vit A- 8000 UI; Vit D3- 2000 UI; Vit E- 30 mg; Vit K- 2 mg; Vit B1- 2 mg; Vit B2- 6 mg; Vit B6- 2,5 mg; Vit B12- 0,012 mg; biotin- 0,08 mg; pentatonic acid- 15 mg; Niacin- 35 mg; Folic acid- 1 mg.

\*\*Premix mixture (Vehicle+HMTBA): 91% vehicle + 9% HMTBA for level 0.72% AAS, 82% vehicle + 17% HMTBA for level 0.82% AAS, 75.3% vehicle + 24.7% HMTBA for level 0.92% AAS, 86% vehicle + 14% HMTBA for level 0.65% AAS, 74% vehicle + 26% HMTBA for level 0.75% AAS, 63% vehicle + 37% HMTBA for level 0.85% AAS.

On the 40<sup>th</sup> day of age, that is, 12 days after the administration of the adjuvant, tuberculin was inoculated as a 0.1-mL dose via intradermal injection in one of the birds wattles. As the chickens had previously been sensitized by *M. avium*, an immunoresponse was triggered, cell-mediated immunity in the administration site



(tuberculin reaction). On the 14<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup>, and 42<sup>nd</sup> days of age, six birds of non-stimulated group (one or two birds in each date) were weighed and sacrificed. A necropsy of each bird ensued. Blood, bursas of Fabricius and spleen were collected. Performance data as weight gain (WG), feed intake (FI), and feed conversion (FC) were collected weekly.

The immunological parameters measured were humoral immunity (by ELISA for Gumboro antibodies), and cellular immunity (tuberculin reaction). The ELISA for Gumboro antibodies was conducted in 36 sera per treatment series, sorted for bird age (1, 14, 17, 35, and 42 days of age). Optical densities were transformed to antibody titers, using the formula recommended by the kit manufacturer (Symbiotics Corporation™). The measurement of the cellular immunoresponse was carried out by measuring wattle differential thickness 24 h before and after the administration of avian tuberculin.

Blood smears (eight per treatment series) were performed with blood samples collected on the 42<sup>nd</sup> day of age to quantitatively and qualitatively evaluate blood cells. The bursas of Fabricius collected as of necropsy were weighed, measured using a bursometer (scored 1 to 8), and stored in formaldehyde 10%. The histological sections prepared from the bursas were analyzed and classified according to the lesion caused by the vaccine (lymphocyte depletion) and scored 0 to 5 (Muskett et al., 1979). Spleens were also weighed.

HMTBA was introduced in the baseline diet only after being premixed with inert vehicle. The mixture was then analyzed prior to the elaboration of diets.

The experimental data were randomly evaluated by the software package SAS (2001), with ANOVA, significance level 0.05. When the F test produced significant results, the LS means test was carried out. Optical density data (sera) were antibody-titrated, and these results tested for normality (Shapiro & Wilk, 1965).

## Results and Discussion

In the starter phase (1 to 21 days), no significant interaction between immunological stimulus and SAA levels was observed. As to the main factors, it is possible to observe that the bird group that was not vaccinated produced improved WG and FC results. Also, the 0.92% SAA concentration afforded the best WG and FC values for the period, irrespective of stimulus (Table 2). No SAA interference was observed in FI.

Table 2 – Performance of broiler chickens in the initial phase (1 to 21 days), according to the SAA levels in the diet and immunological stimulus (IS).

<b>SAA (%)</b>	<b>WG (g)</b>	<b>FI (g)</b>	<b>FC (g/g)</b>
0.72	793 b	1162	1.47 a
0.82	816 b	1143	1.40 b
0.92	853 a	1180	1.38 b
<b>P</b>	0.002	0.33	0.002
<b>IS</b>			
Yes	801 b	1151	1.44 a
No	840 a	1172	1.40 b
<b>P</b>	0.005	0.26	0.027
<b>CV (%)</b>	4.7	5.4	3.5

Different letters in the same column indicate statistical significant difference.

Two factors affect the growth rate of broiler chickens during immunological stress: the drop in feed intake, and the inefficient metabolism and nutrient absorption. These events are triggered by the bird's own immunoresponse (Klasing *et al.*, 1987). As in the starter phase of breeding (1 to 21 days) no drop in feed intake was observed in the present study, the impaired growth rate observed in vaccinated birds is imputable to the inefficient metabolism and nutrition absorption. The cause behind this event is the immunoresponse triggered by the vaccines used. Thus, the requirements inherent to broiler chicken husbandry were as a whole increased.

A series of metabolic events may be linked to immunological stimulus, such as:

bivalent cation exchange, increased amino acid oxidation, increased gluconeogenesis caused by amino acids, and fat build-up (Klasing & Barnes, 1988). Some studies have reported these events as causing indirectly altered growth rates, caused in turn by direct alterations in WG, FI, and FC (Klasing *et al.*, 1987; Powanda, 1977).

SAA levels still did not affect FI during the grower phase (22 to 42 days). As for WG, a positive effect was observed, caused by increased SAA doses ( $P < 0.07$ ). Yet, FC and the lower SAA levels correlated positively during the period. Also, no negative influence caused by immunological stimulus was observed in the grower phase of broiler chicken breeding (Table 3).

Table 3 – Broiler chicken performance in the final breeding phase (22 to 42 days), according to sulfur amino acid (SAA) levels as added to diet, and immunological stimulus (IS).

<b>SAA (%)</b>	<b>WG (g)</b>	<b>FI (g)</b>	<b>FC (g/g)</b>
0.65	2014 b	3581	1.77 a
0.75	2046 b	3503	1.71 b
0.85	2097 a	3619	1.73 b
P	0.07	0.13	0.006
<b>IS</b>			
Yes	2052	3565	1.74
No	2052	3571	1.74
P	0.94	0.76	0.75
CV (%)	3.8	3.7	2.7

Different letters in the same column represent statistically significant difference.

By analyzing the full rearing period (1 to 42 d) a significant interaction was observed for WG (significance level 8%), pointing to the 0.92/0.85% SAA treatments as affording higher WG, and this response was only seen in the non-stimulated group. This demonstrates that the immunoresponse imposes a negative influence on growth, as already found out in other studies (Klasing *et al.*, 1987; Dinarello, 1984; Klasing, 1984).

Broiler chickens fed with lower SAA levels exhibited poorer FC. No differences in FI were observed. By examining the immunological stimulus, no statistically

significant difference was observed between the two groups, the group of vaccinated and the group on non-vaccinated chickens on the 42<sup>nd</sup> day ( $p>0.05$ ) (Table 4).

Table 4 – Performance of broiler chickens during the whole experimental period (1 to 42 days) for sulfur amino acid (SAA) levels in the diet adopted and immunological stimulus (is).

<b>SAA (%)</b>	<b>WG (g)</b>	<b>FI (g)</b>	<b>FC (g/g)</b>
0.72/0.65	2807	4754	1.69 a
0.82/0.75	2862	4646	1.62 b
0.92/0.85	2950	4799	1.63 b
P	0.005	0.10	0.0001
<b>IS</b>			
Yes	2853	4719	1.65
No	2893	4747	1.64
P	0.20	0.57	0.26
CV (%)	3.3	3.4	2.1
<b>Interaction</b>	<b>WG (g)</b>		
<b>WG x IS</b>	Stimulated	Non-stimulated	
0.72/0.65	2797 a	2816 a	
0.82/0.75	2882 a	2843 a	
0.92/0.85	2881 a	3019 b	
P	0.08		

Different letters in the same column define a statistically significant difference.

In the present study the SAA requirement was 0.92% (0.60% methionine) for the optimal WG factor in the starter phase, and 0.85% (0.57% methionine) in the grower phase, while Rama Rao *et al.* (2003) concluded that the demand for SAA for optimal WG did not exceed 0.72% in females raised up to the 42<sup>nd</sup> day of age. Tsiagbe *et al.* (1987b) showed that SAA demand for the optimal growth of female chickens was 0.78%, varying between the limits of 0.72% and 2.17%. Shini *et al.* (2005) observed that methionine levels (0.45; 0.60; and 0.75%) did not significantly affect WG in the bird population studied. Other authors concluded that no WG in broiler chickens was seen when methionine levels were above NRC (1994) (Pesti *et al.*, 1979; Maatman *et al.*, 1993).

The present study found out that the demand for SAA in the third week of life

was 0.92% for optimal WG (Table 5).

Table 5 – Weekly weight gain during the whole experimental period in terms of saa levels in and immunological stimulus in broiler chickens.

SAA levels	WG1	WG2	WG3	WG4	WG5	WG6
<b>0.72/0.65</b>	124	275	393 b	617	741	656
<b>0.82/0.75</b>	124	278	414 b	609	760	677
<b>0.92/0.85</b>	127	285	441 a	630	765	703
<b>P</b>	0.74	0.49	0.0009	0.32	0.21	0.20
Stimulus						
<b>Challenge</b>	121 b	269 b	410	624	755	673
<b>No challenge</b>	128 a	290 a	422	613	755	684
<b>P</b>	0.037	0.005	0.22	0.42	0.96	0.57
<b>CV (%)</b>	7.54	7.24	6.76	5.62	4.56	9.18

Different letters in the same column define a statistically significant difference.

As the birds were vaccinated on the 14th day of age against Gumboro disease, the immuno response observed is noteworthy, indicating that higher SAA levels may be beneficial to resilience. A study using rats as animal model has demonstrated that cysteine supplement in diets decreases weight loss and muscle catabolism during the acute phase immunoresponse, apart from improving the recovery of rats after being challenged with *Escherichia coli* (Breuillé *et al.*, 2006).

The vaccines injected have impaired broiler chicken growth up to the 21<sup>st</sup> day of age, though with the equalization of weights observed from the 28<sup>th</sup> day of life on (Figure 1).

Chamblee *et al.* (1992) have also verified a lower weight, worse FC, as well as higher mortality in chickens vaccinated on the 1<sup>st</sup> day of age against Gumboro disease, Newcastle disease, bronchitis and Marek. Thus, the immunological stress caused by vaccination in chickens impairs bird performance, even when no disease is present. In the light of the comparative losses as caused by disease and by vaccination, it is suggested that vaccines be cautiously applied.

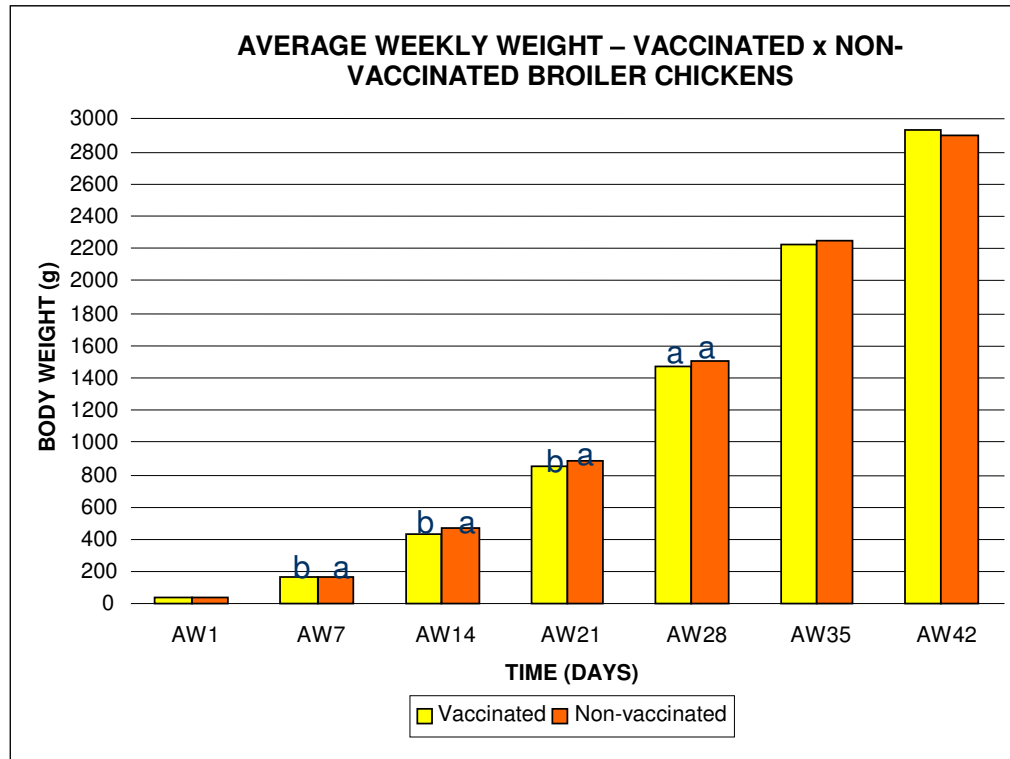


Figure 1 – Average weekly weight (AW) for stimulated broiler chicken (vaccinated and non-stimulated non-vaccinated).

Different letters in the same column (AW) define a statistically significant difference.

The compensational growth, observed in vaccinated birds in the present study, has also been reported in other studies with feed restriction (Plavnik & Hurvitz, 1985), water restriction (Viola *et al.*, 2005), and heat stress (Ribeiro *et al.*, 2001). The compensation is supposed to occur due to the decrease in energy requirements for bird upkeep during the stress period, and affords the advantage of changing bird growth pattern. In the majority of studies carried out, feed efficiency increases during the period after the stress (Robinson *et al.*, 1992; Palo *et al.*, 1995), which was not observed in the present study.

Regarding the analysis of cellular immune response as evaluated by differential wattle thickness 24 h before and after the injection of bird tuberculin, no statistically

significant differences were observed between SAA levels, although a considerable variation was observed for the variable (Table 6).

Table 6 – Tubercularization reaction as measured in the different treatment series of the group of stimulated broiler chickens.

SAA (%)	Differential thickness (mm)
<b>0.72/0.65</b>	<b>7.7</b>
<b>0.82/0.75</b>	<b>7.2</b>
<b>0.92/0.85</b>	<b>6.4</b>
P	<b>0.24</b>
CV	<b>30.7</b>

Tsiagbe *et al.* (1987a) have observed an increased mitogenic stimulation for Phytohemagglutinin-P (PHA-P) in broiler chickens treated with methionine supplement, in which the optimal level to induce the best cellular response possible, was 0.60% methionine. Rama Rao *et al.* (2003) have shown that a SAA requirement for optimal cellular response was 0.83%. Swain & Johri (2000) have demonstrated that the cellular immunoresponse by inhibition of leukocyte migration index (LMI) increases significantly when methionine level is 0.81%, varying between 0.36 and 0.81%. The authors used a low weight gain animal model (Synthetic male line – 1,300 g in 42 days), different from the animal model used in the present study (Ross – 2,900 g in 42 days). This present study tested a maximum methionine content of 0.60% in the diet adopted. Shini *et al.* (2005) observed an improvement in the cellular immunoresponse in chickens of 1 to 21 days of age, with SAA levels of 0.75, 0.90 and 1.05%, as compared to the baseline level of 0.30%. The authors also concluded that methionine (as offered in the diet) influenced the cellular aspects of immunoresponse, suggesting that the proliferation of immune cells might be influenced by an intracellular variation in glutathione and cysteine levels.

It was observed also that the Gumboro antibody levels, analyzed by ELISA, did not differ significantly for the different SAA levels (Figure 2).

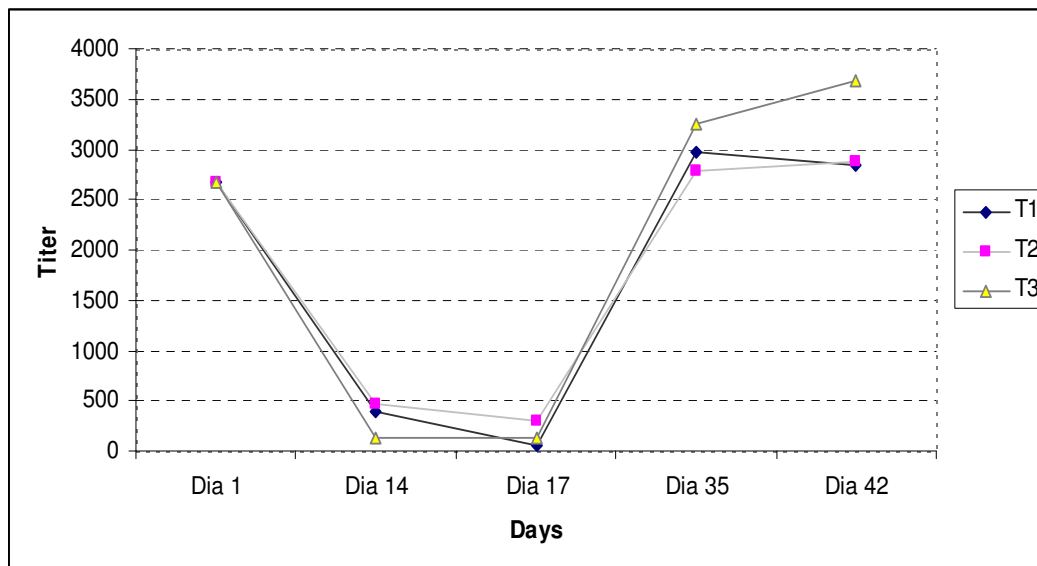


Figure 2 – Anti-Gumboro antibody titers for the different SAA levels. T1- 0.72/0.65; T2- 0.82/0.75 and T3- 0.92/0.85% of SAA.

Similarly, Takahashi *et al.* (1993) and Takahashi *et al.* (1994) have reported that neither the excess nor the deficiency of methionine in diets influenced the primary antibody generation against SRBC in chickens. Rama Rao *et al.* (2003) showed that methionine supplements increased the anti-SRBC antibody levels, and that the best SAA level for optimal antibody production was 0.88% in a 0.72-0.88% methionine level tested. Tsiagbe *et al.* (1987a) showed an increased antibody response against SRBC in chickens fed with SAA in levels varying between 0.72 and 0.97%.

The histological analyses of the bursa of Fabricius for lymphocyte depletion caused by the Gumboro vaccine did not show any significant difference between SAA levels. Nishizawa (2001) observed lesions in the bursa of Fabricius three days after the Gumboro vaccine was applied by ocular administration, with the same strain in broilers with the same age. Probably, the difference in the administration route (drinking water) may have toned down its effect.

The SAA levels tested in this study did not influence the heterophil:lymphocyte relationship, neither the weight of the bursa of Fabricius and spleen, neither



hematological data. The same results were observed by Dunnington *et al.* (1994) and Rama Rao *et al.* (2003).

## Conclusions

The SAA level as currently adopted in poultry husbandry may be insufficient to assure optimal weight gain, especially if the bird is reared in an environment with low infectious challenge. It was also observed that the vaccines usually administered have impaired the performance of broiler chicken up to the 21<sup>st</sup> day of age, and that the SAA levels tested failed to improve immunoresponse in chickens.

## References

- Breuillé, D. et al. Beneficial effect of amino acid supplementation, especially cysteine, on body nitrogen economy in septic rats. *Clinical Nutrition* 2006; 25: 634–642.
- Chamblee TN, Brake JD, Schultz CD, Thaxton JP. Yolk sac absorption and initiation of growth in broilers. *Poultry Science* 1992; 71: 1811-1816.
- Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *New England Journal of Medicine* 1984; 311: 1413-1418.
- Dunnington EA, Zulkifli I, Siadak D, Larsen AS, Siengel PB. Dietary methionine and antibody response in broiler cockerels. *Archive für Geflügelkunde* 1994; 58: 125-129.
- Jeevanandam M, Young DH, Ramais L, Schiller WR. Effect of major trauma on plasma free amino acid concentrations in geriatric patients. *American Journal of Clinical Nutrition* 1990; 51: 1040-1050.
- Klasing KC. Effect of inflammatory agents and interleukin 1 on iron and zinc metabolism. *American Journal of Physiology* 1984; 247: R901-R904.
- Klasing KC, Barnes DM. Decreased amino acid requirements of grower chicks due to immunological stress. *Journal of Nutrition* 1988; 118: 1158-1164.
- Klasing KC, Laurin DE, Peng RK, Fry DM. Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone, and interleukin-1. *Journal of Nutrition* 1987; 117: 1629-1639.
- Kidd MT. Nutritional Modulation of Immune Function in Broilers. *Poultry Science* 2004; 83: 650–657.

Kinscherf R, Fischbach T, Mihm S, Roth S, Hohenhaus-Sievert E, Weiss C, Edler L, Bärtsch P, Dröge W. Effect of glutathione depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells. *The FASEB Journal* 1994; 8: 448-451.

Le Floc'h N, Melchior D, Obled C. Modification of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livestock Production Science* 2004; 87: 37-45.

Maatman R, Gross WB, Dunnington EA, Larsen AS, Siegel PB. Growth, immune response and behavior of broiler and Leghorn cockerels fed different methionine levels. *Archiv für Geflügelkunde* 1993; 57: 249-256.

Montassier HJ. Enfermidades do sistema imune. In: Berchieri A, Macari M, Editors. *Doenças das aves*. Jaboticabal: Funep-Unesp; 2000, p. 141-150.

Muskett JC, Hopkins IG, Edwards KR, Thornton DH. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Veterinary Record* 1979; 104: 332-334.

Nishizawa M. Análise morfológica e histopatológica da bursa de Fabrícus de frangos de corte vacinados com amostras do vírus da doença de Gumboro. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2001; Suplemento 6, p. 172.

NRC (National Research Council). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed. Washington: National Academy Press; 1994.

Paaw JD, Davis AT. Taurine concentrations in serum of critically injured patients and age- and sex-matched healthy control subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 1990; 49: 814-822.

Palo PE, Sell JL, Piquer FJ, Sotosalanova MF, Vilaseca L. Effect of early nutrient restriction on broiler chickens. 1. Performance and development of the gastrointestinal tract. *Poultry Science* 1995; 74: 88-101.

Pesti GM, Harper AE, Sunde ML. Sulfur amino acid and methyl donor status of corn-soy diets fed to starting broiler chicks and turkey poults. *Poultry Science* 1979; 58: 1541-47.

Plavnik I, Hurwitz S. The performance of broiler chicks during and following a severe feed restriction at an early age. *Poultry Science* 1985; 64: 348-355.

Powanda MC. Changes in body balances of nitrogen and other key nutrients: description and underlying mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 1977; 30: 1254-68.

Rama Rao SV, Praharaj NK, Reddy MR, Panda AK. Interaction between genotype and dietary concentrations of methionine for immune function in commercial broilers. *British Poultry Science* 2003; 44: 104-112.

Ribeiro AML, Penz Jr AM, Teeter RG. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid as DL-Methionine on broiler performance and compensatory growth after exposure to two different environmental temperatures. *Journal of Applied Poultry Research* 2001;

10(4): 419-426.

Robinson MK, Rodrick ML, Jacobs DO, Rounds JD, Collins KH, Saporoschetz IB, Mannick JA, Wilmore DW. Glutathione depletion in rats impairs T-cell and macrophage immune function. *Archives of Surgery* 1993; 128: 29-34.

SAS (2001) SAS Institute Inc. (1986) SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete sample). *Biometrika Great Britain* 1965; 52(3): 591-611.

Shini S, Li X, Bryden WL. Methionine requirement and cell-mediated immunity in chicks. *British Journal of Nutrition* 2005; 94: 746-52.

Swain BK, Johri TS. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science* 2000; 41: 83-88.

Symbiotics Corporation®. Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kit. 11011 Via Frontera San Diego, CA 92127.

Takahashi K, Konashi S, Akiba Y, Horiguchi M. Effects of dietary threonine level on antibody production in growing broilers. *Animal Science and Technology (Japan)* 1994; 65: 956-960.

Takahashi K, Konashi S, Akoba Y, Horiguchi M. Effects of marginal excess or deficiency of dietary methionine on antibody production in growing broilers. *Animal Science and Technology (Japan)* 1993; 64: 13-19.

Tsiagbe VK, Cook ME, Harper AE, Sunde M.L. Enhanced immune responses in broiler chick fed methionine supplemented diets. *Poultry Science* 1987a; 66: 1147-1154.

Tsiagbe VK, Cook ME, Harper AE, Sunde ML. Efficacy of cysteine in replacing methionine in the immune responses of broiler chicks. *Poultry Science* 1987b; 66: 1138-1146.

Viola T, Ribeiro AML, Penz Jr AM. Compensatory water consumption of broilers submitted to water restriction from 1 to 21 days of age. *Brazilian Journal of Poultry Science/Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2005;7(4): 243-246.

## **CAPÍTULO 3**

### **Effect of Methionine and Arginine Levels on the Immunity of Broiler Chickens Submitted to Immunological Stimuli**

Submetido para a revista Brazilian Journal of Poultry Science (código NU328)



REVISTA BRASILEIRA  
DE CIÊNCIA AVÍCOLA  
BRAZILIAN JOURNAL OF  
POULTRY SCIENCE

**Campinas, 18 de Janeiro de 2007**

**Prezado(s) Senhor(es),**

Declaramos que o trabalho "**METHIONINE AND ARGININE DIET LEVELS ON THE IMMUNITY OF BROILER CHICKENS SUBMITTED TO IMMUNOLOGICAL STIMULI**" está em processo de avaliação pelo corpo editorial da *Brazilian Journal of Poultry Science*, cujos autores são: LAURÍCIO LIBRELOTTO RUBIN, CLÁUDIO WAGECK CANAL, ANDRÉA MACHADO LEAL RIBEIRO, ALEXANDRE DE MELLO KESSLER, ISABEL C. MELLO DA SILVA, LUCIANO TREVISAN, TERESA H. VIOLA, MARCOS RABER, THOMAS A. GONÇALVES E RODRIGO KRÁS.

Atenciosamente,

**Vitor Oliveira**

**Brazilian Journal of Poultry Science**

# Effect of Methionine and Arginine Levels on the Immunity of Broiler Chickens Submitted to Immunological Stimuli

Rubin, LL<sup>1,2</sup>; Canal, CW<sup>1</sup>, Ribeiro, AML<sup>2</sup>; Kessler, A<sup>2</sup>; Silva, I<sup>2</sup>; Trevizan, L<sup>2</sup>; Viola, T<sup>2</sup>; Raber, M<sup>2</sup>; Gonçalves, TA<sup>2</sup>; Krás, R<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS

<sup>2</sup> Laboratório de Ensino Zootécnico do Departamento de Zootecnia da UFRGS

Porto Alegre – RS – Brasil

## Abstract

The present study aimed to assess the effects of methionine and arginine on the immune response of broiler chickens submitted to immunological stimuli. The experiment used 432 1-day-old male broiler chickens to test methionine:arginine supplements in diets. Three methionine concentrations (0.31, 0.51, and 0.66% for 1 to 21 days of age; 0.29, 0.49, and 0.64% for 22 to 42 days of age) and 2 arginine concentrations (1.33 and 1.83%; 1.14 and 1.64% for the same life periods) were tested. The experiment comprised 12 treatment series with 6 repetitions each and 6 birds per repetition. Birds were divided into two groups for immunological stimuli. To one group vaccines against Marek's disease, fowl pox, infectious bronchitis, Freund's Complete Adjuvant, Sheep Red Blood Cells 10%, and avian tuberculin were administered as immunological stimuli; the other group did not receive any stimulus. Performance data were collected weekly. Anti-Sheep Red Blood Cells antibodies were detected by hemagglutination, and the cellular immune response was measured by delayed hypersensitivity (DH) reaction. Arginine levels did not influence either bird performance or immune response. Methionine concentrations higher or lower than usually adopted in bird husbandry equally failed to influence the birds' immune humoral response, but the best cell-mediated immune response was seen for the methionine level as usually adopted in bird husbandry. Vaccines administered on the first day of age impaired bird performance upon the 21<sup>st</sup> day of age.

**Keywords:** amino acids, birds, immune system, vaccines.

## **Introduction**

In past years, several kinds of animal feed supplements have been developed from different origins. The general aim is to afford, either through an exogenous pathway or by stimulating the animal's immune response, a health status that in turn might allow a gradual decrease in antibiotics use. Among such compounds are some additives widely acknowledged and extensively used in animal nutrition, such as some fatty acids, some vitamins and minerals, as well as acidifiers, enzymes, some flavoring and anti-oxidation agents, coccidiostats, and probiotics, which are nevertheless employed at a higher level as compared to strictly nutritional compounds. Apart from these, a more recent class of substances has gained use in activating the immune system of animals, such as oral immunoglobulins, stimulators to the intestinal flora, and oligosaccharides that block adhesion of pathogenic bacteria.

Methionine (Swain & Johri, 2000; Rama Rao et al., 2003; Shini et al., 2005) and arginine (Tayade et al., 2006a,b; Lee et al., 2002), are two amino acids that have been proved to perform immune regulatory action. Methionine is an essential amino acid that plays at least four main roles. First, methionine takes part in protein synthesis. Second, methionine is a precursor for glutathione, a tripeptide that reduces reactive oxygen species (ROS) and thus protects cells from oxidative stress. Third, methionine is needed to the synthesis of polyamines (spermine and spermidine), which take part in nucleus and cell division events. Fourth, methionine is the most important methyl group donor to methylation reaction of DNA as well as of other molecules.

Several studies have demonstrated that methionine constructively affects the immune system, improving either the cellular or humoral immune response. It has been reported that methionine requirements for optimal immunity are higher than for optimal growth (Tsiagbe et al., 1987; Swain & Johri, 2000; Shini et al., 2005), and that the

restricted use of sulfur amino acids (SAA) results in severe lymphocyte depletion in intestinal tissues (Peyer's patches) and *lamina propria* (Swain & Johri, 2000). One of the mechanisms proposed to explain methionine interference in the immune system is the proliferation of T cells, which are sensitive to intracellular glutathione and cysteine levels, compounds that in turn take part in methionine metabolism (Kinscherf et al., 1994).

Arginine, a dibasic amino acid, (Boorman & Lewis, 1971) is essential to birds. Besides being required to optimal growth, arginine is also important to a series of biological and physiological functions, including the biosynthesis of proteins, nitrogen transport and excretion, production of polyamides and nitric oxide, and the stimulation of several endocrine glands (Efron & Barbul, 1998; Efron & Barbul, 2000). Due to the lack of some enzymes in the urea cycle, broiler chickens are unable to biosynthesize arginine from ornithine; thus, this amino acid must be supplied in diets (Wu et al., 1995). It has been recently demonstrated that L-arginine increased the specific immune response against Gumboro's disease (IBD) in chickens (Tayade et al., 2006a). In humans, arginine supplements increase the proliferation of lymphocytes in blood and boosts suppressor T-cell counts (Barbul et al., 1981). In addition, it has been observed that arginine increases phagocyte activity of alveolar macrophages in rats (Tachibana et al., 1985). Arginine is a precursor to nitric oxide, an important microbiocidal molecule involved in the role played by macrophages as "exterminators" (Koshland, 1992). Moreover, arginine is considered to play a part in the regulation of the interactions between macrophages and lymphocytes, as well as in lymphocyte activation and adhesion.

This study was designed to check whether methionine levels in diets or the arginine:methionine ratio produces an immune response in broiler chickens submitted to



an immunological stimulus series.

## Materials and Methods

This experiment used 432 1-day-old Ross 308 male broiler chickens. Chickens were housed in metallic battery brooders placed in a controlled temperature environment, and were allowed free access to water and feed throughout the growth period (1 to 42 days). The baseline diet (Table 1) was supplemented with two methionine concentrations (0.20 and 0.35%), which ultimately resulted in 3 methionine levels (0.31, 0.51, and 0.66% in the chicken's initial life phase, and 0.29, 0.49, and 0.64% in the growth phase). Similarly, the accretion of one arginine concentration (0.50%) led to 2 levels in diets (1.33 and 1.83% in the chicken's initial life phase, and 1.14 and 1.64% in the growth phase). Methionine supplementation was performed as methionine hydroxylanalog (HMTBA – liquid-phase methionine), considering bioavailability to be 88%, whereas arginine was supplemented as L-arginine, with a 99% bioavailability.

Table 1 –Nutritional levels in baseline diets at the initial chicken life phase (1 to 21 days of age), and growth phase (22 to 42 days of age).

Nutrients	Initial phase	Growth phase
ME (kcal/kg)	3050	3150
Crude protein (%)	22	18.5
Ca (%)	0.9	0.85
Available P (%)	0.40	0.35
Available Lysine (%)	1.44	1.04
Available Arginine (%)	1.33	1.14
Available Met + Cyst. (%)	0.60	0.55
Available Methionine (%)	0.31	0.29
Available Treonine (%)	0.75	0.65
Available Tryptophane (%)	0.26	0.20
Choline (mg/kg)	1500	1400
Chlorine (%)	0.31	0.28
Sodium (%)	0.20	0.18
Potassium (%)	0.96	0.81

Vitamin and mineral/kg diet: Se- 0,3 mg; I- 0,7 mg; Fe- 40 mg; Cu- 10 mg; Zn- 80 mg; Mn- 80 mg; Vit A- 8000 UI; Vit D3- 2000 UI; Vit E- 30 mg; Vit K- 2 mg; Vit B1- 2 mg; Vit B2- 6 mg; Vit B6- 2,5 mg; Vit B12- 0,012 mg; biotin- 0,08 mg; pentatonic acid- 15 mg; Niacin- 35 mg; Folic acid- 1 mg.

Birds were divided into two groups. The first group underwent immunological stimulus (IS) with vaccines commonly used in industrial scale bird husbandry, Freund's Complete Adjuvant, avian tuberculin, and Sheep Red Blood Cells (SRBC). The second group was not challenged (positive control).

On the first day of life, vaccines against Marek's disease and fowl pox were administered via intradermal injection, and infectious bronchitis as ocular vaccine. Freund's Complete Adjuvant (inactivated *Mycobacterium avium* + mineral oil) was administered as a 0.5 mL dose (4 mg organisms/mL) via intramuscular injection in the chest muscle on the 15<sup>th</sup> day of age. On days 29 and 41, birds received one avian tuberculin injection intradermally as a 0.1 mL dose in one of the wattles to trigger DH reaction. Twenty-four hours after the administration of the second tuberculin injection (42 days of age), birds were killed by cervical dislocation. The two wattles of the same bird (one wattle submitted to the DH reaction) were collected and weighed. The analytic criterion was the difference in weight between the two wattles of one bird.

SRBC 10% diluted in sterile phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 (v/v), was administered as one 0.5 mL dose per bird via intramuscular injection on the 21<sup>st</sup> and 35<sup>th</sup> day of age. Sera were collected on the 42<sup>nd</sup> day of age, and specific antibodies against SRBC were enumerated by the Bartlett & Smith (2003) hemagglutination technique and  $\log_2$ -expressed. Antibody titers were analyzed by a normality test (Shapiro & Wilk, 1965), and, when within the normality criteria, titer results underwent a variance test.

The groups of challenged and non-challenged animals were bred in two separate environments. The birds of the non-vaccinated group were removed from the experiment after 21 days because of technical problems in installations. Performance was measured weekly as weight gain (WG) and feed intake (FI). Birds also had feed conversion (FC) established. The 12 treatment series (3 methionine concentrations x 2

arginine concentrations x 2 IS arrangements) were carried out as 6 repetitions with 6 birds each. The experimental data were randomly evaluated by the software package SAS (2001), with ANOVA. When the F test produced significant results, the LS means test was carried out.

## **Results and Discussion**

In the initial breeding period (1 to 21 days of age), a significant interaction between the levels of methionine and arginine was observed ( $P < 0.05$ ). The interaction showed that for the lowest methionine level used (0.31%), the lowest arginine level (1.33%) afforded the best WG figure, as compared to the highest concentration used. For the intermediate methionine level used, the highest arginine level produced a better WG. As for the highest methionine concentration in broiler chicken feed, the arginine concentration did not influence WG (Table 3). As regards bird performance (Table 2), the group of non-vaccinated birds produced better results for WG, FC, and CA. This effect was not observed after the 21 days of age (data not shown), when birds from both groups reached the same weight. It was also noticed that the lower methionine level used gave way to lower WG and FC, and also to a higher CA, as compared to the other levels. Arginine levels, regardless of the nature of the correlation with methionine levels, did not substantiate any significant difference in bird performance.

Routine vaccines as adopted in large-scale bird husbandry were proved to impair bird performance in the initial phase of breeding (Table 2) — a result that tallies with those of previous studies (Rubin, et al., submitted; Chamblee et al., 1992). One hypothesis to explain these results may lie in the fact the vaccines administered on the first day of age lead to a drop in FC and to inefficient metabolism and nutrient absorption, caused by the immune response triggered (Klasing et al., 1987), which in the end affected negatively FC in vaccinated chickens. A series of metabolic events may

lie behind the finding, such as the redistribution of bivalent cations, the higher energy expenditure, the worsened degradation of skeletal muscle, the more intense amino acid oxidation, and also the increased glycogenesis that occurs as mediated by amino acids (Klasing & Barnes, 1988).

Table 2 – Performance of broiler chickens in the initial phase (1 to 21 days) as influenced by methionine and arginine levels in diets, and immunological stimulus (IS).

	<b>WG (G)</b>	<b>FI (g)</b>	<b>FC (g/g)</b>
<b>Methionine (%)</b>			
0.31	786.50a	1143.36a	1.45a
0.51	941.70b	1232.43b	1.31b
0.66	932.18b	1215.89b	1.30b
P	<0.001	<0.001	<0.001
<b>Arginine (%)</b>			
1.33	884.59	1199.63	1.36
1.83	889.00	1194.82	1.35
P	0.59	0.63	0.26
<b>IS</b>			
Vaccinated	862.08a	1178.30a	1.37b
Non-vaccinated	911.50b	1216.15b	1.34a
P	<0.001	<0.001	<0.001
<b>Interaction</b>			
Met x Arg	0.01	0.14	0.07
CV (%)	3.89	3.49	2.36

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

Table 3 – Interaction between methionine and arginine levels for weight gain (g) in the initial phase (1 to 21 days).

<b>Methionine (%)</b>	<b>Arginine (%)</b>	
	1.33	1.83
0.31	801aB	772bB
0.51	926bA	957aA
0.66	926aA	938aA

Different lowercase letters in the same line indicate statistically significant differences between values ( $P < 0.05$ ). Different uppercase letters in the same column indicate statistically significant differences between values ( $P < 0.05$ ).

The highest arginine level as used side by side with the lowest methionine level in broiler chicken feeds has led to a lower FC value. The same had previously been

observed by Keshavaraz & Fuller (1971) in 1- to 21-day-old chickens using concentrations similar to those adopted in the present study. In that study, the impaired performance caused by 1.68% arginine and 0.36% methionine concentrations was improved with the addition of 0.20% methionine. In the present study, the negative effect on WG was observed with 1.83% arginine and 0.31% methionine. Yet, this effect was not observed when methionine levels were higher (0.51 and 0.66%). Fuller et al. (1967) had likewise reported lower WG in young chickens, when higher arginine concentrations were supplemented to maize and soymeal feed. In chickens, creatine biosynthesis is an important factor in arginine metabolism during the first 4 weeks of life (Fisher et al., 1956). Arginine and glycine are biological precursors to creatine, in a combination to form glycociamine, which, together with the methionine methyl group, is converted to creatine (Du Vigneaud et al., 1941). Creatine may be stored in the muscle or alternatively converted into creatinine, with both molecules being excreted in urine and the ultimate elimination of the methyl groups. The methionine-arginine interaction is a typical example of “amino acid imbalance”, according to Harper’s classification (1964). High arginine concentrations in feeds may lead to a heavy consumption of methionine methyl groups to generate creatine, which lowers the amount of methionine effectually available to growth demands. Otherwise, it was observed that one interaction between the intermediate level of the methionine and the greater level of the arginine showed one better weight gain in initial phase (1 to 21 days).

As regards performance parameters, Ruiz-Feria et al. (2001) have observed that the increase in arginine levels from 1.25 to 1.47% fail to improve significantly the WG of broiler chickens within 1 to 21 days of age. Similarly, Cuca & Jensen (1990) have reported that at this growth phase, arginine requirements for optimal WG and FC were

1.24 and 1.28%, respectively, in a 21% crude protein diet. Nevertheless, Kidd et al. (2001) have observed that the increase in arginine concentrations in diets from 1.25 to 1.50% led to a higher WG ( $P < 0.05$ ) in chickens from 1 to 18 days of age, with methionine concentration in the diet being 1.05%. Nevertheless, in another experiment, the same author observed that a rise from 1.12 to 1.50% in arginine concentration did not affect either WG or FC (Kidd et al., 2001). Deng et al. (2005) reported that no statistical difference was observed in FC and WG in male Leghorn chickens between 1 and 28 days of age with arginine levels varying from 100 to 130% over the recommended values as established by NRC (1994). In a similar way, the present study used arginine concentrations that were between 106 and 146% of the suggested NRC values (for chickens between 1 and 21 days of age), and no statistically significant differences were observed in FC and WG.

Vieira et al. (2004) have observed that 0.35% methionine led to lower WG and higher FC values, as compared to 0.48 and 0.58% methionine for commercial chicken breeds (Ross and Cobb) between the 14<sup>th</sup> and the 35<sup>th</sup> day of age, which agrees with the results of the present study. The same study reported a trend ( $P = 0.067$ ) towards a decrease in FI, under the same experimental conditions. Conversely, Fatufe & Rodehutsord (2005) stated that the best methionine concentration for optimal WG and FC of conventional broiler chicken breeds (Ross), between 8 to 21 days of age, was 0.33%, in a 0.18-0.70% variation.

In the final breeding phase (Table 4), when only the vaccinated birds were examined, no significant difference between WG and FC was observed for the methionine levels used, but an impaired FC was yet seen for the lowest methionine concentration. Arginine contents did not produce significant differences in performance at this phase, although the numerical trend ( $P = 0.11$ ) towards the decrease in FI for the

highest arginine level was noticeable, and deserves attention in future studies. Such finding may also be interpreted as a result of amino acid imbalance.

Table 4 – Performance of broiler chickens at the final growth phase (22 to 42 days of age), for the methionine and arginine levels used.

	<b>WG (g)</b>	<b>FI(g)</b>	<b>FC (g/g)</b>
<b>Methionine(%)</b>			
0.29	1849.90	3604.92	1.95a
0.49	1899.60	3507.70	1.85b
0.64	1963.32	3562.00	1.85b
P	0.21	0.64	0.02
<b>Arginine (%)</b>			
1.14	1933.87	3626.20	1.88
1.64	1874.68	3490.22	1.89
P	0.25	0.11	0.70
CV(%)	7.07	6.23	4.17

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

Gonzales-Esquerria and Leeson (2006) have observed that no difference in FI nor in WG occurred in broiler chickens from 26 to 33 days of age reared with arginine levels of 0.94 and 1.54% supplemented to feeds. Also, Tayade et al. (2006a) reported that the supplementation of 2% L-arginine in feeds was safe, and did not produce any effect when used in broiler chickens from 21 to 42 days of age. Likewise, Corzo et al. (2006) could not find a statistically significant difference ( $P > 0.05$ ) between WG and the 0.31- 0.45% methionine content in feeds for broiler chickens. Yet, in a previous study carried out by our research group (Rubin et al., submitted), methionine levels between 0.37 and 0.47% were shown to lead to worsened WG figures ( $P = 0.07$ ), as compared to 0.57%. As for FC and FI, our previous results agree with the findings arrived at in the present study, in which methionine did not interfere in FC, whereas methionine levels under 0.49% negatively affected FC.

For the whole breeding period (Table 5), the hypothesis that lower methionine level would lead to poorer WG and FC figures was confirmed, as compared to the other concentrations tested. As for arginine, the different concentrations used did not produce

a statistically significant difference between performance figures. Nevertheless, a drift towards a decrease in FC ( $P < 0.09$ ) and WG ( $P < 0.10$ ) was observed for the highest arginine level.

Table 5 – Broiler chicken performance for the whole breeding period (1 to 42 days of age), for the different methionine and arginine levels used in diets.

	<b>WG (g)</b>	<b>FI (g)</b>	<b>FC (g/g)</b>
<b>Methionine (%)</b>			
<b>0.31/0.29</b>	2659.20a	4733.50	1.80b
0.51/0.49	2843.60b	4725.30	1.66a
0.66/0.64	2876.50b	4759.00	1.66a
P	0.008	0.94	<0.0001
<b>Arginine (%)</b>			
1.33/1.14	2841.07	4817.67	1.70
1.83/1.64	2745.13	4660.87	1.71
P	0.10	0.09	0.45
CV	5.44	4.96	3.06

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

Rama Rao et al (2003) have observed that an increase in methionine levels from 0.39 to 0.55% failed to exert any effect over WG and FC of broiler chickens from 1 to 42 days of age, a finding which was also observed in the present study. However, in a previous study conducted by our research group (Rubin, et al., submitted), it was observed that an increase in methionine levels from 0.50 to 0.60% (for chickens between 1 and 21 days of age) and from 0.47 to 0.57% (between 22 and 42 days of age) did in fact increase WG of broiler chickens throughout the whole breeding period, without nevertheless influencing FC.

Concerning the immune humoral response (Table 6), no statistically significant difference in antibody production was observed against SRBC as an effect of the different methionine and arginine levels in the diets.

Similarly, Takahashi et al. (1993), Takahashi et al. (1994), and Swain & Johri (2000) have demonstrated that neither the excess nor the lack of methionine in diets influenced the production of primary antibodies in chickens. Yet, Rama Rao et al.



(2003) have shown that methionine supplements increased anti-SRBC antibody titers, and that the best methionine concentration for antibody production was the highest tested (0.55%). The SRBC administration pathway, genetic characters, or even bird sex may have influenced antibody production. Yet, in that study the authors used females of 4 different genetic strains, and injected SRBC intravenously. The present study used male Ross chickens as animal model, and SRBC was injected in the muscle.

Table 6 – Humoral ( $\log_2$ ) and cellular (DIFF) response for the groups of broiler chickens treated with different methionine and arginine levels in diets.

<b>RESPONSE</b>	<b>HUMORAL</b>	<b>CELLULAR</b>
<b>Methionine</b>	$\text{Log}_2$	DIFF (g)*
0.31/0.29	5.42	0.96a
0.51/0.49	5.39	1.33b
0.66/0.64	5.14	1.16ab
P	0.81	0.04
<b>Arginine (%)</b>		
1.33/1.14	5.54	1.16
1.83/1.64	5.09	1.14
P	0.26	0.86
CV (%)	29.60	39.46

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

\* DIFF = weight wattle DH reaction – weight wattle control

As for arginine, Kidd et al. (2001) have demonstrated that arginine levels of between 1.48 and 1.68% failed to produce an improved immune response against SRBC and to Newcastle vaccine, which agrees with the results obtained in the present study. However, Tayade et al. (2006a) have proved that a 2% arginine supplement in diets did in fact increase antibody counts and the protection against infectious bursal disease virus.

As regards immune cellular response (Table 6), the lowest arginine level led to a diminished DH reaction, as compared to the intermediate concentration. Such finding suggests an increased proliferation of Th1 lymphocytes in inflammation sites. The present study corroborates the results by Swain and Johri (2000) and Rama Rao et al.

(2003), showing methionine levels under 0.50% to generate a poorer immune cellular response as compared to higher concentrations.

As regards arginine, no significant effect on immune cellular response was observed, which again agrees with the results by Kidd et al. (2001) and by Deng et al. (2005), in studies that did not reveal any significant difference in either anti-SRBC antibody production or immune cellular response against phytohemagglutinine. Tayade et al. (2006b) have demonstrated that a 2% L-arginine supplement stimulated both intestinal and systemic immune response against the infectious bronchitis virus (IBV). Lee et al. (2002) observed that the percentage of CD8+ cells in the lung lavage fluid of IBV-challenged chickens was lower than in chickens fed with arginine-deficient diets (0.50%), as compared with appropriate, usual diets, or with feeds containing excess arginine (3.00%). It is important to emphasize that study mentioned was conducted with specific-pathogen-free birds of a different strain (Leghorn), using a different immunogen and different arginine levels (0.5, 1.0 and 3.0%) as compared to the present study (1.33 and 1.83%). Interactions between nutrients and the immune system are largely dependent on the variables mentioned. Thus, results obtained through different experimental methods can only be compared with caution.

All in all, methionine levels below or above the concentrations usually adopted in bird husbandry did not alter humoral immune response of birds, though the likelihood of a dose-response correlation between methionine and cell-mediated immune response cannot be neglected, the best response being reached using the usual methionine concentrations. The present study also establishes that the vaccines administered on the first day of age impaired broiler chicken performance upon the 21<sup>st</sup> day of age. Therefore, it is advisable to administer vaccines carefully, taking into account the loss risk caused by disease as compared to the losses caused by vaccines. It is also important

to emphasize that more research is needed to establish alternative optimal nutrition characteristics so as to minimize such “inevitable” losses. In conclusion, the arginine concentrations as tested in the present study influenced neither broiler chicken performance, nor humoral or cellular immune response.

## References

- Barbul A, Sisto DA, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. *Surgery* 1981; 90(2): 244-51.
- Bartlett JR, Smith MO. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poultry Science* 2003; 82(10): 1580-8.
- Boorman KN, Lewis D. Protein metabolism. In: Bell DJ, Freeman BM, editors. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. New York: Academic Press; 1971. p. 339-372.
- Chamblee TN, Brake JD, Schultz CD, Thaxton JP. Yolk sac absorption and initiation of growth in broilers. *Poultry Science* 1992; 71: 1811-1816.
- Corzo A, Kidd MT, Dozier III WA, Shack LA, Burgess SC. Protein expression of pectoralis major muscle in chickens in response to dietary methionine status. *British Journal of Nutrition* 2006; 95: 703–708.
- Cuca M, Jensen LS. Arginine requirement of starting broiler chicks. *Poultry Science* 1990; 69(8): 1377-82.
- Deng K, Wong CW, Nolan JV. Long-term effects of early life L-arginine supplementation on growth performance, lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. *British Poultry Science* 2005; 46(3): 318–324.
- Du Vigneaud V, Chon M, Chandler JP, Schenck JR, Simmonds S. The utilization of the methyl group of methionine in the biological synthesis of choline and creatine. *The Journal of Biological Chemistry* 1941; 140: 625.
- Efron DT, Barbul A. Modulation of inflammation and immunity by arginine supplements. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 1998; 1: 531-538.
- Efron DT, Barbul A. Role of arginine in immunonutrition. *Journal of Gastroenterology*. 2000; 35 (Suppl. 12): 20-23.
- Fatufe AA, Rodehutsord M. Growth, body composition, and marginal efficiency of methionine utilization are affected by nonessential amino acid nitrogen supplementation in male broiler chicken. *Poultry Science* 2005; 84(10): 1584-92.
- Fisher H, Salander RC, Taylor MW. The influence of creatine biosynthesis on the arginine requirements of chick. *The Journal of Nutrition* 1956; 59: 491.

Fuller HL, Chang SI, Potter DK. Detoxication of dietary tannic acid by chicks. *The Journal of Nutrition* 1967; 91: 477.

Gonzalez-Esquerria R, Leeson S. Concentrations of putrescine, spermidine, and spermine in duodenum and pancreas as affected by the ratio of arginine to lysine and source of methionine in broilers under heat stress. *Poultry Science* 2006; 85: 1398–1408.

Harper AE. Amino acid toxicities and imbalances. In: Munro HN, Allison JB, editors. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press; 1964. p. 87.

Keshavarz K, Fuller HL. Relationship of arginine and methionine in the nutrition of the chick and the significance of creatine biosynthesis in their interaction. *The Journal of Nutrition* 1971; 101(2):217-222.

Kidd MT, Peedles ED, Whitmarsh SK, Yeatman JB, Wideman RF Jr. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. *Poultry Science* 2001; 80: 1535–1542.

Kinscherf R, Fischbach T, Mihm S, Roth S, Hohenhaus-Sievert E, Weiss C, Edler L, Bärtsch P, Dröge W. Effect of glutathione depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells. *The FASEB Journal* 1994; 8: 448-451.

Klasing KC, Barnes DM. Decreased amino acid requirements of growing chicks due to immunological stress. *The Journal of Nutrition* 1988; 118: 1158-1164.

Klasing KC, Laurin DE, Peng RK, Fry DM. Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone, and interleukin-1. *The Journal of Nutrition* 1987; 117: 1629-1639.

Koshland DE. The microbial wars. *Science* 1992; 21; 257(5073):1021.

Lee JE, Austic RE, Naqi SA, Golemboski KA, Dietert RR. Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. *Poultry Science* 2002; 81: 793–798.

NRC (National Research Council). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed. Washington: National Academy Press; 1994.

Rama Rao SV, Praharaj NK, Reddy MR, Panda AK. Interaction between genotype and dietary concentrations of methionine for immune function in commercial broilers. *British Poultry Science* 2003; 44: 104-112.

Rubin LL, Silva I, Trevizan L, Vogt LK, Canal CW, Ribeiro ALM. Influence of methionine levels in diets of broiler chicks submitted to immunological stress. No prelo.

Ruiz-Feria CA, Kidd MT, Wideman Jr RF. Plasma levels of arginine, ornithine, and urea and growth performance of broilers fed supplemental L-arginine during cool temperature exposure. *Poultry Science* 2001; 80: 358–369.

SAS (2001) SAS Institute Inc. (1986) *SAS User's Guide: Statistics*. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete sample). *Biometrika Great Britain* 1965; 52(3): 591-611.
- Shini S, Li X, Bryden WL. Methionine requirement and cell-mediated immunity in chicks. *British Journal of Nutrition* 2005; 94: 746-752.
- Swain BK, Johri TS. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science* 2000; 41: 83-88.
- Tachibana K, Mukai K, Hiraoka I, Moriguchi S, Takama S, Kishino Y. Evaluation of the effect of arginine-enriched amino acid solution on tumor growth. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1985; 9(4): 428-434.
- Takahashi K, Konashi S, Akiba Y, Horiguchi M. Effects of dietary threonine level on antibody production in growing broilers. *Animal Science and Technology (Japan)* 1994; 65: 956-960.
- Takahashi K, Konashi S, Akiba Y, Horiguchi M. Effects of marginal excess or deficiency of dietary methionine on antibody production in growing broilers. *Animal Science and Technology (Japan)* 1993; 64: 13-19.
- Tayade C, Jaiswal TN, Mishra SC, Koti M. L-Arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease virus. *Vaccine* 2006a; 24(5): 552-560.
- Tayade C, Koti M, Mishra SC. 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* 2006b; 24: 5473-5480.
- Tsiagbe VK, Cook ME, Harper AE, Sunde M.L. Enhanced immune responses in broiler chick fed methionine supplemented diets. *Poultry Science* 1987; 66: 1147-1154.
- Vieira SL, Lemme A, Goldenberg DB, Brugalli I. Responses of growing broilers to diets with increased sulfur amino acids to lysine ratios at two dietary protein levels. *Poultry Science* 2004; 83: 1307-1313.
- Wu G, Flynn NE, Yan W, Barstow GG Jr. Glutamine metabolism in chick enterocytes: Absence of pyrroline-5-carboxylase synthase and citrulline synthesis. *The Biochemical Journal* 1995; 306: 717-72.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSSÃO GERAL

Uma típica resposta imune contra patógenos acarreta em fagocitose pelos macrófagos e outros fagócitos, proliferação clonal de linfócitos, formação de centros germinativos nos tecidos linfóides para maturação de afinidade das imunoglobulinas, recrutamento de novos monócitos e heterófilos da medula óssea e síntese de moléculas efetoras (anticorpos pelos linfócitos B e espécies de oxigênio reativo pelos macrófagos, por exemplo). Esses fatores regulatórios produzidos pelo sistema imune tem efeito sistêmico, onde alteram o partilhamento de nutrientes, afetando o crescimento e o aporte de nutrientes para a resposta imune (KLASING & KORVER, 1997). Os aminoácidos, durante uma resposta imune, são utilizados em diversos processos (síntese de imunoglobulinas, proliferação de linfócitos, leucopoiese, gliconeogênese, síntese de proteínas de fase aguda, entre outros), onde seus requerimentos durante um desafio infeccioso podem ser maiores. Por outro lado, os níveis de aminoácidos utilizados pela indústria avícola para um ótimo crescimento do frango, não necessariamente são suficientes para produzir uma resposta imunocompetente pelo sistema imune.

No presente trabalho foram testados níveis práticos de aminoácidos (Met e Arg), isto é, níveis usualmente utilizados no setor avícola, porque, nosso objetivo foi verificar se dentre a amplitude destes níveis haveria diferenças sobre a resposta imune. Como já falado, não houve benefícios, não referendando a hipótese de que o requerimento de certos aminoácidos seja maior para uma ótima resposta imune do que para um ótimo crescimento. Visto a imunidade ser prioritária e sua exigência menor do que o crescimento, por exemplo, é possível especular que as linhagens modernas, crescendo nas taxas atuais (mais de 60 g de ganho de peso médio/dia), necessitem de tão altos níveis de aminoácidos e que estes seriam mais do que suficientes para assegurar uma ótima resposta imune. No entanto, foi verificado que em melhores condições sanitárias de criação, o requerimento de metionina foi maior para um ótimo crescimento do que para uma ótima resposta imune, contrariando diversos autores (TSIAGBE et al., 1987; SWAIN & JOHRI, 2000; SHINI et al., 2005).

Em relação a metionina, nossos trabalhos testaram níveis que variaram de 0,31 a

0,66%, que demonstraram não influenciar a resposta imune dos frangos de corte, concordando com Takahashi et al. (1993) e Takahashi et al. (1994) onde reportaram que tanto o excesso como a deficiência de metionina na dieta não influenciaram a produção primária de anticorpos contra eritrócitos de ovelha (SRBC) em frangos. A maioria dos trabalhos que mostram a influência da metionina sobre a resposta imune (RAMA RAO et al., 2003; SHINI et al., 2005; SWAIN & JOHRI, 2000) utilizaram níveis superiores aos testados no presente trabalho.

Quanto a arginina, foram testados níveis de 1,14 a 1,83% na ração, que não influenciaram a resposta imune dos frangos. Kidd et al. (2001a) verificaram que níveis de arginina de 1,48 a 1,68% não melhoraram a resposta de anticorpos para SRBC, nem a resposta contra a vacina de Newcastle, concordando com os resultados apresentados no presente trabalho. Deng et al. (2005) também não verificaram diferença significativa na produção de anticorpos contra SRBC nem na resposta imune celular para a fitohemagutina, variando níveis de arginina na dieta. Contudo, Tayade et al. (2006a,b) demonstraram que a suplementação de 2% de arginina na dieta aumentou os níveis de anticorpos e a proteção contra o vírus de Gumboro e da bronquite infecciosa (IBV).

Num segundo momento houve a oportunidade de realizar um experimento no departamento de ciência animal da Universidade da Califórnia em Davis/USA, com a equipe do Dr. Kirk Klasing. Em trabalho anterior, Sirimongkolkasem & Klasing (2006), trabalhando com frangos de corte, demonstraram que durante uma resposta inflamatória desencadeada por LPS, a cisteína foi o primeiro Aa limitante durante a síntese de proteínas no fígado 24 horas pós-infecção, necessitando para cada grama de cisteína do fígado o catabolismo de 1,49 g de músculo. Breuille et al. (2006), trabalhando com ratos infectados com *E. coli*, verificaram que a cisteína é o primeiro Aa limitante durante uma resposta imune. Demonstraram também, que a suplementação de cisteína, reduziu significativamente o catabolismo muscular durante uma infecção com *E. Coli*. Com isso, houve a necessidade de pesquisarmos quais são os aminoácidos limitantes durante uma resposta inflamatória em frangos de corte. No presente momento, o trabalho se encontra na fase de análise das amostras. A expectativa é que a cisteína confirme ser o aminoácido mais limitante durante uma resposta inflamatória em frangos de corte.

As vacinas aplicadas no primeiro dia de vida dos frangos, prejudicaram seu crescimento até os 21 dias de idade. No entanto, já aos 28 dias observamos um “catch-up” das aves vacinadas com relação às não vacinadas. Chamblee et al. (1992) também

verificaram menor peso, pior conversão e maior mortalidade em frangos vacinados no primeiro dia de vida para doença de Gumboro, doença de Newcastle, bronquite infecciosa e doença de Marek. Provavelmente, as vacinas aplicadas no primeiro dia de vida, provocaram uma ineficiência de metabolismo e absorção dos nutrientes, desencadeada pela resposta imune (KLASING et al., 1987), o que gerou uma menor CA nas aves vacinadas. Portanto, o estímulo imunológico causado pela vacinação de frangos, mesmo sem a presença de enfermidade, prejudicou o rendimento produtivo das aves. Investigar outras estratégias nutricionais que minimizem estas perdas “inevitáveis” é assunto para estudos futuros.



## **APÊNDICE**

### **Changes in body, carcass and liver weights during inflammatory response in broiler chickens**

Trabalho realizado no Department of Animal Science, University of California, Davis, CA, USA, sob orientação do Dr. Kirk C. Klasing.

## **Changes in body, carcass and liver weights during inflammatory response in broiler chickens**

Rubin, LL<sup>1,2</sup>; Manzanilla, EG<sup>3</sup>; Canal, CW<sup>1</sup>, Ribeiro, AML<sup>2</sup>; Klasing, CK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS

<sup>2</sup> Laboratório de Ensino Zootécnico do Departamento de Zootecnia da UFRGS

<sup>3</sup> Department of Animal Science, University of California, Davis, CA, USA

### **INTRODUCTION**

Animals production, like broiler chicken, are often housed in less sanitary conditions where constantly have activation of an inflammatory response resulting a situation of the lower growth rate and unable to express their full genetic potential. Many infections are accompanied by an acute phase response (APR), which is characterized by the synthesis of acute phase proteins, anorexia, fever, accelerated whole-body protein turnover, and high rates of hepatic gluconeogenesis. These metabolic changes associated with APR are mediated by cytokines (IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) released by macrophages, heterophils, and other cells of the innate immune system that trigger an initiate local and system inflammatory responses that usually eliminate the challenging organism (Humphrey & Klasing, 2004). The acute phase response includes changes in metabolism and nutrient fluxes in all organ systems of the body, especially liver and muscle. Amino acids released from muscle (skeletal muscle catabolism) are utilized for a number of purposes including acute phase protein synthesis, defense against oxidative stress (glutathione), gluconeogenesis as well as lymphocyte proliferation (Reeds & Jahoor, 2001). This phenomenon is essential to offer conditions to the host to support the process of it metabolic stress and the negative nitrogen balance, observed frequently in this situation. Breuillé et al. (2006), working with rats, they demonstrated the cysteine as the most limiting amino acid to combat

infection. They verified also that the supplementation of great amounts of cysteine diminished the muscular degradation during an infection. Sirimongkolkasem & Klasing (2006), working with broiler chickens, they demonstrated that during an inflammatory response against lipopolysaccharide (LPS) injection, the cysteine was the first limiting amino acid driving diminished muscle accretion. It was hypothesized that amino acids essential for the synthesis of proteins important for host defense would be retained within the body. Other amino acids released at the same time from mobilization of protein stores would be lost via ureagenesis. The problem has been to quantify the needs and to determine if specific supplementation can reduce the protein catabolic response to inflammation. Moreover, the needs may extend over several amino acids and this could account for the failure of single supplementations to have major effects on body nitrogen economy. This change in the partitioning of nutrients away from growth and toward processes associated with the acute phase response is evident as a decrease in the efficiency of food use for growth. Strategies that minimize the diversion of nutrients away from growth and muscle deposition are important in animal production. Given that the acute phase response is likely to be a much larger consume of nutrients during an infectious challenge than the immune system itself, this study described here investigate the LPS effect on performance of birds and liver weight during inflammatory response of broiler chicks.

## **METHODS AND MATERIALS**

### **General Procedures**

One day old male broiler Ross 308 chicks (Cal Cruz hatchery, Santa Cruz, CA) were raised in Petersime brooder batteries (Petersime Incubator, Gettysburg, OH, USA) located in an environmentally controlled room (25 °C; 23 h light: 1 h darkness). Chicks

were provided *ad libitum* access to water and a corn – soybean meal diet (Table 1). The diet was formulated to exceed the National Research Council (1994) recommendations for young growing broiler chicks by 20% for all essential amino acids (exception tryptophan and phenylalanine, with 54% and 36% respectively). Chicks were weighed at 4 days of age following 4 hrs of feed withdrawal and assigned to pens and treatments in a manner that resulted in a similar average initial weight and variance in each pen.

Table 1: Composition of diet fed to chicks.

<b>Ingredients (%)</b>	
Corn dent yellow	51,1515
Soybean meal 48%	37,516
Vegetable oil	6,091
Calcium phos.	2,008
Limestone, ground	1,435
Salt	0,501
DL-methionine 99%	0,265
L-Cysteine	0,0625
L-Cysteine Hydrochloride <sup>b</sup>	0,08
Mineral mix <sup>a</sup>	0,25
Vitamin mix <sup>a</sup>	0,25
Threonine	0,11
L-lysine HCl 95%	0,097
Choline chloride	0,075
ferrous sulphate	0,05
Valine	0,042
Isoleucine	0,016
TOTAL	100
<b>Nutrients</b>	
ME kcal/kg	3200
Crude protein, %	22,81
Crude fat, %	8,41
Calcium %	1,1
Phos available %	0,495
Potassium %	0,9
Chloride %	0,38
Sodium %	0,22
<b>Amino acids available (%) - 120% NRC</b>	
Arginine	1,500
Isoleucine	0,960
Lysine	1,320
Methionine	0,600
Methionine + Cysteine	1,080
Cysteine	0,480
Threonine	0,960
Tryptophan	0,308
Valine	1,080
Glycine + Serine	1,887
Phenylalanine	0,984
Histidine	0,549

<sup>a</sup> Vitamin and trace minerals were provided in the form and level described in the NRC (NRC, 1994) Standard Reference Diet for Chicks.

<sup>b</sup> 1 g of L-Cysteine Hydrochloride have 0,69 g of L-Cysteine available.

**Experimental design**

After a 4 day acclimation period, 8 day old chicks were divided into LPS injected, pair-fed and control groups. Each group was divided in two time point of sacrificed, 6 and 24 hrs after LPS injection. However, the experiment was compost for a factorial 3x2 (3 groups and 2 time points). LPS injected groups were intraperitoneal injected with 2 mg/kg BW *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Chemical, St. Louis MO), which was constituted in sterile saline (8.6 g NaCl / L ddH<sub>2</sub>O) in a volume of 0,5 mL per chick. Pair-fed and control groups were injected with 0,5 mL sterile saline (8.6 g NaCl / L ddH<sub>2</sub>O). At each time point, each treatment was replicated in ten separate pens with one chick per pen (10 replicates), resulting in 20 pens of controls (6 and 24 hrs p.i.), 20 pens of pair-feds (6 and 24 hrs p.i.) and 20 pens of LPS injected (6 and 24 hrs p.i.) groups.

**Pair-fed:**

After LPS injection in LPS group, the feed intake of this group was measured hourly, during 24 hours. The feed intake average was calculated and this amount of feed was supplied to the pair-fed group. Therefore, the pair-fed group started to eat 1 hour after the application of the LPS in LPS group and finished to eat 1 hour after 24 hour of the application of the LPS in LPS group. All chicks were weighted at each 3 hours during 24 hours post infection (p.i.).

**Tissue sampling:**

Chicks were killed by CO<sub>2</sub> asphyxiation. Ten chicks were killed and sampled like control hour 0 prior to LPS injection. Thirty chicks (10 chicks/group) were killed in each time point (6 and 24 hrs p.i.). The liver was quickly removed, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. The whole gastric-intestinal tract (crop, proventriculus, gizzard and intestine) was removed and flushed with ice-cold 9 g/l

NaCl. This was then combined with the rest of the body, except liver, and the whole weighed and frozen in liquid nitrogen. The samples were stored at -80 °C.

### Statistical analysis:

Data from each sample (liver and rest of the body) at each time point was analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) (JMP Software, SAS, Cary, NC, USA) with LPS injection as the main effect. A level of  $P < 0.05$  was used as the criterion for statistical significance.

## RESULTS

The performance data demonstrate that don't exist significant difference in the growth of the chickens of LPS and PF group, except in 9 to 12 hrs period, when PF group showed better growing. The control group had greater growth than the other two groups, in 0 to 9 hrs p.i. period, being not statistically different of 9 to 24 hrs p.i. In 0 to 24 hrs p.i. period, the growth of LPS and PF groups had the same performance, and lower than control group (Table 1).

Table 1 - Growth (g) every 3 hours interval in the LPS, Pair Feed (PF) and Control groups.

Period	LPS	PF	CONTROL	SEM	P-value
<b>Growth, g*</b>					
<b>0-3h</b>	-5.9 <sup>b</sup>	-3.1 <sup>b</sup>	6.2 <sup>a</sup>	0.97	0.0001
<b>3-6h</b>	-0.7 <sup>b</sup>	-4.5 <sup>b</sup>	4.2 <sup>a</sup>	0.70	0.0001
<b>6-9h</b>	-0.7 <sup>b</sup>	-0.3 <sup>b</sup>	5.3 <sup>a</sup>	0.66	0.0001
<b>9-12h</b>	3.0 <sup>b</sup>	7.6 <sup>a</sup>	5.5 <sup>ab</sup>	1.15	0.038
<b>12-15h</b>	4.0	3.6	2.8	0.71	0.503
<b>15-18h</b>	2.0	4.0	2	0.62	0.050
<b>18-21h</b>	5.7	4.4	4.7	0.76	0.434
<b>21-24h</b>	4.7	3.6	3.7	0.61	0.430
<b>0-24h</b>	13.3 <sup>b</sup>	14.8 <sup>b</sup>	35.5 <sup>a</sup>	2.14	0.0001

Different letters in the same rows indicate statistical significant difference ( $p < 0.05$ ).

\*LSmeans by Tukey test.

The body weight (BW) of the animals was collected and, after cleaning the whole gastric-intestinal tract and withdrawal of the liver, the carcass weight (Carc) was determined. In relation to body weight, the group control, at 6 as well at 24 hours p.i., were heavier than others two groups (Table 2). Carcass weight of the groups time point 6 h p.i. and control group time point 0 h p.i., had the similar carcasses weight (Table 2). However the carcass weight of the control time point 24 h p.i. group had more weight than LPS and PF groups (Table 2). Otherwise, the LPS group livers, in time point 24 h p.i., were heavier than other groups (Table 2). This observation was expected and enforces the known concept of liver importance in acute phase protein synthesis during the inflammatory response.

Tabela 2 – Data of sacrificed birds 0, 6 and 24 hrs before LPS injection.

	<b>C 0h</b>	<b>C 6h</b>	<b>LPS 6h</b>	<b>PF 6h</b>	<b>C 24h</b>	<b>LPS 24h</b>	<b>PF 24h</b>	<b>SEM</b>	<b>P-value</b>
<b>BW, g</b>	197 <sup>bcd</sup>	203 <sup>b</sup>	185 <sup>d</sup>	189 <sup>cd</sup>	229 <sup>a</sup>	201 <sup>bc</sup>	209 <sup>b</sup>	3.6	0.0001
<b>Carc, g</b>	176 <sup>bc</sup>	182 <sup>bc</sup>	167 <sup>c</sup>	176 <sup>bc</sup>	204 <sup>a</sup>	174 <sup>bc</sup>	188 <sup>b</sup>	3.5	0.0001
<b>% Liver</b>	4.8 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>	4.6 <sup>b</sup>	4.3 <sup>b</sup>	4.7 <sup>b</sup>	6.1 <sup>a</sup>	4.7 <sup>b</sup>	0.16	0.0001

Different letters in the same rows indicate statistical significant difference ( $p < 0.05$ ).

BW = body weight

Carc = BW – feed weight in gastric-intestinal tract – Liver weight

% Liver = (peso liver/Carc) x 100

## REFERENCES

BREUILLE, D. et al. Beneficial effect of amino acid supplementation, especially cysteine, on body nitrogen economy in septic rats. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 634-642, 2006.

HUMPHREY, B.D.; KLASING, K.C. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. **World's Poultry Science Journal**, v 60, p. 90-100, 2004.

NRC (National Research Council). **Nutrient Requirements of Poultry**. 9<sup>th</sup> Ed. National Academy Press: Washington, D.C. 1994.

REEDS P.J.; JAHOOOR F. The amino acid requirements of disease. **Clinical Nutrition**, v. 20(Suppl. 1), p. 15–22, 2001.

SIRIMONGKOLKASEM, P; KLASING, KC. Changes in organs amino acid composition during acute phase response in male broiler chicks. (**In press**) University of California, Davis, CA, USA, 2006.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5<sup>th</sup> (ed.), WB Saunders Co, Philadelphia, 2005.

AGÊNCIA BRASIL. **Exportações do agronegócio praticamente dobraram em quatro anos**. Disponível em: <http://www.agenciabrasil.gov.br>> Acesso em: 10 jan. 2007.

ALLEN, N.K.; BAKER, D.H. Effects of excess lysine on the utilization and requirement for arginine by the chick. **Poultry Science**, v. 51, p. 902-906, 1972.

AMAKYE-ANIM, J. et al. Ascorbic acid supplementation improved antibody response to infectious bursal disease vaccination in chickens. **Poultry Science**, v. 79, p. 680–688, 2000.

[ARSTILA, T.P.](#); [VAINIO, O.](#); [LASSILA, O.](#) Central role of CD4<sup>+</sup> T cells in avian immune response. **Poultry Science**, v 73, p. 1019-26, 1994.

ATKINS, J.F.; GESTELAND, R.F. The twenty-first amino acid. **Nature**, v. 407, p. 463-465, 2000.

AVISITE. **Com perda de duas posições, carne de frango foi o sexto produto da pauta de básicos em 2006**. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br>> Acesso em: 10 jan. 2007a.

AVISITE. **No último mês de 2006, Brasil exportou 225 mil toneladas de carne de frango in natura**. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br>> Acesso em: 12 jan. 2007b.

BANG, G.B.; BANG, F.B. Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chicken. **American Journal of Pathology**, v. 53, p. 735-751, 1968.

BANSAL, V.; OCHOA, J. Arginine availability, arginase, and the immune response. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, p. 223–228, 2003.

BARACOS, V.E. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. **Nutrition**, v. 16, p. 1015-1018, 2000.

BCB (Banco Central do Brasil). **PIB – Revisão da projeção para 2006 e projeção para 2007**. Disponível em: <<http://www.bcb.gov.br>> Acesso em: 13 jan. 2007.

BHARGAVA, K.K.; HANSON, R.P; SUNDE, M.L. Effects of methionine and valine on growth and antibody production in chicks infected with Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v. 50, p. 614–619, 1971.

BIANCHI, G. et al. Synthesis of glutathione in response to methionine load in control subjects and in patients with cirrhosis. **Metabolism**, v. 49, p. 1434–9, 2000.

BIENESTOCK, J.; GAUDIE, J.; PEREY, D.Y. Synthesis of IgG, IgA, IgM by chicken



- tissues: Immunofluorescent and  $^{14}\text{C}$  aminoacid incorporation studies. **Journal of Immunology**, v. 111, p. 1112-1118, 1973.
- BLUMBERG, J.B. Vitamins. In: FORSE, R.A. (Ed). **Diet, Nutrition, and Immunity**. CRC: Boca Raton, FL, USA, 1994, p. 237-247.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 175-195, 1994.
- BREUILLE, D. et al. A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1079-1085, 1999.
- BREUILLE, D. et al. Beneficial effect of amino acid supplementation, especially cysteine, on body nitrogen economy in septic rats. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 634-642, 2006.
- BREUILLE, D. et al. Sepsis modifies the contribution of different organs to whole-body protein synthesis in rats. **Clinical Science**, v. 86, p. 663-669, 1994.
- BREUILLE, D. et al. Sustained modifications of protein metabolism in various tissues in a rat model of long-lasting sepsis. **Clinical Science**, v. 94, p. 413-423, 1998.
- BROSNAN, J.T.; BROSNAN, M.E. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1636S-1640S, 2006.
- BURNS, R.B. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Research of Veterinary Science**, v. 32, p. 359-365, 1982.
- BUTTERY, P.J.; D'MELLO, J.P.F. Amino acid metabolism in farm animals: an overview. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.). **Amino acids in farm animal nutrition**. Wallingford: Cab International, 1994, p. 1-10.
- CHAMBLEE, T.N.; BRAKE, J.D.; SCHULTZ, C.D.; THAXTON, J.P. Yolk sac absorption and initiation of growth in broilers. **Poultry Science**, v. 71, p. 1811-1816, 1992.
- COGBURN, L.A.; GLICK, B. Lymphopoiesis in the chicken pineal gland. **American Journal of Anatomy**, v. 162, p. 131-142, 1981.
- COOK, M.E. Nutrition and the immune response of the domestic fowl. **Critical Reviews in Poultry Biology**, v. 3, p. 167-90, 1991.
- CORZO, A.; MORAN, E.T.; HOEHLER, D. Arginine need of heavy broiler males: Applying the ideal protein concept. **Poultry Science**, v. 82, p. 402-407, 2003.
- CUEVAS, A.C. et al. El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. **Veterinaria México**, v. 31, n. 4, 2000.
- CUI H. et al. Pathology of lymphoid organs in chickens fed a diet deficient in zinc. **Avian Pathology**, v. 33, n. 5, p. 519-24, 2004.
- CUTHBERTSON, D.P. The distribution of nitrogen and sulphur in the urine during

conditions of increased catabolism. **Biochemical Journal**, v. 25, p. 236–44, 1931.

DALLOUL, R.A. et al. Effect of vitamin A deficiency on host intestinal immune response to *Eimeria acervulina* in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 81, p. 1509–1515, 2002.

DENG, K.; WONG, C.W.; NOLAN, J.V. Long-term effects of early life L-arginine supplementation on growth performance, lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. **British Poultry Science**, v. 46, n. 3, p. 318–324, 2005.

DESOUZART, O. O lobo mau do mercado internacional de carnes: a migração da produção e consumo de carnes para países em desenvolvimento. **AveWorld**, n. 16, p. 32-37, 2005.

DIBNER, J.J.; BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 453–463, 2002.

DITSCHIED, B. et al. Effect of L-methionine supplementation on plasma homocysteine and other free amino acids: a placebo-controlled double-blind cross-over study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 768–75, 2005.

D'MELLO, J.P.F. Amino Acids as Multifunctional Molecules. In: D'MELLO, J.P.F. (ed). **Amino Acids in Animal Nutrition**. 2<sup>nd</sup> ed. Scottish Agricultural College: Edinburgh, UK, 2003, p. 544.

DOWNS, K.M. et al. Dietary zinc complexes and vitamin E for reducing cellulitis incidence in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 9, p. 319–323, 2000.

ELSASSER, T.H; CAPERNA, T.J.; RUMSEY, T.S. Endotoxin administration decreases plasma insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein-2 in Angus X Hereford steers independent of changes in nutritional intake. **Journal of Endocrinology**, v. 144, p. 109-117, 1997.

FAITH, R.E.; CLEM, L.W. Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population. **Immunology**, v. 25, p. 151-164, 1973.

FRITTS, C.A. et al. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 9, n. 2, p. 149-155, 2000.

GARLICK, P.J. The nature of human hazards associated with excessive intake of amino acids. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1633S–9S, 2004.

GIBSON, G.R; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concepts of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIL de los SANTOS, J.R. **Efeito de probióticos na translocação de *Salmonella enteritidis* e na eficiência alimentar de frangos de corte**. 2004. 80f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade

Federal de Pelotas.

GLICK, B. The avian immune system. **Avian Diseases**, v. 23, p. 282-289, 1979.

GLICK, B.; CHANG, T.; JAPP, R.G. Bursa of Fabricius and antibody production. **Poultry Science**, v. 35, p. 224-225, 1956.

GOBEL, T.W.; CHEN, C.H.; COOPER, M.D. Avian natural killer cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 212, p. 107-117, 1996.

GRIMBLE, R.F. Cytokines: Their relevance to nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 43, p. 217-230, 1989.

GRIMBLE, R.F. Nutritional modulation of immune function. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 389-97, 2001.

GRIMBLE, R.F. The Effects of Sulfur Amino Acid Intake on Immune Function in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1660S-1665S, 2006.

GRIMBLE, R.F.; GRIMBLE, G.K. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. **Nutrition**, v. 14, p. 605-10, 1998.

GRIMBLE, R.F. et al. Cysteine and glycine supplementation modulate the metabolic response to tumor necrosis factor alpha in rats fed a low protein diet. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 2066-2073, 1992.

GUILLEMOT, F. & AUFRAY, C. Molecular Biology of the chicken major histocompatibility complex. **Critical Review of poultry biology**, v. 2, p. 255-75, 1989.

HELLER, E.D.; SCHAT, K.A. Enhancement of natural killer cell activity by Marek's disease vaccines. **Avian Pathology**, v. 16, p. 51-60, 1987.

HIBBS, J. Infection and nitric oxide. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. S9-S17, 2002.

HUMPHREY, B.D.; KLASING, K.C. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. **World's Poultry Science Journal**, v 60, p. 90-100, 2004.

HUXTABLE, R.J. Taurine past, present, and future. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 403, p. 641-50, 1996.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Problemas nas exportações brasileiras**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 14 jan. 2007.

JACOB, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v. 15, p. 755-766, 1995.

JEURISSEN, S.H.M.; JANSE, E.M. Distribution and function of non-lymphoid cells in liver and spleen of embryonic and adult chickens. In: BHOGAL, B.S.; KOCH, G. (Eds). **Recent advances in avian immunology research**. Liss: NY, USA, 1989, p. 149-157.

- JEURISSEN, S.H.M. et al. Defense mechanisms against viral infection in poultry: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, p. 204-208, 2000.
- KALAVATHY, R. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, n. 1, p. 139-144, 2003.
- KIDD, M.T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v. 83, p. 650-657, 2004.
- KIDD, M.T.; KERR, B.J.; ANTHONY, N.B. Dietary interactions between lysine and threonine in broilers. **Poultry Science**, v. 76, p. 608-614, 1997.
- KIDD, M.T. et al. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. **Poultry Science**, v. 80, p. 1535-1542, 2001a.
- KIDD, M.T. et al. Threonine and crude protein responses in broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 94, p. 57-64, 2001b.
- KINSCHERF, R. et al. Effect of glutathione depletion and oral N- acetylcysteine treatment on CD41 and CD81 cells. **FASEB Journal**, v. 8, p. 448-51, 1994.
- KLASING, K.C. et al. Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone, and interleukin-1. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 1629-1637, 1987.
- KLASING, K.C. Nutritional Modulation of Resistance to Infectious Diseases. **Poultry Science**, v. 77, p. 1119-1125, 1998.
- KLASING, K.C.; AUSTIC, R.E. Changes in protein synthesis due to an inflammatory challenge. **Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine**, v. 176, p. 285-291, 1984.
- KLASING, K.C.; BARNES, D.M. Decreased amino acid requirements of growing chicks due to immunologic stress. **Journal of Nutrition**, v. 118, p. 1158-1164, 1988.
- KLASING, K.C.; CALVERT, C.C. The care and feeding of an immune system: an analysis of lysine needs. In: LOBLEY, G.E.; WHITE, A.; MacRAE. (eds). **Protein Metabolism and Nutrition**. Wageningen Press, 1999, p. 253-264.
- KLASING, K.C.; KORVER, D.R. Leukocytic cytokines regulate growth rate and composition following activation of the immune system. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 58-67, 1997.
- KOGA, T.; CLAYCOMBE, K.; MEYDANI, M. Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 161, p. 365-74, 2002.
- KOH, T.S.; PENG, R.K.; KLASING, K.C. Dietary copper level affects copper metabolism during lipopolysaccharide-induced immunological stress in chicks. **Poultry Science**, v. 75, p. 867-872, 1996.

KONASHI, S.; TAKAHASHI, K.; AKIBA, Y. Effects of dietary essential amino acid deficiencies on immunological variables in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 449–456, 2000.

KOUTSOS, E.A.; KLASING, K.C. Interactions between the immune system, nutrition, and productivity of animals. In: GARNSWORTHY, P.C.; WISEMAN, J. (eds). **Recent Advances in Animal Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2001, p. 173-190, 2001.

KWAK, H.; AUSTIC, R.E.; DIETERT, R.R. Influence of dietary arginine concentration on lymphoid organ growth in chickens. **Poultry Science**, v. 78, p. 1536-1541, 1999.

LARSEN, C.T.; PIERSON, F.W.; GROSS, W.B. Effect of dietary selenium on the response of stressed and unstressed chickens to *Escherichia coli* challenge and antigen. **Biological Trace Element Research**, v. 58, p. 169–176, 1997.

LARSSON, A.; CARLANDER, D. Resistance and Various Kinds of immunity in Birds. In: THANKAM, M. (Ed). **Modern Concepts of Immunology in Veterinary Medicine: Poultry Immunology**. Thajema Publishing: West Orange, USA. 2002, p. 48-69.

LARSSON, A. et al. Chicken IgG: Utilizing the evolutionary advantage. **Poultry Science**, v. 72, p. 1807-1812, 1993.

LAURIN, D.E.; KLASING, K.C. Effects of repetitive immunogen injections and fasting versus feeding on iron, zinc, and copper metabolism in chicks. **Biological Trace Element Research**, v. 14, p. 153–165, 1987.

LEBACQ-VERHEYDEN, A.M.; VAERMAN, J.P.; HEREMANS, J.F. A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions. **Immunology**, v. 22, p. 165–169, 1974.

LEE, J.E. et al. Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. **Poultry Science**, v. 81, p. 793-798, 2002.

LE FLOC'H, N.; MELCHIOR, D.; OBLED, C. Modification of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. **Livestock Production Science**, v. 87, p. 37-45, 2004.

LESLIE, G.A.; CLEM, L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III Immunoglobulins of the chicken. **Journal of Experimental Medicine**, v. 130, p. 1337-1352, 1969.

LERNER, K.G.; GLICK, B.; McDUFFIE, F.C. Role of the bursa of fabricius in IgG and IgM production in the chicken: evidence for the role of a non-bursal site in the development of humoral immunity. **Journal of Immunology**, v. 107, p. 493–503, 1971.

LESHCHINSKY, T.V.; KLASING, K.C. Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 80, p. 1590–1599, 2001.

LILLEHOJ, HS. Intestinal intraepithelial and spleen natural killer cells responses to

Eimeria infections in inbred chickens. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1876-1884, 1989.

LINEAR, L.L.; PHILLIPS, J.H. Natural killer cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 4, p. 38-42, 1992.

LUHTALA, M. et al. Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. **Hybridoma**, v. 12, p. 633-646, 1993.

MACHADO, G.S; FONTES, D.O. Ativação do sistema imune e sua correlação com a produção e a nutrição de suínos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, MG, n. 42, p. 27-42, 2003.

MALMEZAT, T. et al. Metabolism of cysteine is modified during the acute phase of sepsis in rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 97-105, 1998.

MALMEZAT, T. et al. Methionine transsulfuration is increased during sepsis in rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 279, p. 1391-7, 2000.

McCANN, S.M. et al. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 333-44, 1998.

McCORKLE, F.R. et al. The effects of a megadose of vitamin C on the immune response of the chicken. **Poultry Science**, v. 59, p. 1324-1327, 1980.

MILTENBURG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 87-100.

MILLER, M.M. et al. Antigens similar to major histocompatibility complex B-G are expressed in the intestinal epithelium in the chicken. **Immunogenetics**, v. 32, p. 45-50, 1990.

MORENO, J.E.G. et al. Adición de dos tipos de probiótico en el agua de bebida de pollos de engorde y su efecto en el comportamiento productivo, metabólico, anatomopatológico e inmunológico. **Expedición Científica y Cultural**, v. 8, 2002.

NÓBREGA, M. **O Futuro Chegou**. Ed. Record: São Paulo, 2005, p. 399.

NORDESTE RURAL. **Entendendo a questão dos antibióticos promotores de crescimento em frangos**. Disponível em: <<http://www.nordeste-rural.com.br>> Acesso em: 10 jan 2007.

NRC (National Research Council). **Nutrient Requirements of Poultry**. 9<sup>th</sup> Ed. National Academy Press: Washington, D.C. 1994.

OLAH, I.; GLICK, B.; TAYLOR, R.L. Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken. **Anatomical Record**, v. 208, p. 253-260, 1984.

- ORYOFO, B.A.; DELOACH, J.R.; CORRIER, D.E. Prevention of Salmonella typhimurium colonization of broilers with D-mannose. **Poultry Science**, v. 68, p. 1357-1360, 1989.
- OZCAN, M. et al. The effects of *Enterococcus faecium* Cernelle 68 (SF 68) on output properties and some haematological parameters in broilers. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 59, n. 6, p. 496-500, 2003.
- PALERMO-NETO, J. **Nutrição animal e saúde humana**. II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal (II CLANA), 10 a 13 de abril de 2006 – São Paulo, SP.
- PAPET, I. et al. Bacterial infection affects protein synthesis in primary lymphoid tissues and circulating lymphocytes of rats. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2028-2032, 2002.
- PARMENTIER, H.K. et al. Divergent antibody response to vaccines and divergent body weights of chicken lines selected for high and low humoral responsiveness to sheep red blood cells. **Avian Diseases**, v. 40, p. 634-644, 1996.
- PAYNE, L.M.; POWELL, P.C. The lymphoid system. In: FREEMAN, B.M. (ed.) **Physiology and Biochemistry of the domestic fowl**. Orlando: Academic Press, 1984, p. 284-295.
- PIMENTEL, J. L.; COOK, M.E; GREGER, J.L. Immune response of chicks fed various levels of zinc. **Poultry Science**, v. 70, p. 947-954, 1991.
- PINK, J. et al. A three-locus model for the chicken major histocompatibility complex. **Immunogenetics**, v. 5, p. 203-16, 1977.
- QURESHI, M.A; HEGGEN, C.L.; HUSSAIN, I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Development & Comparative Immunology**, v. 24, p. 103-109, 2000.
- RAMA RAO, S.V.; PRAHARAJ, N.K.; REDDY, M.R.; PANDA, A.K. Interaction between genotype and dietary concentrations of methionine for immune function in commercial broilers. **British Poultry Science**, v. 44, p. 104-112, 2003.
- REEDS, P.J.; FJELD, C.R; JAHOR, F. Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? **Journal Nutrition**, v. 124, p. 906-910, 1994.
- REEDS, P.J.; JAHOR, F. The amino acid requirements of disease. **Clinical Nutrition**, v. 20 (Suppl. 1), p 15-22, 2001.
- RICKE, S.C. The gastrointestinal tract ecology of Salmonella enteritidis colonization in molting hens. **Poultry Science**, v. 82, n. 6, p. 1003-7, 2003.
- RUND, B. Vitamin C plays a role in immunity. **Poultry Dig.**, v. 48, p. 44-55, 1989.
- SANTOSO, U. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. **British Journal of Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 523-529, 1995.

SCHLENKER, E.D. **Nutrition in aging**. 3<sup>rd</sup> ed. Boston: McGraw-Hill, 1998.

SHINI, S.; LI, X.; BRYDEN, W.L. Methionine requirement and cell-mediated immunity in chicks. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 746-52, 2005.

SIRIMONGKOLKASEM, P.; KLASING, KC. Changes in organs amino acid composition during acute phase response in male broiler chicks. (In press) University of California, Davis, CA, USA, 2006.

SKLAN, D.; MELAMED, D.; FRIEDMAN, A. The effect of varying levels of dietary vitamin A on immune response in the chicks. **Poultry Science**, v. 73, p. 843-847, 1994.

SUNG, Y.J. et al. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 50, p. 49-56, 1991.

SWAIN, B.K.; JOHRI, T.S. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. **British Poultry Science**, v. 41, p. 83-88, 2000.

TAKAHASHI, K.; KONASHI, S.; AKIBA, Y.; HORIGUCHI, M. Effects of dietary threonine level on antibody production in growing broilers. **Animal Science and Technology**, v. 65, p. 956-960, 1994.

TAKAHASHI, K.; KONASHI, S.; AKOBA, Y.; HORIGUCHI, M. Effects of marginal excess or deficiency of dietary methionine on antibody production in growing broilers. **Animal Science and Technology**, v. 64, p. 13-19, 1993.

TAKAHASHI, K.; OHTA, N.; AKIBA, Y. Influences of dietary methionine and cysteine on metabolic responses to immunological stress by escherichia coli lipopolysaccharide injection, and mitogenic response in broiler chickens. **British Journal Nutrition**, v. 78, p. 815-821, 1997.

TAYADE, C.; JAISWAL, T.N.; MISHRA, S.C.; MADHURI, K. L-Arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. **Vaccine**, v. 24, p. 552-560, 2006a.

TAYADE, C.; KOTI, M.; MISHRA, S.C. 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**, v. 24, p. 5473-5480, 2006b.

TELFER, J.C.; ROTHENBERG, E.V. Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFalpha2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. **International Journal of Development Biology**, v. 229, p. 363-382, 2001.

TSIAGBE, V.K. et al. Enhanced immune responses in broiler chicks fed methionine supplemented diets. **Poultry Science**, v. 66, p. 1147-1154, 1987.

VARY, T.C.; KIMBALL, S.R. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. C445-452, 1992.



VERHOEF, P. et al. A high-protein diet increases postprandial but not fasting plasma total homocysteine concentrations: a dietary controlled, crossover trial in healthy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, p. 553–8, 2005.

VOISIN, L. et al. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal,  $Ca^{2+}$ -activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, p. 1610-1617, 1996.

WARD, M. et al. Effect of supplemental methionine on plasma homocysteine concentrations in healthy men: a preliminary study. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 71, p. 82–6, 2001.

WARR, G.W.; MAGOR, K.E.; HIGGINS, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, p. 392-398, 1995.

WEBEL, D.M.; JOHNSON, R.W.; BAKER, D.H. Lipopolysaccharide-induced reductions in body weight gain and feed intake do not reduce the efficiency of arginine utilization for whole-body protein accretion in the chick. **Poultry Science**, v. 77, p. 1893-1898, 1998a.

WEBEL, D.M.; JOHNSON, R.W.; BAKER, D.H. Lipopolysaccharide-induced reductions in food intake do not decrease the efficiency of lysine and threonine utilization for protein accretion in chickens. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1760-1766, 1998b.

WIDNER, B. et al. Moderate hyperhomocysteinaemia and immune activation in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 109, p. 1445–52, 2002.

## *Curriculum Vitae* resumido

### 1 Dados pessoais

Nome: Lauricio Librelotto Rubin  
Data de Nascimento: 12/11/1974  
Fones: (051) 3321 2550 ou 9222 4493  
E-mail: [lrubin@hotmail.com](mailto:lrubin@hotmail.com)

### 2 Formação/Titulação

- Médico Veterinário formado pela Universidade Federal de Santa Maria (1992-1998)
- Especialista em Biologia Molecular e Biotecnologia, formado pela Universidade de Cruz Alta (2001-2002)
- Mestre em Ciências Veterinária, com ênfase em Sanidade Avícola, formado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2002-2003)

### 3 Produção Científica

Artigos publicados em periódicos (completo)

- 1) SIMIONATTO Simone; RUBIN L. L.; LIMA-ROSA Carlos André da Veiga; CANAL Cláudio Wageck. Um protocolo de nested-PCR para detecção do vírus da anemia das galinhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 106-110, 2005.
- 2) SIMIONATTO S; RUBIN L.L.; LIMAROSA CAV; BORTOLANZA FH; CANAL CW. Nested-PCR detection and characterization of chicken anemia virus (CAV). **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 9, n. suppl 1, 2004.
- 3) RUBIN L. L.; ÁVILA Luiz Antônio Faccenda de; RIBEIRO Andréa Machado Leal; WALD Vera ; CANAL Cláudio Wageck. Performance comparison between broilers positive and negative for antibodies against the chicken anemia virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. suppl. 1, p. 88-89, 2003.

Artigos publicados em periódicos (resumo)

- 1) RUBIN, L. L. Comparação do desempenho de frangos de corte positivos e negativos para a presença de anticorpos contra o vírus da anemia das galinhas. **Acta scientiae**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 75-76, 2004.