



Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor

Andréa Machado Leal Ribeiro¹, Lilian Kratz Vogt², Cláudio Wageck Canal³, Christine Laganá², André Felipe Streck²

¹ Departamento de Zootecnia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

² Programa de Pós-graduação em Zootecnia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

³ Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

RESUMO - Estudou-se o efeito de dietas suplementadas com vitaminas C e E e com minerais orgânicos Zn e Se sobre parâmetros imunológicos de frangos de corte de 1 a 35 dias de idade submetidos a estresse cíclico por calor (25 a 32°C). Avaliou-se ainda a inoculação com albumina sérica bovina (BSA) como estratégia para medir a imunidade humoral. Utilizaram-se 272 aves Ross para avaliação de quatro tipos de suplementação vitamínico-mineral (SVM): D1 - dieta controle com 60 e 30 UI de vit. E/kg de ração nas rações inicial e de crescimento, respectivamente; 0 de vit. C, 80 ppm de Zn inorgânico e 0,3 ppm de Se inorgânico/kg de ração; D2 - dieta controle + 100 UI vit. E e 300 ppm vit. C/kg de ração; D3 - dieta controle + 40 ppm Zn e 0,3 ppm Se orgânicos/kg de ração; D4 - dieta controle + níveis de SVM utilizados em D2 e D3; e de dois ambientes: termoneutro (ATN) e estresse cíclico pelo calor (EPC) a partir dos 14 dias de idade. Seis e cinco aves por tipo de suplementação no EPC e ATN, respectivamente, foram inoculadas com BSA aos 12 e aos 24 dias de idade. O soro das aves com 35 dias de idade foi analisado por ELISA. A suplementação de vitaminas e minerais não influenciou a produção de anticorpos de frangos de corte desafiados com BSA. O estresse por calor provocou maior produção de anticorpos anti-BSA, independentemente da dieta utilizada. A inoculação com BSA não influenciou o desempenho das aves e foi uma estratégia eficiente para avaliar a imunidade humoral de frangos, visto que as aves responderam ao seu desafio com aumento na produção de anticorpos e no tamanho de bursa, apesar da grande variabilidade individual.

Palavras-chave: imunomodulação nutricional, selênio, vitamina C, vitamina E, zinco

Vitamins and organic minerals supplementation and its effect upon the immunocompetence of broilers submitted to heat stress

ABSTRACT - The objective of this experiment was to evaluate the effect of diet supplementation with vitamins C and E and organic minerals Zn and Se on immunological parameters of broilers from 1 to 35 days, kept on cyclic heat stress (25 to 32°C) and to evaluate the usefulness of bovine serum albumin (BSA) inoculation to determine humoral immunity. A total of 272 Ross broilers were used to evaluate four types of vitamin-mineral supplementation (VMS): D1- control diet with 60 and 30 IU of vit E for starter and growing diet, respectively, zero vit C, 80 ppm of inorganic Zn, 0.3 ppm of inorganic Se; D2 - control diet + 100 UI vit E and 300 ppm vit C/kg; D3 - control diet + 40 ppm Zn and 0.3 ppm Se/kg, both from organic sources; D4 - control diet and levels of VMS used in D2 and D3), and two environments: thermoneutral (TNA) and cyclic heat stress (CHS) from 14 days of age. Six and five birds per type of supplementation in CHS and TNA, respectively, were inoculated with BSA at 12 and 24 days. Birds serum at 35 days-old was analyzed by ELISA. Supplementation with vitamins and minerals did not influence antibody production of broilers challenged with BSA. Heat stress improved antibody anti-BSA production regardless of the diet. Inoculation with BSA did not influenced broiler performance and was a good strategy to evaluate humoral immunity of broilers, since the birds responded to the challenge improved antibody production and increased bursal size, despite the higher individual variation.

Key Words: nutritional immunomodulation, selenium, vitamin C, vitamin E, zinc

Introdução

A avicultura destaca-se entre as atividades do setor agropecuário mundial, com índices de produção em constante crescimento. O aumento na produção de carne de

frangos foi consequência de avanços em genética, nutrição, sanidade e manejo, que elevaram os níveis de produtividade e desempenho. No entanto, alguns aspectos como bem-estar e imunocompetência das aves foram, em parte, negligenciados.

O frango moderno tem pouca capacidade de resposta a situações de estresse, como calor, frio, vento, fome e densidade populacional. A capacidade de adaptação do animal a estas circunstâncias determina ou não seu estado de estresse. O frango moderno tem pouca capacidade de termorregulação; é bem mais sensível ao calor que ao frio. Segundo Ferket & Qureshi (1992), muitas produções de frango no mundo estão situadas em locais onde o estresse causado por altas temperaturas ambientais limita o desempenho e aumenta a sensibilidade a doenças. Aves submetidas a estresse ambiental geralmente têm sua função imune reduzida (Thaxton & Siegel, 1970; Brake, 1989; Siegel, 1989; Miller & Qureshi, 1991).

Alguns parâmetros comumente utilizados para estimar a imunidade de aves são o peso de órgãos linfóides (Pope, 1991), a resposta de anticorpos a antígenos estranhos (Montgomery et al., 1991; Patterson & Siegel, 1998; Scott et al., 1994), a relação heterófilo:linfócito (H:L) (Al-Murrani et al., 1997; Patterson & Siegel, 1998) e os ensaios de blastogênese de linfócitos (Talebi et al., 1995; Gogal et al., 1997). O peso de órgãos linfóides é facilmente medido e reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante uma resposta imune.

Não se sabe ao certo se o efeito prejudicial do estresse por calor na função imune de aves pode ser superado com o fornecimento de alguns nutrientes. Ferket & Qureshi (1992) observaram que a suplementação vitamínica (vitaminas A, D, E e complexo B) durante estresse por calor episódico foi benéfica nos estágios de indução e maturação da resposta de síntese de anticorpos.

Características de desempenho e função imune de aves que sofreram estresse por calor são significativamente melhoradas com o aumento nos níveis de vitamina C (Pardue & Thaxton, 1984; Pardue et al., 1985), vitamina E (El-Boushy, 1988) e piridoxina (Blalock et al., 1984). Níveis moderados de vitamina E na dieta (50 UI/kg) de aves elevaram a produção de anticorpos para eritrócitos ovinos, enquanto o mesmo não ocorreu com níveis mais altos (100 e 200 UI/kg) (Leshchinsky & Klasing, 2001). O selênio também faz parte do sistema antioxidante natural, poupando a vitamina E, de modo que patos alimentados com dietas suplementadas com selênio apresentam concentrações mais elevadas de vitamina E no plasma (Combs, 1975). Thornton (1961) relatou que os níveis de ácido ascórbico sanguíneo em aves estressadas por calor foram marcadamente reduzidos e sugeriu que o estresse poderia criar exigência de suplementação com vitamina C.

Também o Zinco (Zn) é um nutriente a ser considerado. Durante a reação imunológica, o nível desse mineral no

sangue decresce drasticamente em razão da síntese de metalotioneína no fígado e, em contrapartida, a absorção é aumentada, provocando aumento na exigência deste mineral. Kidd et al. (1994) avaliaram os efeitos da suplementação de zinco em dietas para perus com níveis adequados deste mineral e observaram que a adição de 30 ou 45 ppm de zinco a partir da utilização de zinco-metionina aumentou significativamente a capacidade de resposta imune celular de perus jovens.

Esta pesquisa foi realizada com os objetivos de estudar os efeitos da suplementação de vitaminas E e C, dos minerais orgânicos Zn e Se e da temperatura ambiental na imunidade humoral de frangos de corte desafiados com albumina sérica bovina (BSA) e avaliar a inoculação com BSA como estratégia para medir a imunidade humoral e os efeitos desse desafio no desempenho de frangos de corte.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no período de novembro a dezembro de 2003. Foram utilizados 468 pintos de corte machos, linhagem Ross 308, de 1 dia de idade, com peso inicial de $44 \pm 0,2$ g. As aves foram criadas, até os 14 dias, em 78 gaiolas metálicas de $0,72 \text{ m}^2$, em sala climatizada, com temperatura inicial de $31 \pm 1^\circ\text{C}$, decrescendo gradativamente até aproximadamente $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Nesta fase, as aves foram distribuídas aleatoriamente (seis em cada gaiola) e alimentadas com quatro dietas suplementadas com vitaminas e/ou minerais. As dietas foram: D1 - dieta controle, com os níveis vitamínicos e minerais contidos no premix; D2 - dieta controle + suplementação vitamínica de 100 UI vit. E e 300 ppm vit. C/kg de ração; D3 - dieta controle + suplementação mineral de 40 ppm Zn e 0,3 ppm Se/kg de ração; D4 - dieta controle + suplementação vitamínico-mineral nos níveis de D2 + D3.

A vitamina E foi suplementada na forma de acetato dl- μ tocoferol (Roche[®]) e a vitamina C na forma de ácido ascórbico (Roche[®]). O zinco e o selênio foram suplementados na forma orgânica (Zinpro[®]).

Aos 14 dias, 272 aves (quatro aves por gaiola) selecionadas aleatoriamente foram distribuídas em 68 gaiolas de $0,90 \text{ m}^2$, em dois ambientes – termoneutro (ATN) e estresse por calor (EPC) – com oito repetições por tipo de suplementação no EPC e nove repetições por tipo de suplementação no ATN.

Consideraram-se EPC 12 horas de temperatura a 25°C , 3 horas de 25 a 32°C , 6 horas a 32°C e 3 horas de 32 a 25°C diariamente, e ATN, temperaturas diárias na faixa de 21 a 25°C . A umidade relativa do ar manteve-se em torno de

70% nos dois ambientes. O monitoramento da temperatura e da umidade relativa do ar de cada ambiente foi feito por termômetro de bulbo seco e bulbo úmido e de máxima e mínima, colocados à altura intermediária das gaiolas. O programa de luz adotado durante o experimento foi contínuo (24 horas de luz artificial/dia). As aves receberam ração e água à vontade e mesmo manejo durante todo o período experimental.

A composição nutricional e de ingredientes (Tabela 2) utilizada nas dietas do período inicial e de crescimento foi calculada conforme descrito por Rostagno et al. (2000). As aves foram alimentadas no período de 1 a 21 dias com a ração inicial e dos 21 aos 35 dias receberam a ração de crescimento. Os níveis de suplementação de vitaminas e minerais foram os mesmos nas fases inicial e de crescimento.

Seis repetições no tratamento com EPC e cinco repetições no tratamento em ATN foram inoculadas com albumina sérica bovina (BSA) diluída em solução tampão fosfato (PBS) aos 12 e 24 dias de idade para posterior medida de anticorpos produzida contra este antígeno, portanto, a inoculação consistiu em um terceiro fator no modelo estudado, o qual foi composto, ao final, de um fatorial $4 \times 2 \times 2$ (quatro tipos de suplementação vitamínico-mineral, dois ambientes e inoculação ou não com BSA). As aves restantes foram inoculadas com solução tampão fosfato (PBS) como controle negativo.

O preparo da vacina de BSA foi feito a partir de uma solução contendo 16 mg BSA/mL, de modo que 1 mL desta solução foi diluído em 15 mL de PBS. A nova solução foi misturada em mesmo volume de adjuvante incompleto, composto de 85% óleo mineral e 15% de lanolina. A mistura foi agitada lentamente até adquirir consistência de emulsão. A vacina foi aplicada na dose de 0,4 mL/ave, via intramuscular (músculo de peito).

As aves foram pesadas no início do período experimental e semanalmente para determinação do ganho de peso. O consumo de ração foi calculado considerando a quantidade de ração fornecida, as sobras nos comedouros e os desperdícios. A conversão alimentar foi calculada pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso das aves. A viabilidade das aves foi calculada pelo número de aves vivas no início do período menos a mortalidade do período.

As aves foram sacrificadas aos 35 dias de idade por meio de deslocamento cervical. Em seguida, foram submetidas aos procedimentos de sangria, escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento em *chiller* por 40 minutos. Os órgãos linfóides, baço e bursa, foram coletados durante a evisceração, secos em papel-toalha e pesados em balança de precisão. No cálculo dos rendimentos dos órgãos linfóides, dividiu-se o peso do órgão pelo peso

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

Item	Inicial (1 a 21 dias)	Crescimento (21 a 42 dias)
Composição (%)		
Ingrediente	Composição (%)	
Milho	56,885	60,61
Farelo de soja (46% PB)	36,08	31,61
Óleo de soja	2,78	3,67
Fosfato bicálcico	1,80	1,68
Calcário	1,43	1,39
Sal	0,47	0,47
DL-metionina	0,23	0,25
Lisina	0,12	0,09
Premix vitamínico ¹ /mineral ²	0,15	0,15
Colina	0,03	0,03
Anticoccidiano ³	0,025	0,05
Composição nutricional		
EMAn (kcal/kg)	3.000	3.100
PB (%)	21,5	19,50
Ca (%)	1,00	0,95
P disponível (%)	0,45	0,42
Lisina (%)	1,25	1,14
Metionina + Cistina (%)	0,90	0,83
Vitamina E (mg)	60	30
Vitamina C	-	-
Zn (mg)	80	80
Se (mg)	0,3	0,3

¹ Premix inicial: vit. A - 10.000 UI; vit. D3 - 3.000 UI; vit. E - 60 mg; vit. K3 - 3 mg; vit. B1 - 3 mg; vit. B2 - 8 mg; vit. B6 - 4 mg; vit. B12 - 0,014 mg; ác. pantotênico - 20 mg; niacina - 60 mg; ác. fólico - 2,5 mg; biotina - 0,24 mg. Premix crescimento: vit. A - 8.000 UI; vit. D3 - 2.000 UI; vit. E - 30 mg; vit. K3 - 2 mg; vit. B1 - 2 mg; vit. B2 - 6 mg; vit. B6 - 2,5 mg; vit. B12 - 0,012 mg; ác. pantotênico - 15 mg; niacina - 35 mg; ác. fólico - 1 mg; biotina - 0,08 mg.

² Premix inicial e crescimento: Fe - 40 mg; Zn - 80 mg; Mn - 80 mg; Cu - 10 mg; I - 0,7 mg; Se - 0,3 mg.

³ Monensina - 100 ppm.

da ave. Coletaram-se ainda amostras de sangue de todas as aves para contagem de anticorpos no soro (3 mL) e de leucócitos totais no sangue (± 5 mL em tubos com o anticoagulante etilenodiaminotetracético sal dissódico - EDTA).

Para sorologia, as amostras foram coletadas sem anticoagulante e mantidas a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por 3 horas. Os soros separados foram centrifugados em centrífuga Costar mini centrifuge a 8.000 g por 7 minutos. Em seguida, foram congelados a -20°C em tubos de 1,5 mL e analisados no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Na análise de anticorpos, estabeleceu-se um protocolo de ELISA, baseado em outros trabalhos, utilizando-se albumina sérica bovina como antígeno (Parmentier et al., 1994; Bar-Shira et al., 2002; Gutierrez et al., 2002). Os soros das aves foram analisados individualmente em duplicata e os resultados foram as médias das densidades óticas determinadas em comprimento de onda de 495 nm em espectrofotômetro Titertek Multiscan MC.

As contagens total e diferencial de leucócitos para medir a relação heterófilo:linfócito foram realizadas no

Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS utilizando-se esfregaços sanguíneos corados com corante de "Wright".

Os dados de hematologia, peso relativo de órgãos linfóides e desempenho foram analisados pelo GLM do programa SAS (2001). Na presença de um F significativo, foi usado o Lsmeans para testar as diferenças entre as médias. Os dados de sorologia, em virtude da falta de distribuição normal, foram transformados por meio de Box-Cox. Efetuou-se também o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados foram semelhantes aos obtidos com a transformação e análise de variância, um bom indicativo da consistência analítica.

Resultados e Discussão

Não houve interação ($P > 0,05$) dos fatores estudados tanto para desempenho e quanto para imunidade. Portanto, serão discutidos apenas os efeitos principais, ou seja, as respostas relacionadas ao ambiente e aos suplementos vitamínico-minerais utilizados.

A inoculação com BSA não teve efeito ($P > 0,05$) sobre o desempenho das aves durante o período de 1 a 35 dias. Durante a resposta imune, alterações importantes acontecem no metabolismo de energia, aminoácidos, lipídios e minerais-traço (Humphrey & Klasing, 2004), que dependem fundamentalmente do antígeno utilizado e do tipo de resposta imune desencadeada (inata ou adaptativa), portanto, a resposta imune inata produz efeitos mais evidentes que a adaptativa. Antígenos protéicos purificados, como a BSA, estimulam a resposta imune adaptativa, sobretudo a produção de anticorpos, e têm pouco ou nenhum efeito sobre a resposta imune inata, na qual ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que, em grande quantidade, são responsáveis pela redução no desempenho. A BSA, por ser um antígeno timo-dependente, requer a presença de linfócitos T_H para induzir a produção de anticorpos. A função efetora dos linfócitos T_H consiste na produção de vários tipos de citocinas em quantidades dependentes da forma de apresentação do antígeno e dos sinais co-estimuladores recebidos pelas células T_H .

O tipo de dieta influenciou o consumo de ração ($P \leq 0,007$) e a conversão alimentar ($P \leq 0,0001$); a dieta controle (D1) proporcionou o maior consumo de ração e a pior conversão alimentar (Tabela 3). As aves em EPC tiveram menor ganho de peso ($P \leq 0,0001$) e menor consumo de ração ($P \leq 0,0001$) em comparação àquelas em ATN, o que era previsível, uma vez que esses resultados são referenciados em vários trabalhos na literatura (Czarick &

Tison, 1990; Smith, 1993; Bonnet et al., 1997; Plavnik & Yahav, 1998; Temim et al., 2000; Laganá & Ribeiro, 2007).

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) para a variável viabilidade no período de 1 a 35 dias de idade. Por ser um antígeno protéico purificado, assim como hemácias de ovinos, a BSA estimula a resposta imune adaptativa, mas praticamente não têm efeito sobre o sistema imune inato (Humphrey & Klasing, 2004), responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias, que ocasionam as alterações mais evidentes de uma resposta imune, como redução de consumo, febre e alterações na homeostase metabólica (Humphrey & Klasing, 2004), que podem contribuir para o aumento da mortalidade.

Como o calor ocorreu de forma cíclica, as aves puderam se adaptar consumindo menos durante os períodos de alta temperatura, o que refletiu em menor consumo de ração sem alterar as taxas de mortalidade. Teeter et al. (1984) observaram que aumento no consumo de ração em frangos em estresse por calor reduziu a sobrevivência em 14%. Cooper & Washburn (1998) e Laganá & Ribeiro (2007) demonstraram que a exposição de frangos a temperaturas de 32°C durante algumas horas do dia não influenciou a mortalidade.

Em virtude da transformação realizada nos dados, os valores de produção de anticorpos observados aos 35 dias de idade se tornaram negativos e aqueles mais próximos de zero foram interpretados como superiores (Tabela 3). As aves inoculadas com BSA apresentaram maior nível de anticorpos em comparação àquelas sem BSA ($P \leq 0,0001$), portanto, apresentaram resposta ao antígeno utilizado. A quantidade de anticorpos não diferiu significativamente entre os tipos de suplementação vitamínico-mineral, porém, houve diferenças em relação ao ambiente. As aves em EPC produziram mais anticorpos contra BSA que aquelas em ATN, independentemente do tipo de suplementação ($P < 0,044$). A maior produção de anticorpos no ambiente quente contrariam informações de Zulkifli et al. (1994) e Thaxton & Siegel (1970, 1972, 1973), que indicaram redução na produção de anticorpos com o aumento da temperatura de criação. Regnier et al. (1980) e Donker et al. (1990) encontraram resultados que indicam não haver efeito redutor do estresse por calor sobre a produção de anticorpos.

Ressalta-se que cada fonte de estresse pode afetar o organismo do animal de forma diferente e, principalmente, as respostas imunológicas podem ser inconsistentes, especialmente quando há grande variação individual, como nas linhagens comerciais, em razão da grande heterozigose.

Tabela 2 - Desempenho de frangos de 1 a 35 dias de idade criados em dois ambientes com dieta suplementada com vitaminas e minerais e desafiados ou não com BSA

	Ganho de peso médio (kg)	Consumo de ração (kg)	Conversão alimentar (%)	Viabilidade
Ambiente				
ATN	2,170a	3,432a	1,58	97,7
EPC	2,031b	3,244b	1,60	95,8
P	<0,0001	<0,0001	0,142	0,34
Dieta				
D1 (controle)	2,099	3,426a	1,63b	96,4
D2 (controle + vitaminas)	2,109	3,319b	1,57a	98,4
D3 (controle + minerais)	2,079	3,303b	1,59a	96,9
D4 (controle + vitaminas + minerais)	2,115	3,304b	1,56a	95,5
P	0,669	0,003	<0,0001	0,76
Inoculação				
Inoculados ¹	2,093	3,318	1,59	97,4
Não inoculados ²	2,108	3,358	1,58	96,2
P	0,501	0,146	0,603	0,55
CV %	3,91	2,84	2,47	8,44

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem ($P < 0,05$) entre si pelo LSmeans.

ATN = ambiente termoneutro (21 a 25°C).

EPC = estresse por calor (25 a 32°C).

D1 = Zn - 80 mg; Se - 0,3 mg; vit. E - 60 mg; vit. C - 0 mg; D2 = D1 + 100 mg vit. E, 300 mg vit. C; D3 = D1 + 40 mg Zn e 0,3 mg Se; D4 = D1 + 100 mg vit. E e 300 mg vit. C + 40 mg Zn e 0,3 mg Se.

¹ Inoculados com BSA; Não inoculados.

Segundo Heckert et al. (2002), muitas técnicas comumente utilizadas em laboratório para avaliar a imunocompetência são úteis em situações controladas e com aves de cruzamentos entre uma mesma raça, porém, podem apresentar grande variabilidade quando utilizadas em linhagens comerciais sob condições de campo. Essa variabilidade pode ser aumentada quando os parâmetros ambientais superam o nível de termotolerância das aves, como no caso de estresse por calor.

Em condições de estresse por frio, os resultados também são bastante conflitantes. Subba Rao & Glick (1977) observaram aumento na produção de anticorpos com frio de 7°C. Regnier et al. (1980) relataram pequeno efeito do frio agudo sobre os títulos de anticorpos contra hemácias de carneiro, enquanto Hester et al. (1996) observaram redução na produção de anticorpos após exposição à temperatura de 0°C apenas em aves alojadas em gaiolas individuais e não naquelas em gaiolas coletivas.

Em alguns trabalhos que indicam apenas respostas positivas da suplementação de vitamina E sobre o sistema imune, foram utilizados níveis mais altos que os deste trabalho; Ferket et al. (1993) observaram maior produção de anticorpos contra hemácias de ovinos com 300 UI vit. E/kg ração. Por outro lado, Leshchinsky & Klasing (2001) observaram aumento na produção de anticorpos contra hemácias de ovino com suplementação de vitamina E em níveis médios (50 UI/kg), mas o mesmo não ocorreu quando níveis

superiores foram utilizados (100 e 200 UI/kg). Diferenças nas condições ambientais, na intensidade dos desafios ou a própria variação individual entre as aves podem explicar as respostas encontradas na literatura.

A inoculação com BSA provocou aumento nos pesos absoluto e relativo da bursa (Tabela 4), que, por ser um órgão linfóide primário, responsável pelo desenvolvimento e pela proliferação de linfócitos B, pode ter seu tamanho aumentado após estímulo antigênico. Os pesos de baço não foram influenciados pela inoculação. Segundo Abbas (2000), o baço é considerado um órgão linfóide secundário, por ser importante mas não indispensável para o sistema imune. Alterações no peso do baço podem não ser tão indicativas do perfil imunológico do animal quanto o peso de bursa.

O ambiente influenciou significativamente os pesos absoluto e relativo de baço e bursa, uma vez que as aves em EPC tiveram menores pesos desses órgãos. Rosales et al. (1989) observaram que aves em EPC apresentaram atrofia de timo, bursa e baço. Puvadolpirod & Thaxton (2000) notaram que o peso relativo de baço reduziu 27%, o de bursa em 43% e o de timo em 65% uma semana após injeção de doses de ACTH em frangos de corte de 5 semanas de idade.

Os dados observados nesta pesquisa foram semelhantes aos descritos por Donker & Beuving (1989) e indicam que índices morfométricos bursais são bons indicativos de estresse, que, por sua vez, causa involução nos órgãos

Tabela 3 - Densidade ótica de anticorpos anti-BSA no soro de frangos aos 35 dias de idade, desafiados ou não com BSA, criados em dois ambientes e alimentados com dietas suplementadas com vitaminas e minerais

Fator	Densidade ótica*
Ambiente	
ATN	0,22b
EPC	0,27a
P	0,04
Dieta	
D1 (Controle)	0,19
D2 (Controle + vitaminas)	0,34
D3 (Controle + minerais)	0,29
D4 (Controle + vitaminas + minerais)	0,15
P	0,33
Inoculação com BSA	
Inoculados	0,38a
Não inoculados	0,10b
P	<0,0001
CV %	24,7

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem ($P < 0,05$) entre si pelo LSmeans.

*Dados analisados por transformação Box- Cox.

ATN = ambiente termoneutro (21 a 25°C)

EPC = estresse por calor (25 a 32°C).

D1 = 80 mg Zn; 0,3 Se, 60 mg vit. E, 0 mg vit. C; D2 = D1+ 100 mg vit. E e 300 mg vit. C; D3 = D1+ 40 mg Zn e 0,3 mg Se; D4 = D1+100 mg vit. E e 300 mg vit. C + 40 mg Zn e 0,3 mg Se.

linfóides primários. Embora as aves tenham sido submetidas ao estresse por apenas três semanas, a involução dos órgãos linfóides pôde ser observada mesmo em situação de EPC cíclico.

A suplementação vitamínico-mineral da dieta não influenciou os pesos absoluto e relativo de bursa e baço. Bartlett & Smith (2003) também não encontraram diferenças no peso relativo de órgãos linfóides de frangos em EPC cíclico alimentados com rações suplementadas com 32, 40 e 100 ppm de zinco.

Não foi observada interação significativa entre os fatores analisados para a contagem diferencial de leucócitos (Tabela 5). A inoculação com BSA não provocou diferenças significativas no número de heterófilos e linfócitos totais nem na relação H/L, o que confirma que a inoculação não representou uma causa de estresse para as aves. Por outro lado, o ambiente influenciou o número de heterófilos totais ($P \leq 0,088$), assim como a relação H/L ($P \leq 0,039$), pois as aves em EPC apresentaram maior relação H:L em comparação àquelas em ATN. Aves expostas a agentes estressantes de diferente natureza (temperatura, trauma, drogas,

patógenos, manejo) têm o sistema nervoso ativado, ocorrendo a liberação de adrenalina e noradrenalina e também de corticosterona, que age para aumentar o suprimento de energia do organismo. Um estresse persistente significa secreção prolongada de corticosterona, o que causa inúmeros prejuízos ao animal, inclusive no sistema imune. Os corticosteróides provocam leucocitose, com neutrofilia e linfopenia, e conseqüente aumento na relação neutrófilo:linfócito (Colditz, 2002). Altan et al. (2000) encontraram resultados semelhantes, com aumento de 34% nos heterófilos de frangos de 42 dias de idade expostos a um EPC agudo de 39°C por 2 horas. Mitchell et al. (1992) e Laganá & Ribeiro (2007) encontraram relações H/L superiores a 0,62 em frangos durante o transporte por mais de 3 horas e em altas temperaturas, respectivamente.

O número de linfócitos não foi influenciado ($P = 0,64$) pelo ambiente, embora as aves em EPC tenham apresentado menor número de linfócitos totais, concordando com Macari & Luquetti (2002), que relataram que, em situações de estresse, com a liberação de ACTH, ocorre redução do número de linfócitos circulantes, colaborando para aumentar a relação H/L.

A suplementação com minerais e vitaminas não afetou significativamente o número de heterófilos e linfócitos e a relação H/L. Puthongsiriporn et al. (2001), no entanto, observaram aumento no número de linfócitos com a suplementação de 65 UI de vit. E/kg de ração, enquanto Campo & Dávila (2000) verificaram que galinhas estressadas pelo calor e alimentadas com rações suplementadas com 1.000 ppm de vitamina C, 250 ppm de vitamina E, 0,5% de triptofano e 250 ppm de niacina apresentaram linfopenia e redução na relação heterófilo: linfócito (0,65 vs 0,43) em relação às aves sem suplementação.

Conclusões

A suplementação de vitaminas E e C e dos minerais orgânicos zinco e selênio não influenciou a produção de anticorpos de frangos de corte desafiados com albumina sérica bovina; no entanto, o estresse por calor provocou maior produção de anticorpos contra esse antígeno. A inoculação com albumina sérica bovina mostrou-se um recurso adequado para avaliar imunidade humoral de frangos, uma vez que as aves responderam com aumento na produção de anticorpos e no tamanho de bursa. Além disso, o desafio, independentemente do ambiente e da dieta, não afetou o desempenho das aves.

Tabela 4 - Pesos (P) absolutos (g) e relativos (rel) (%) de baço e bursa de frangos de 35 dias desafiados ou não com BSA, criados em dois ambientes e alimentados com dietas suplementadas com vitaminas e minerais

	Peso bursa	Peso relativo bursa	Peso baço	Peso relativo baço
Ambiente				
ATN	4,81a	0,21a	2,37a	0,10a
EPC	3,43b	0,16b	1,72b	0,08b
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Dieta				
D1 (controle)	4,25	0,19	2,05	0,09
D2 (controle + vitaminas)	4,08	0,18	2,00	0,09
D3 (controle + minerais)	4,40	0,21	2,00	0,09
D4 (controle + vitaminas + minerais)	3,74	0,17	2,11	0,09
P	0,13	0,09	0,87	0,80
Inoculação com BSA				
Inoculados	4,44a	0,20a	2,07	0,09
Não-inoculados	3,79b	0,17b	2,02	0,09
P	0,003	0,003	0,68	0,73
CV %	28,12	27,68	31,15	30,67

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem (P<0,05) entre si pelo LSmeans.

ATN = ambiente termoneutro, 21 a 25°C.

EPC = estresse por calor, 25 a 32°C.

D1 = 80 mg Zn; 0,3 Se, 60 mg vit. E, 0 mg vit. C; D2 = D1 + 100 mg vit. E e 300 mg vit. C; D3 = D1 + 40 mg Zn e 0,3 mg Se; D4 = D1 + 100 mg vit. E e 300 mg vit. C + 40 mg Zn e 0,3 mg Se.

Tabela 5 - Valores de heterófilos, linfócitos por μL e relação H/L de frangos de 35 dias desafiados ou não com BSA, criados em dois ambientes e alimentados com dietas suplementadas com vitaminas e minerais

	Heterófilos	Linfócitos	Relação H/L
Ambiente			
ATN	10.602	15.969	0,69a
EPC	12.275	15.578	0,84b
P	0,09	0,64	0,04
Dieta			
D1 (controle)	11.288	15.499	0,80
D2 (controle + vitaminas)	12.268	15.583	0,84
D3 (controle + minerais)	11.212	16.361	0,70
D4 (controle + vitaminas + minerais)	10.988	15.651	0,73
P	0,79	0,89	0,47
Inoculação com BSA			
Inoculados	11.418,81	15.543,00	0,74
Não inoculados	11.458,91	16.004,03	0,78
P	0,969	0,604	0,574
CV %	47,49	30,25	49,94

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem (P<0,05) entre si pelo LSmeans.

ATN = ambiente termoneutro, 21 a 25°C.

EPC = estresse por calor, 25 a 32°C.

D1 = 80 mg Zn; 0,3 Se, 60 mg vit. E, 0 mg vit. C.

D1 = 80 mg Zn; 0,3 Se, 60 mg vit. E, 0 mg vit. C; D2 = D1 + 100 mg vit. E e 300 mg vit C; D3 = D1 + 40 mg Zn e 0,3 mg Se; D4 = D1 + 100 mg vit. E e 300 mg vit. C + 40 mg Zn e 0,3 mg Se.

Literatura Citada

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. 553p.
- AL-MURRANI, W.K.; KASSAB, A.; AL-SAM, H.Z. et al. Heterophil/ lymphocyte ratio as a selection criterion for heat resistance in domestic fowls. **British Poultry Science**, v.38, p.159-163, 1997.
- ALTAN, O.; ALTAN, A.; ÇABUC, M. et al. Effects of heat stress on some blood parameters in broilers. **Turkish Journal Animal Science**, v.24, n.2, p.145-148, 2000.
- BAR-SHIRA, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. **Developmental & Comparative Immunology**, v.27, p.147-157, 2003.
- BARTLETT, J.R.; SMITH, M.O. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. **Poultry Science**, v.82, n.10, p.1580-1588, 2003.
- BLALOCK, J.L.; THAXTON, J.P.; GARLICH, J.D. Humoral immunity in chicks experiencing marginal vitamin B-6 deficiency. **Journal Nutrition**, v.114, p.312-322, 1984.
- BONNET, S.; GERAERT, P.A.; LESSIRE, M. et al. Effect of high ambient temperature on feed digestibility in broilers. **Poultry Science**, v.76, n.6, p.857-863, 1997.
- BRAKE, J.T. Role of ascorbic acid in poultry production: ascorbic acid, stress and immunity. **Zootechnic International**, p.37-40, 1989.
- CAMPO, J.L.; DÁVILA, S.G. Changes in heterophils to lymphocyte ratios of heat-stressed chickens in response to dietary supplementation of several related stress agents. **European Poultry Science**, v.66, p.80-84, 2002.
- COLDITZ, I.G. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. **Livestock Production Science**, v.75, p.257-268, 2002.
- COMBS, G.F. Influence of high dietary levels of vitamin-A on vitamin-E-selenium deficiency in chick. **Poultry Science**, v.54, n.5, p.1749-1750, 1975.
- COOPER, M.A.; WASHBURN, K.W. The relationship of body temperature to weight gain, feed consumption and feed utilization in broilers under heat stress. **Poultry Science**, v.77, n.2, p.237-242, 1998.
- CZARICK, M.; TISON, B.L. Reflective roof coatings on commercial laying houses. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v.90, p.4512, 1990.
- DONKER, R.A.; BEUVING, G. Effect of corticosterone infusion on plasma corticosterone concentration, antibody production, circulating leukocytes and growth in chicken lines selected for humoral immune responsiveness. **British Poultry Science**, v.30, n.3, p.361-369, 1989.
- DONKER, R.A.; NIEUWLAND, M.G.B.; Van Der ZIJPP, A.J. Heat-stress influences on antibody production in chicken selected for high and low immune responsiveness. **Poultry Science**, v.69, p.599-607, 1990.
- EL-BOUSHY, A.R. Vitamin E affects viability, immune response of poultry. **Feedstuffs**, v.60, n.4, p.20-26, 1988.
- FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Performance and immunity of heat-stressed broilers fed vitamin and electrolyte supplemented drinking water. **Poultry Science**, v.71, p.88-97, 1992.
- GOGAL, R.M.J.; AHMED, S.A.; LARSEN, C.T. Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, nonradioactive assay (Lympho-Pro). **Avian Disease**, v.41, p.714-721, 1997.
- GUTIERRO, I.; HERNANDEZ, R.M.; IGARTUA, M. et al. Size dependent immune response after subcutaneous, oral, and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. **Vaccine**, v.21, p.67-77, 2002.
- HECKERT, R.A.; ESTEVEZ, I.; RUSSEK-COHEN, E. et al. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, v.81, p.451-457, 2002.
- HESTER, P.Y.; MUIR, W.M.; CRAIG, J.V. Group selection for adaptation to multiple-hen cages: humoral immune response. **Poultry Science**, v.75, p.1315-1320, 1996.
- HOLT, P.S.; GAST, R.K.; PORTER JR., R.E. et al. Hyporesponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune systems in chickens infected with *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* at one day of age. **Poultry Science**, v.78, p.1510-1517, 1999.
- 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.
- KIDD, M.T.; QURESHI, M.A.; FERKET, P.R. et al. Dietary zinc-methionine enhances mononuclear-phagocytic function in young turkeys. **Biological Trace Element Research**, v.42, p.217-229, 1994.
- KLASING, K.C. Effects of inflammatory agents and interleukin-1 on iron and zinc metabolism. **American Journal of Physiology**, v.247, n.5, p.901-904, 1984.
- LAGANÁ, C.; RIBEIRO, A.M.L. A influência da temperatura na alimentação de frangos de corte. **Boletim da Indústria Animal**, v.64, n.1, p.79-89, 2007.
- LESHCHINSKY, T.V.; KLASING, K.C. Relationship between the level of dietary vitamin E and Immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, v.80, p.1590-1599, 2001.
- MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2.ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p.17-36.
- MILLER, L.; QURESHI, M.A. Induction of heat shock proteins and phagocytic function of chicken macrophage following *in vitro* heat exposure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.37, n.1, p.34-42, 1991.
- MONTGOMERY, R.D.; BOYLE, C.R.; MASLIN, W.R. Influence of antigen concentration, inoculation interval, number of exposures, type of housing, and placement concentration on the tear antibody response to *Brucella abortus* in chickens. **Avian Disease**, v.35, p.606-614, 1991.
- PARDUE, S.L.; THAXTON, J.P. Evidence for amelioration of steroid-mediated immunosuppression by ascorbic acid. **Poultry Science**, v.63, p.1262-1268, 1984.
- PARDUE, S.L.; THAXTON, J.P.; BRAKE, J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. **Journal Applied Physiology**, v.58, p.1511-1516, 1985.
- PARENTIER, H.K.; SIEMONSMA, R.; NIEUWLAND, M.G.B. Immune responses to bovine serum albumin in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Poultry Science**, v.73, p.825-835, 1994.
- PATTERSON, P.H.; SIEGEL, H.S. Impact of cage density on pullet performance and blood parameters of stress. **Poultry Science**, v.77, p.32-40, 1998.
- PLAVNIK, I.; YAHAV, S. Effect of environmental temperature on broiler chickens subjected to growth restriction at an early age. **Poultry Science**, v.77, n.6, p.870-872, 1998.
- POPE, C.R. Pathology of lymphoid organs with emphasis on immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p.31-44, 1991.
- PUVADOLPIROV, S.; THAXTON, J.P. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. **Poultry Science**, v.79, n. 4, p.363-369, 2000.
- PUTHONGSIRIPORN, U.; SCHEIDELER, S.E.; SELL, J.L. et al. Effects of vitamin E and C supplementation on performance, *in vitro* lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. **Poultry Science**, v.80, p.1190-1200, 2001.
- REGNIER, J.A.; KELLEY, K.W.; GASKINS, C.T. Acute thermal stressors and synthesis of antibodies in chickens. **Poultry Science**, v.59, p.985-990, 1980.
- ROSALES, A.G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P.D. et al. Isolation, identification and pathogenicity of two strains of infectious bursal virus. **Avian Disease**, v.33, p.35-41, 1989.

- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2000. p.141.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's Guide (8.2).** Cary: 2001. (CD-ROM).
- SCOTT, T.R.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. *Brucella abortus* antibody response of White Leghorn chickens selected for high and low antibody responsiveness to sheep erythrocytes. **Poultry Science**, v.73, p.346-349, 1994.
- SIEGEL, P.B. Stress and immunity. In: NATIONAL MEETING ON POULTRY HEALTH AND CONDEMNATIONS, 14., 1989, College Park. **Proceedings...** College Park: 1989. p.157-160.
- SMITH, M.O. Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. **Poultry Science**, v.72, p.1146-1150, 1993.
- SUBBA RAO, D.S.V.; GLICK, B. Effects of cold exposure on the immune response of chickens. **Poultry Science**, v.56, p.992-996, 1977.
- TALEBI, A.; TORGERSON, P.R.; MULCAHY, G. Optimal conditions for measurement of blastogenic responses of chickens to concanavalin a in whole blood assays. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.46, p.293-301, 1995.
- TEETER, R.G.; SMITH, M.O.; MURRAY, E. Force feeding methodology and equipment for poultry. **Poultry Science**, v.63, p.573-575, 1984.
- TEMIM, S.; CHAGNEAU, A.M.; GUILLAUMIN, S. et al. Does excess dietary protein improve growth performance and carcass characteristics in heat-exposed chickens? **Poultry Science**, v.79, p.312-317, 2000.
- THAXTON, P.; SIEGEL, H.S. Immunodepression in young chickens by high environmental temperature. **Poultry Science**, v.49, p.202-205, 1970.
- THAXTON, P.; SIEGEL, H.S. Depression of secondary immunity by high environmental temperature. **Poultry Science**, v.51, p.1519-1526, 1972.
- THAXTON, P.; SIEGEL, H.S. Modification of high temperature and ACTH-induced immunodepression by metyrapone. **Poultry Science**, v.52, p.618-624, 1973.
- THORNTON, P.A. Increased environmental temperature influences on ascorbic acid activity in the domestic fowl. **Federation Proceedings**, v.20, p.210 (Abstract), 1961.
- ZULKIFLI, I.; DUNNINGTON, E.A.; GROSS, W.B. et al. Inhibition of adrenal steroidogenesis, food restriction and acclimation of high ambient temperatures in chickens. **British Poultry Science**, v.35, p.417-426, 1994.