

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUISTA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO ESTRESSE TERMICO E SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA COM
ARGININA E VITAMINA C NO DESEMPENHO E IMUNIDADE DE FRANGOS DE
CORTE**

ÉRICA SANTOS MELLO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor
em Zootecnia

Botucatu
Agosto – 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO ESTRESSE TERMICO E SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA COM
ARGININA E VITAMINA C NO DESEMPENHO E IMUNIDADE DE FRANGOS DE
CORTE**

ÉRICA SANTOS MELLO

Orientador: Dr. José Roberto Sartori

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor
em Zootecnia

BOTUCATU – SP
Agosto – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mello, Érica Santos.

Efeito do estresse termico e suplementação da dieta com arginina e vitamina C no desempenho e imunidade de frangos de corte / Érica Santos Mello. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Roberto Sartori Capes:
50403001

1. Frango de corte. 2. Imunidade. 3. Antioxidantes.
4. Expressão gênica. 5. Arginina. 6. Vitamina C.

BIOGRAFIA DO AUTOR

ÉRICA SANTOS MELLO – Nasceu no dia 29 de Dezembro de 1990, em São Sebastião do Paraíso – MG. Em 2010 ingressou no curso de Zootecnia da faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Unesp, Campus de Ilha Solteira concluindo o Curso em Dezembro de 2014 como melhor aluna da VIII turma de Zootecnia. Sob orientação da Prof.^a Dr^a Rosangela da Silva de Laurentiz em 2012 foi bolsista Fapesp de iniciação científica com duração de 24 meses. Iniciou em 2015 mestrado em Ciência e Tecnologia Animal na mesma instituição sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz, bolsista CAPES e Fapesp de mestrado, concluindo em 2017. Ingressou no Doutorado em 2017 em Zootecnia no programada da pós graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Campus de Botucatu.

Dedico

Aos meus pais Maria Luiza e Paulo Roberto e ao meu irmão Victor pelo qual eu agradeço a Deus todos os dias. Família maravilhosa cheia de amor e carinho que sempre me apoiam para que eu conquiste meus objetivos, que me deram valores, ensinamentos e me fizeram ser quem eu sou hoje.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Sartori, muito obrigada pela confiança depositada em mim e principalmente pela oportunidade para realização desta tese.

Ao Dr. Samir Moura Kadri, pela amizade, ensinamentos e por disponibilizar seu tempo para me ajudar nas análises no laboratório que foram muito importantes para realização dessa tese.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, por sempre me ajudar e tirar minhas dúvidas.

Ao Thiago pelas conversas, amizade e ajuda durante o experimento.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição de Aves (Lab Aves), pois, sem vocês não teria sido possível realizar o experimento para concretização dessa tese e por todo aprendizado que tive com vocês.

Aos meus amigos Evaristo Geraldelli Junior, Natalia da Paz, Pedro Pereira, Julianna Batistioli, Giovana Alves, Thais Zarili, Karina Barbosa, Leonarto Ito Perilo e a todos meus amigos do Rotaract de Botucatu Bons Ares por todos os momentos que tivemos de alegrias e dificuldades durante essa longa fase.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp de Botucatu, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos demais professores da FMVZ que passaram por minha vida durante a pós-Graduação pelo trabalho e por todo ensinamento passado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

A produção avícola no Brasil enfrenta um grande desafio que é o estresse por calor, ele pode afetar negativamente o sistema imunológico reduzindo o desempenho produtivo. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação da arginina e da vitamina C sobre o desempenho e resposta imune de frangos de corte em ambiente de termoneutralidade e estresse cíclico pelo calor. Foram utilizados 384 frangos de corte machos no período de 1 a 35 dias de idade. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema fatorial 3x2x2: 3 níveis de inclusão de arginina digestível (100, 130 e 160% da exigência da arginina), dois níveis de inclusão de vitamina C (0 e 200 ppm) e 2 temperaturas (termoneutralidade e estresse cíclico por calor) totalizando 12 tratamentos com 8 repetições de 4 aves cada. Foram avaliados índices zootécnicos, hemograma completo, perfil bioquímico sorológico, peso relativo dos órgãos imunes, histomorfometria Bursa de Fabricius e expressão relativa dos genes *HSP 70* e *GPx* utilizando-se o gene actina como controle interno. O estresse cíclico por calor teve impactos negativos nos frangos de corte, reduzindo o consumo de ração e, por consequência, o ganho de peso aos 21 e 35 dias. Aos 21 e 35 dias de idade a suplementação de 200 ppm de vitamina C na dieta dos frangos de corte melhorou o consumo de ração e o ganho de peso dos frangos, entretanto, não influenciou o peso dos órgãos imunes e as concentrações séricas de glicose, colesterol e creatina quinase. Aos 35 dias de idade, a suplementação da arginina não influenciou o desempenho dos frangos, o peso dos órgãos, a concentração de glicose e de creatina quinase, mas influenciou a concentração sérica de colesterol. A vitamina C e a Arginina aumentaram a porcentagem da área do córtex da Bursa. E a inclusão de arginina e vitamina C aumentou a expressão genica *HSP 70* e do *GPx*. Concluiu-se os frangos de corte quando recebem vitamina C sofrem uma resposta ao estresse menos severa após exposição a altas temperaturas e a suplementação de Arginina e vitamina C aumentou a expressão genica do *HSP 70* dando maior resistência as aves durante períodos de calor e a expressão de *GPx* que indicando um aumento na atividade antioxidante de frangos de corte.

Palavras-chave: ácido ascórbico, aminoácido funcional, antioxidante, expressão gênica

ABSTRACT

Brazilian poultry production faces a major challenge that is heat stress, it affects negatively the immune system, reducing productive performance. The aim of this study was to evaluate supplementation of arginine and vitamin C effects on performance and immune response of broilers in thermoneutrality and cyclic heat stress environments. A total of 384 male broilers from 1 to 35 days of age were allotted in a 3x2x2 completely randomized factorial scheme: 3 digestible arginine levels (100, 130 and 160% of the requirement), two vitamin C levels (0 and 200 ppm) and 2 temperatures (thermoneutrality and cyclic heat stress), totaling 12 treatments with 8 repetitions of 4 birds each. Zootechnical indexes, complete blood count, serological biochemical profile, relative weight of immune organs, Bursa of Fabricius histomorphometry and relative expression of HSP 70 and GPx genes, using the actin gene as an internal control, were evaluated. Cyclic heat stress had negative impacts on broilers, reducing feed intake and, consequently, weight gain at 21 and 35 days. At 21 and 35 days of age, supplementation of 200 ppm of vitamin C improved feed intake and weight gain, however, did not influence immune organs weight and serum glucose concentrations, cholesterol and creatine kinase. At 35 days of age, arginine supplementation did not influence the performance of the chickens, the organs weight, concentration of glucose and creatine kinase, but it did influence the serum concentration of cholesterol. Vitamin C and Arginine increased the Bursa cortex percentage. The inclusion of arginine and vitamin C increased HSP 70 and GPx gene expression. In conclusion, broilers when receiving vitamin C undergo a less severe stress response after exposure to high temperatures, and supplementation of arginine and vitamin C increased the genetic expression of HSP 70 promoting greater resistance during periods of heat. The expression of GPx indicates an increase in antioxidant activity of broilers.

Keywords: ascorbic acid, functional amino acid, antioxidante, gene expression

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Figura 1. As três principais barreiras que protegem um animal contra a invasão microbiana. Cada barreira forma uma defesa mais eficaz do que a anterior (fonte: tizard, 2014). | 7 |
| Figura 2. Estrutura molecular da l-arginina..... | 13 |
| Figura 3. Mecanismo ilustrativo da ausência da biossíntese de l-arginina nas aves. | 14 |
| Figura 4. Estrutura molecular do ácido ascórbico (forma natural), ácido semidehidroascórbico (forma intermediária) e ácido dehidroascórbico (forma natural). | 17 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Tratamentos experimentais. | 28 |
| Tabela 2. Temperaturas (°C) preconizadas para as câmaras termoneutra e de estresse cíclico. | 28 |
| Tabela 3. Composição percentual e nutricionais das rações basais. | 30 |
| Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores de genes da actina, do HSP70 e do GPX. | 33 |
| Tabela 5. Desempenho dos frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina c aos 7, 21 e 35 dias de idade. | 34 |
| Tabela 6. desdobramento da interação nível arginina e vitamina C para ganho de peso (GP) ganho de peso diário (GPD) e consumo de ração (CR) aos 7 e 21 dias de idade. | 35 |
| Tabela 7. Peso relativo de órgão do sistema imune e percentual do córtex da bursa de frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina C criados em termoneutralidade e estresse por calor. | 36 |
| Tabela 8. Desdobramento da interação nível arginina, vitamina C e temperatura para o percentual do córtex da bursa. | 37 |
| Tabela 9. Dados séricos bioquímicos suplementados com arginina e vitamina C criados em termoneutralidade e estresse por calor. | 38 |
| Tabela 10. valores hematológicos de frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina C aos 10 dias de idade. | 39 |
| Tabela 11. Desdobramento da interação nível arginina e temperatura para hematócrito, leucócitos e hemoglobina aos 10 dias. | 40 |
| Tabela 12. Desdobramento da interação nível arginina, vitamina C e temperatura para heterofilos aos 10 dias de idade. | 40 |
| Tabela 13. Valores hematológicos de frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina C aos 35 dias de idade. | 42 |
| Tabela 14. Desdobramento da interação nível arginina, vitamina C e temperatura para hemácias de frangos de corte aos 35 dias. | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------|--|
| ARG | Arginina |
| CA | Conversão alimentar |
| CR | Consumo de ração |
| CV | Coefficiente de variação |
| DI | Decilitro |
| FMVZ | Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia |
| GDP | Ganho diário de peso |
| GP | Ganho de peso |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| HSP70 | Heat shock proteins (Proteína de choque térmico) |
| L | Litro |
| Mg | Miligrama |
| UI | Unidade Internacional |
| Vit C | Vitamina C |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1 | 3 |
| 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 4 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 6 |
| 2.1. Imunologia aviária | 6 |
| 2.2. Nutrição na avicultura | 8 |
| 2.3. Aminoácidos | 10 |
| 2.4. Arginina | 12 |
| 2.4.1. Absorção, metabolismo e funções da arginina | 14 |
| 2.5. Vitaminas utilizadas na avicultura de corte | 16 |
| 2.6. Vitamina C | 17 |
| 3. OBJETIVOS..... | 18 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 19 |
| CAPÍTULO 2 | 23 |
| 1. INTRODUÇÃO | 26 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 2.1. Animais, instalações e delineamento experimental | 27 |
| 2.2. Rações experimentais | 28 |
| 2.3. Parâmetros avaliados | 29 |
| 2.3.1. Desempenho zootécnico | 29 |
| 2.3.2. Perfil bioquímico sorológico | 31 |
| 2.3.3. Peso relativo de órgãos do sistema imune | 31 |
| 2.3.4. Hemograma completo | 31 |
| 2.3.5. Histomorfometria da Bursa de Fabrício | 32 |
| 2.3.6. Expressão gênica da <i>HSP70</i> e <i>GPx</i> | 32 |
| 3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 33 |
| 4. RESULTADOS | 33 |
| 4.1. Desempenho zootécnico | 33 |
| 4.2. Peso relativo de órgãos e histomorfometria de bursa de Fabrício | 36 |
| 4.3. Perfil bioquímico | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4. Hemograma completo, contagem diferencial de leucócitos. | 38 |
| 4.5. Expressão genica da <i>HSP 70</i> e <i>GPx</i> | 43 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 46 |
| 6. CONCLUSÃO | 49 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| 1. Implicações..... | 54 |

CAPÍTULO 1

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A avicultura brasileira evoluiu muito com o passar do tempo e tem se mostrado capaz de atender as grandes demandas de carne de frango do mercado nacional e mundial. Essa evolução foi consequência de um trabalho intenso de todos os envolvidos da cadeia produtiva através do aperfeiçoamento de técnicas de manejo e sanidade, do melhoramento genético e da nutrição que resultaram em um produto com qualidade, sanidade, sustentabilidade e que, aliados a preços competitivos, levaram o frango brasileiro a estar presente em mais de 150 países, sendo que, desde 2004, o Brasil é o maior exportador mundial (ABPA, 2020).

Em 2016, o Brasil consolidou-se como 2º maior produtor de carne de frango ultrapassando a China e ficando atrás somente dos Estados Unidos. Entretanto, em 2019 a China ultrapassou o Brasil que tornou-se o 3º maior produtor de carne de frango produzindo em 2019 um total de 13,245 milhões de toneladas de carne de frango; desta produção, 68% foram destinados ao mercado interno e 32% destinado às exportações (ABPA, 2020).

O Brasil é um país de clima tropical possuindo elevadas temperaturas durante o ano influenciando negativamente a produção avícola. As aves são animais homeotérmicos que mantêm a temperatura corpórea dentro de uma faixa constante independente das variações térmicas ambientais (NAVAS et al., 2016) mas, sua capacidade de retenção de calor é mais eficiente do que a capacidade de dissipação deste, tornando-as suscetíveis ao estresse pelo calor, sendo, atualmente, um dos fatores responsáveis pelo sucesso ou fracasso dos empreendimentos avícolas (NASCIMENTO; SILVA, 2008).

Na zona de conforto térmico ou de termoneutralidade, a produtividade é máxima e, considerando que todas as variáveis que afetam o desempenho estão em condições ótimas, não há gastos de energia ou atividade metabólica para manter a homeostase. Porém, em condições ambientes onde temperatura efetiva está fora da zona termoneutra, as aves utilizam seus mecanismos fisiológicos e comportamentais para manter a normotermia, gastando energia e alocando nutrientes que seriam destinados a produção, causando drástica queda nos índices zootécnicos.

Além disso, em situações de estresse térmico, o frango reduz o consumo de alimento para diminuir a produção de calor metabólico (BÍCEGO et al., 2017) diminuindo a disponibilidade de nutrientes para o metabolismo, prejudicando a taxa de crescimento, rendimento de carcaça e qualidade de carne e isto, associado ao gasto de energia para dissipar o calor, desfavorece ainda mais o ganho de peso (NAVAS et al., 2016), além de afetar negativamente a digestão e absorção de nutrientes, piorar a conversão alimentar, reduzir a

proporção de músculo do peito e aumentar a proporção de gordura abdominal (GERAERT et al., 1996).

A perda de calor corporal nas aves envolve mecanismos de perda de calor sensível e latente. Em ambientes quentes, quando a perda de calor sensível é reduzida e não é suficiente para manter a normotermia, há aumento da frequência respiratória resultando em perdas excessivas de dióxido de carbono (CO₂) podendo causar desequilíbrio ácido-base denominado de alcalose respiratória, que junto ao aumento da temperatura corporal (hipertermia), pode levar à alta mortalidade das aves (BORGES et al., 2003).

Além disso, o estresse é responsável pela imunossupressão em função de complexos mecanismos que são desencadeados e que podem atuar no sistema imunológico das aves comprometendo suas defesas. Em condições de estresse há aumento da secreção glicocorticoides e da presença de aminas biogênicas na corrente sanguínea. Os glicocorticoides estão associados ao aumento de suscetibilidade às doenças, involução do tecido linfóide, modificações na dinâmica de células imunológicas circulantes, supressão de citocinas, entre outros efeitos indesejáveis. As aminas não atuam somente sobre as respostas imunológicas mas, também, favorecendo o crescimento de microrganismos, sugerindo que as aminas podem ter um efeito direto no metabolismo de microrganismos (SANTIN et al., 2017).

O sistema imunológico afeta diretamente a obtenção de altos níveis zootécnicos de produção, pois é responsável pelos mecanismos que visam proteger o organismo contra patógenos, aos quais os frangos estão expostos em diferentes níveis nos locais de criação. Além disso, afeta todas as funções fisiológicas, que podem ser comprometidas em situação de baixa imunidade associadas à alta incidência de desafios. Deste modo, é de suma importância que o sistema imune esteja atuando de forma eficiente para garantir a saúde das aves e impedir a diminuição do desempenho produtivo (SANTIN et al., 2017).

A nutrição se constitui em um dos principais fatores de sucesso e de retorno econômico na produção de frangos de corte. Há vários anos a nutrição deixou de ser trabalhada apenas como maneira de atender as exigências nutricionais, maximizar o desempenho dos frangos e prevenir deficiências de nutrientes e, atualmente, passou a ser vista como uma atraente forma de modular e promover respostas imunológicas mais eficientes nas aves, mas ainda faltam conhecimentos para o entendimento de como esse tipo de interferência afeta o sistema imune (SANTIN et al., 2017).

Portanto, é importante para a produção avícola que a nutrição caminhe junto com estudos da saúde animal, visto que a nutrição pode modular quantitativa e qualitativamente

aspectos da resposta imune. Assim, a nutrição tem papel importante na capacidade da ave em suportar desafios estressantes e manter a produtividade.

Dessa forma, o uso de imunoestimulantes como a arginina e o uso de antioxidantes como a vitamina C podem ser estratégias promissoras para minimizar os impactos negativos das condições de estresse e melhorar a imunidade dos frangos de corte.

Diante do exposto, maneiras de amenizar as perdas na produtividade de frango de corte em situação de estresse pelo calor por meio de ajustes nutricionais, são de grande interesse acadêmico, haja visto que, modificações estruturais das instalações e equipamentos, que são medidas de grande efeito contra o estresse pelo calor, mas de maior custo, podem tornar-se ainda mais efetivas se associadas aos ajustes nutricionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Imunologia aviária

O sistema imunológico é responsável pela sobrevivência do animal através da formação e desencadeamento de mecanismos que visam proteger o organismo contra as ameaças representadas por qualquer tipo de agente potencialmente nocivo.

O tecido animal é extremamente atraente aos microrganismos, que o invadem, para aproveitar todos os componentes necessários para a manutenção da vida, como calor, umidade e muitos nutrientes que o organismo dos animais possuem causando doenças ou podendo levar a morte, dessa forma, o sistema imunológico eficaz é essencial à vida. A proteção do organismo depende de um complexo sistema de mecanismos de defesa interligados que, juntos, eliminam ou controlam quase todos os microrganismos invasores (Figura 1). O primeiro mecanismo de defesa é uma barreira física impedindo a penetração dos microrganismos, logo em seguida, o sistema imunológico age internamente eliminando aqueles que superaram as defesas externas. Uma falha nestes mecanismos, tanto pela destruição do sistema quanto por sua superação pelo microrganismo, causa doença e pode levar a morte (TIZARD, 2014).

O sistema imunológico das aves é funcionalmente semelhante ao dos mamíferos, mas possui uma série de particularidades que o diferenciam do ponto de vista anatômico e funcional (SANTIN et al., 2017). A resposta imunológica das aves como de outros vertebrados é formada pela imunidade natural/inata e adquirida/específica.

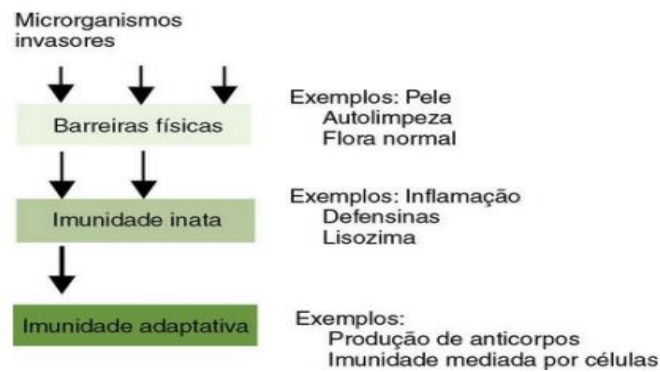


Figura 1. As três principais barreiras que protegem um animal contra a invasão microbiana. Cada barreira forma uma defesa mais eficaz do que a anterior (Fonte: TIZARD, 2014).

A imunidade inata é a imunidade que já nasce com o indivíduo e existe independente da presença de imunógenos e, é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores sendo composta por barreiras físicas e químicas, células de defesa como macrófagos, células dendríticas, células *natural Killer* (NK) e heterófilos, além de enzimas, proteínas e peptídeos de defesa incluindo membros do sistema complemento. Nas aves os heterófilos são células semelhantes aos neutrófilos em mamíferos, sendo as primeiras células a aparecerem no sítio da infecção (SANTIN et al., 2017). As respostas inatas são mais rápidas que as respostas adaptativas pois, não apresentam qualquer tipo de memória e, assim, cada episódio de infecção é tratado da mesma forma usando um número limitado de receptores pré-formados que se ligam a moléculas comumente expressas pelos diferentes microrganismos (TIZARD, 2014).

Por outro lado, o sistema imune adaptativo é complexo, sofisticado e responsável pela proteção final do organismo pois, se adapta às necessidades do animal sendo capaz de reconhecer e destruir os patógenos e, posteriormente, memorizar e aprender com todo esse processo que leva alguns dias ou semanas, tornando-se mais eficaz a cada vez que é exposto a um patógeno. Para que isso seja possível, células do sistema imune adaptativo produzem grandes quantidades de receptores completamente novos, de estrutura única. Estes receptores são capazes de se ligar a uma enorme quantidade de moléculas estranhas (TIZARD, 2014).

Este tipo de resposta está relacionada com a função de dois órgãos importantes, a bursa de Fabrício e o timo. Sabe-se que os linfócitos sofrem maturação na bursa de Fabrício e no timo onde se tornam funcionais. Os linfócitos que sofrem maturação na bursa de Fabrício são chamados de linfócitos B e são responsáveis pela produção de anticorpos (imunidade humoral) que eliminam patógenos encontrados no fluidos. Já os linfócitos que são maturados no timo são chamados de linfócitos T, estes ativam células para destruição de antígenos e controlam a resposta imunológica (imunidade celular) (OLÁH et al., 2013; TIZARD, 2014).

A bursa de Fabrícus e o timo podem ser classificados em órgão primários pois, são encarregados pela diferenciação das células do sistema imune. Uma vez maduras essas células vão para os órgãos secundários que são responsáveis pela migração ou agrupamento de células, formando sítios de amadurecimento/diferenciação e atuação (glândula de Harder, baço, tonsilas cecais, placas de Peyer, entre outros). Próximo ou a partir da eclosão os órgãos imunes secundários começam a desenvolver sua capacidade imunológica e serão capazes de responder efetivamente a um desafio (SANTIN, 2017).

O timo é um órgão localizado na região cervical, próximo do nervo vago e da veia jugular. A região cortical do timo é densamente povoada por células T precursoras dos timócitos (TCD3+). Um número moderado de macrófagos também pode ser visto na região do cortex. Durante a maturação dos linfócitos T, as células migram em direção à borda córtico-medular onde macrófagos e células dendríticas sentinelas selecionam os timócitos antes desses ganharem a circulação sanguínea (OLÁH et al., 2013).

A bursa de Fabrícus é um órgão linfoide central exclusivo de aves. Pelo menos 98% dos linfócitos presentes na bursa são células B, e raríssimos linfócitos T são vistos no seu córtex. As células B proliferam tanto no córtex quanto na medula da bursa e com 8 a 10 semanas de idade da ave, a população de linfócitos B começa a decair, indicando a involução do órgão - um processo que se completa em torno dos 6 a 7 meses de vida (OLÁH et al., 2013).

2.2. Nutrição na avicultura

A nutrição é indispensável para a sobrevivência, manutenção e desenvolvimento dos animais. Para que os animais possam expressar todo seu potencial genético é fundamental que recebam uma dieta balanceada atendendo todas suas exigências nutricionais e prevenindo-os de doenças e de perdas nos índices zootécnicos. Cada animal tem diferentes exigências nutricionais que variam de acordo com sua espécie, sua idade, fase de vida, sexo e aptidão. E, nada é mais importante na manutenção de saúde e produtividade do que a dieta equilibrada e a utilização de alimentos de boa qualidade.

Nutrientes ou metabólitos primários são todos os compostos presentes nos alimentos ou de forma livre que são utilizados para nutrição das células do organismo (BERTECHINI, 2004). A dieta deve suprir toda demanda que o animal tem por energia, proteína, carboidratos, minerais e vitaminas.

A alimentação das aves representa a maior fração do custo de produção, representando cerca de 70% dos custos. Assim, somente o desempenho não significa eficiência de produção surgindo a necessidade da associação da economia e da nutrição (BERTECHINI, 2004), sendo

que algumas melhorias na eficiência de utilização dos nutrientes das rações podem resultar em grandes vantagens econômicas ao produtor.

Pra isso é importante uma ração bem formulada, a qual consiste na combinação de ingredientes em proporções adequadas para atingir o perfil nutricional desejado, visando nível ótimo entre desempenho e custo e, portanto, máxima rentabilidade (FELIX et al., 2009). Estes nutrientes têm de ser administrados em tal proporção, dosagem e forma, que nutram adequadamente o animal. Não só é importante a quantidade do nutriente, mas também o fornecer em proporção correta em relação aos outros nutrientes, para que tenha utilidade máxima (ANDRIGUETTO et al., 1983).

O conhecimento da composição e do valor energético dos alimentos é de fundamental importância para a formulação de rações equilibradas. A formulação de ração é realizada basicamente com milho e farelo de soja, principais fontes energéticas e proteicas, o valor nutricional destes dois alimentos ficou bem conhecido o que permitiu a suplementação de suas deficiências, para assim, conseguir o desempenho máximo desejável de aves e suínos nas condições tropicais, tornando as rações cada vez mais eficientes e uniformes (BERTECHINI, 2004).

A formulação de ração nas aves leva em consideração sua aptidão para corte ou postura. Frangos de corte, normalmente, têm suas exigências definidas conforme as fases: pré inicial de um a sete dias, inicial de oito a 21 dias, e de crescimento de 22 a 35 dias e a final de 36 a 42 dias de idade. Para as aves de postura, leva-se em consideração a linhagem, leve ou pesada, com suas respectivas exigências subdivididas em fases, inicial, cria, recria e postura, e outros fatores, como sexo e estado sanitário do animal, também podem ser considerados (SAKOMURA; ROSTAGNO et al, 2017).

No entanto, as exigências nutricionais quando determinadas pelos índices zootécnicos não levam em consideração a imunidade, os fatores estressores que ativam o sistema imune e, quando esse está ativado, as alterações fisiológicas e metabólicas que ocorrem no organismo (KIDD, 2004).

A nutrição deixou de ser trabalhada apenas para atender as exigências nutricionais, maximizar o desempenho dos frangos e prevenir deficiências de nutrientes e, passou a ser usada como ferramenta para modular o sistema imunológico das aves, a fim de produzir um estado ideal de imunidade, pois as alterações do sistema imunológico necessitam de energia e de nutrientes para a formação de células e outras substâncias envolvidas no sistema de defesa do organismo (CARDOSO, 2015). Vários estudos são necessários para indicar quais os nutrientes,

e em quais níveis de inclusão são capazes de determinar imunocompetência e maior resistência aos desafios sanitários nos animais

A exigência de nutrientes em aves sob estresse imunológico modifica-se em relação à participação dos nutrientes para deposição de carne e para as funções de defesa. Nutrientes mais expressivos para deposição de carne, como a lisina, passam a ter menor importância para o organismo animal, enquanto outros, passam a ser prioridade do organismo animal para proliferação de células de defesa, expressão de receptores para reconhecer moléculas estranhas, produção de citocinas moduladoras de resposta imune, produção de anticorpos, além de outras moléculas efetoras que participam mais expressivamente do sistema imune, como metionina, treonina, triptofano e arginina, que passam a ser mais requeridas sob tal circunstância (OLIVEIRA NETO; OLIVEIRA, 2009).

Em aves estressadas pelo calor, a mudança na exigência dos nutrientes também é esperada, devido à diminuição do consumo de ração, da digestibilidade, da absorção e de alteração do metabolismo.

A condução de vários estudos é necessária para indicar quais os nutrientes, e em quais níveis de inclusão são capazes de determinar imunocompetência e maior resistência aos desafios sanitários nos animais.

2.3. Aminoácidos

O aminoácido é uma molécula orgânica que é formada pelo grupo amina e grupo carboxila. Existem mais de 700 aminoácidos, no entanto, a forma mais importante dos aminoácidos é o α -aminoácido, que formam as proteínas e que tem como estrutura um carbono central (carbono α) ao qual se ligam 4 grupos: grupo amina (NH_2), grupo carboxílico (COOH), hidrogênio e um grupo radical (R) que difere cada aminoácido e dá a característica de cada um deles, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica (NELSON; COX, 2014).

Existem 20 aminoácidos proteicos que são os aminoácidos que através das ligações peptídicas formam os peptídeos e as proteínas cujas funções serão determinadas pelo número, classe e sequência dos aminoácidos que compõem suas unidades estruturais, assim, sintetizando as enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, músculos, penas e uma variedade de outras substâncias (NELSON; COX, 2014).

Todos os aminoácidos são considerados metabolicamente essenciais, no entanto, aminoácidos são classificados, nutricionalmente, em essenciais e não essenciais: os aminoácidos essenciais são aqueles que não são sintetizados no organismo em velocidade suficiente para atender as necessidades de máximo desempenho do animal. Sua ausência

impediria o organismo animal de realizar síntese proteica e, conseqüentemente, de crescer considerando que alguns desses aminoácidos necessitam de muitos passos metabólicos para sua biossíntese (Tabela 1), por isso, podem ser considerados como indispensáveis nas dietas. Para as aves os aminoácidos essenciais são metionina, lisina, treonina, valina, isoleucina, arginina, triptofano, histidina, fenilalanina e leucina (BERTECHINI, 2004).

Os aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados no organismo a partir de outros aminoácidos ou outros nutrientes presentes na ração de modo que são dispensáveis na dieta; normalmente possuem poucos passos metabólicos para biossíntese envolvendo 1 a 3 reações com pequeno ou nenhum gasto energético, mas, são essenciais para síntese proteica orgânica. Para as aves os aminoácidos não essenciais são alanina, asparagina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, tirosina, serina, glicina e cistina (BERTECHINI, 2004).

Tabela 1. Número de enzimas necessárias à síntese dos aminoácido organicamente

| Dieteticamente essencial | Nº enzimas | Dieteticamente não essenciais | Nº enzimas |
|--------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| Lisina | 8 | Alanina | 1 |
| Metionina | 5 | Asparagina | 1 |
| Triptofano | 5 | Glutamina | 1 |
| Valina | 1 | Ácido Glutâmico | 1 |
| Histidina | 6 | Ácido Aspártico | 1 |
| Fenilalanina | 1 | Prolina | 3 |
| Leucina | 3 | Serina | 3 |
| Isoleucina | 8 | Glicina | 1 |
| Treonina | 6 | Cistina | 2 |
| Arginina | 7 | | |
| Total | 50 | | 14 |

Fonte: Bertechini (2004) adaptado de Martin et al. (1982).

Alguns aminoácidos são classificados como condicionalmente essenciais porque as exigências nutricionais de aminoácidos podem mudar tornando-se essenciais em determinadas situações em consequência da espécie, estágio de desenvolvimento, status fisiológico, microbiota no lúmen do intestino delgado, estresse devido a fatores ambientais e estados patológicos (SILVA et al., 2014; WU et al., 2014). Devido a isso a taxa de síntese do aminoácido torna-se menor do que o exigido por causa do aumento da exigência do aminoácido pelo organismo fazendo necessário a presença desse aminoácido na dieta.

Um novo conceito para definir os aminoácidos foi proposto por Wu (2013) , introduzindo o conceito aminoácido funcional, além de ter a função de formar proteínas, ganham este nome por participarem e regularem vias metabólicas chaves para melhorar a saúde, a sobrevivência, o crescimento, o desenvolvimento dos animais, sendo, também, muito promissores na prevenção e tratamento de doenças metabólicas, da restrição do crescimento intrauterino, da infertilidade, de disfunção intestinal e neurológica e doenças infecciosas. O conceito de aminoácido funcional leva em consideração as necessidades metabólicas do animal para aminoácidos na dieta, além das respostas de produção (WU, 2013).

Os aminoácidos funcionais podem ser aminoácidos não essenciais ou essenciais. Segundo Wu (2013), os aminoácidos funcionais são: metionina, triptofano, arginina, leucina, glutamina, glicina, cisteína, prolina e ácido aspártico.

Estudo realizado por Oxford e Selvaraj (2019) mostrou que a suplementação com glutamina reduziu a expressão de mRNA da citocina pró e anti-inflamatória, melhorou a saúde intestinal através do aumento da expressão do mRNA da proteína de junção estreita e da redução da profundidade da cripta do aumento da altura da vilosidade. Concluíram suplementação dietética de glutamina pode melhorar a saúde intestinal em aves desafiadas com uma infecção experimental por coccidiose.

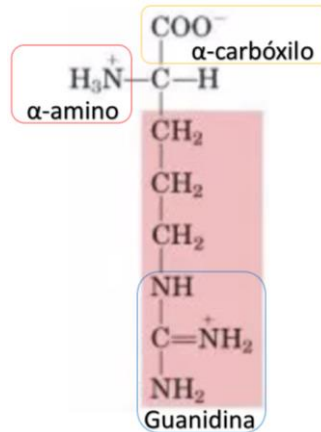
Wu et al. (2020) ao suplementarem a dieta de frangos de corte de 21 dias com 0,5 e 1,0% de glutamina por um período de 21 dias e desafiarem os animais com estresse térmico concluíram que glutamina foi eficaz para melhorar parcialmente os efeitos adversos do estresse pelo calor na função da barreira intestinal em frangos de corte, promovendo a proliferação e renovação de células epiteliais, modificando a função da barreira da mucosa intestinal e regulando a secreção de citocinas.

Zhang et al. (2020) ao suplementarem a dieta de frangos de corte com 0,3% de arginina e desafia-los através do estresse imunológico com *Salmonella typhimurium* concluíram que a suplementação com Arg pode aliviar o comprometimento da mucosa intestinal, melhorando a resposta inflamatória e modulando a microbiota intestinal em frangos de corte desafiados com *S. typhimurium*.

2.4.Arginina

A arginina ($C_6H_{14}N_4O_2$) é composta por uma cadeia linear de 4 carbonos ligada ao grupamento α -carboxilo e α -amino na parte proximal, e ao grupamento guanidina na parte distal da cadeia (Figura 1) (KHAJALI; WIDEMAN, 2010). Sua forma biologicamente ativa é a L-arginina, isômero levogiro, e com base em suas propriedades físico químicas é classificada

como aminoácido polar, catiônico, básico e possui um catabolismo glicogênio nos animais (WU, 2013; NELSON; COX, 2014).



Fonte: adaptado de Nelson; Cox (2014).

Figura 2. Estrutura molecular da L-arginina

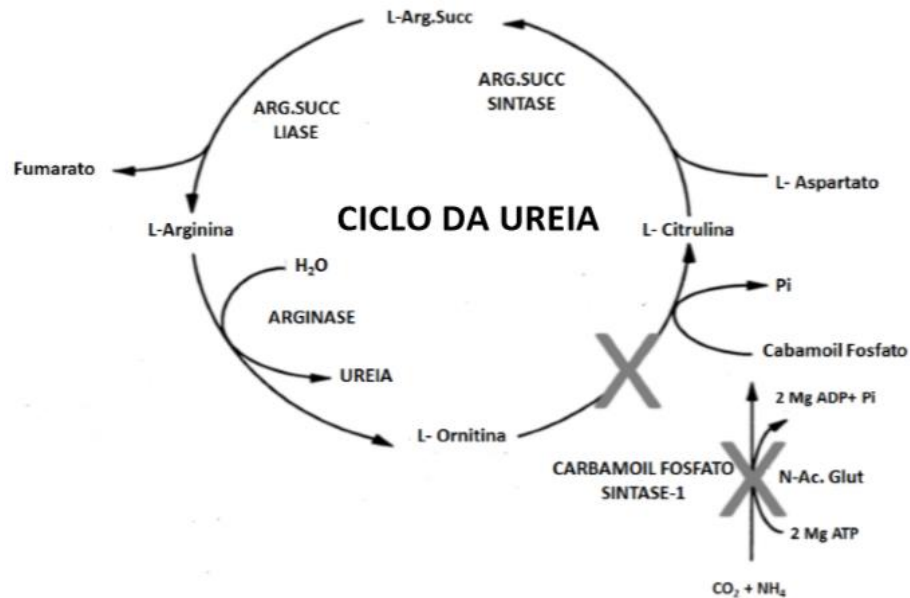
A arginina é um aminoácido essencial para aves sendo o quinto aminoácido limitante após metionina + cistina, lisina, treonina e triptofano (ATENCIO et al., 2004) e tem sido tema de grande interesse por ser um dos aminoácidos mais importantes envolvidos nas funções imunes (REN et al., 2014), demonstrando ser necessária para respostas imunes ótimas (KIDD et al., 2001) e podendo auxiliar em situações onde ocorre redução da resposta imune associada às condições de estresse, como no caso do estresse pelo calor.

Por ser considerado um aminoácido funcional e agir em diversas vias metabólicas importantes no organismo das aves, a suplementação da L-arginina é discutida, pois, apesar dos alimentos utilizados serem capazes de atender as exigências nutricionais de arginina, quando estas forma avaliadas não foram levadas em consideração fatores estressores sendo ou não infecciosos como condições sanitárias, densidade de criação e condições climáticas que podem alterar a sua exigência.

As aves, diferentemente dos mamíferos que possuem a capacidade de converter o nitrogênio excedente no organismo em ureia para posterior eliminação, sintetizam como metabólito final o ácido úrico (RIBEIRO JUNIOR et al., 2015). Sendo assim, as aves não sintetizam arginina em função de serem uricotélicas e necessitam receber grande parte da arginina da dieta, a qual tem importante papel na nutrição, no metabolismo e saúde.

A ineficiência de síntese da arginina nas aves ocorre pela ausência enzima carbamoil fosfatase sintase 1 (CFS-1) não sendo possível formar o produto carbamoil fosfato, que posteriormente seria o reagente junto com a L-ornitina para ação da enzima ornitina

transcarboxilase (OTC) obtendo a L-citrulina como produto (Figura 2) (KHAJALI; WIDEMAN, 2010).



Fonte: Sobrane Filho (2018), adaptado de Fernandes e Murakami (2010); Murray et al. (2014)

Figura 3. Mecanismo ilustrativo da ausência da biossíntese de L-arginina nas aves.

2.4.1. Absorção, metabolismo e funções da arginina

A arginina da dieta presente no lúmen intestinal é absorvida através da camada epitelial por 2 tipos de transporte: o transporte dependente de Na⁺, que acarreta em gasto energético pela utilização da bomba sódio-potássio, atuando contra um gradiente de concentração, ao contrário do transporte independente de sódio (H⁺ dependente), que atua a favor do gradiente de concentração, sendo este o mais eficaz no transporte da arginina (KHAJALI; WIDEMAN, 2010).

As interações bioquímicas da L-arginina no organismo animal são complexas e envolvem muitas vias metabólicas, sendo este aminoácido precursor de vários outros compostos como: ornitina, poliaminas (putrecina, espermidina e espermina), prolina (precursor do colágeno), creatina, citrulina e óxido nítrico. Além disso, apresenta funções na secreção de insulina pelas células β do pâncreas e do hormônio de crescimento, além de atuar como modulador imunológico devido ao seu papel como substrato para o sistema imune (WU, 2013).

A L-arginina sofre hidrólise pela ação da enzima arginase formando uma molécula de ureia e uma de L-ornitina (Figura 2). A L-ornitina transfere o grupamento amino, pela ação da enzima ornitina aminotransferase, para o 2-oxoglutarato produzindo o glutamato e o L-delta-

pirrolina-5-fosfato que sofre redução formando a L-prolina (FERNANDES; MURAKAMI, 2010; KHAJALI; WIDEMAN, 2010; WU, 2013).

A L-prolina é importante na composição de proteínas estruturais, como o colágeno, tem importante papel na regulação da expressão gênica e da diferenciação celular, cicatrização de feridas, reações antioxidantes e resposta imune, síntese de poliaminas e de glutamato (WU et al., 2011).

A creatina quando fosforilada forma a fosfocreatina, que é uma reserva de energia para esses tecidos e que, assim, desempenha um papel importante no metabolismo energético das aves, principalmente, nos tecidos nervosos e musculares. A molécula de fosfocreatina, em situações de gasto energético intenso, pode suprir a necessidade energética das aves através da regeneração rápida da adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP), sendo que esse fornecimento é mantido por um curto período de tempo (WU, 2013).

Chamruspollert et al. (2004) observaram que frangos sob estresse térmico (criados a 35°C) apresentaram menor atividade da arginase renal e menor quantidade de creatina e creatinina em suas excretas do que os frangos criados a 25°C.

A arginina é convertida em óxido nítrico através da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) que constitui na principal molécula reguladora do sistema imune e é o principal mediador citotóxico e citostático de células imunes promovendo destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio (DUSSE et al., 2003).

Ren et al. (2014) ao suplementarem ratos com arginina relataram que esta favoreceu populações jejunais e ativou a imunidade inata intestinal através de diferentes vias de sinalização. Yao et al. (2011) ao suplementarem leitões desmamados com arginina relataram aumentos do peso relativo do intestino delgado, do ganho diário de peso e altura das vilosidades do intestino. Nas concentrações plasmáticas, houve aumento da arginina e insulina e diminuição das concentrações plasmáticas de cortisol, NH₃ e ureia. Murakami et al. (2012) ao suplementarem arginina na dieta de frangos de corte também observaram melhora no desempenho e na morfometria do intestino delgado, especialmente na primeira semana.

Estudo com a suplementação de arginina em aves apontou redução dos efeitos negativos das Eimerias sobre o desempenho e melhorias nos índices morfológicos intestinais de frango de corte, com efeitos na altura das vilosidades e profundidade de cripta, e diminuição da espessura da camada muscular e redução da contagem de oocistos fecais (LAIKA; JAHANIAN,

2017). Também verificou-se aumento nas concentrações séricas de hormônio de crescimento, no peso do timo, na proliferação de linfócitos, títulos de anticorpos para doença de Newcastle, IgA e IFN- γ e na concentração sérica de IgM (XU et al., 2018).

Esser et al. (2017) suplementaram dietas vegetais com 0,8% de arginina que resultou em maior peso de carcaça e rendimento de peito, além de menor deposição de gordura abdominal em frangos de corte submetidos ao estresse térmico por dois dias antes do abate.

2.5. Vitaminas utilizadas na avicultura de corte

Entre os nutrientes necessários para as muitas funções fisiológicas essenciais à vida estão as vitaminas, que são essenciais para ótima saúde e desempenho do animal. São micronutrientes que participam de inúmeros processos metabólicos do organismo, mas que a maioria não podem ser sintetizados pelo organismo do animal (FELIX et al., 2009). De forma ampla, pode-se afirmar que as vitaminas são em sua maioria coenzimas (vitaminas A, K, C, B₆, B₁₂, niacina, tiamina, biotina, entre outras), alguns casos são hormônios (vitaminas A e D), ou apresentam ação antioxidante (vitaminas E e C) (COMBS JR, 2008).

Ao contrário de outros nutrientes, as vitaminas não desempenham funções estruturais, nem seu catabolismo fornece energia significativa. Por seu uso ser altamente específico, as vitaminas são necessárias em pequenas quantidades na dieta (COMBS JR, 2008). O papel metabólico desses nutrientes é mais complexo que o de outros. A deficiência de uma ou mais vitaminas pode levar à distúrbios metabólicos resultando em queda na produtividade, no crescimento e no desenvolvimento de doenças. Já o aumento na suplementação de certas vitaminas tem efeitos positivos, principalmente quanto à imunidade (FELIX et al., 2009).

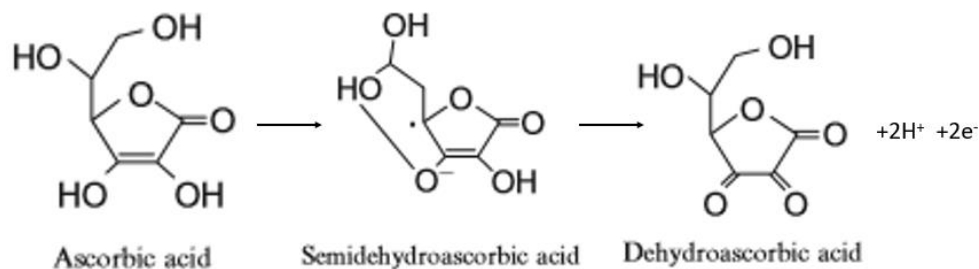
As vitaminas podem ser classificadas de duas formas: em lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, ácido ascórbico, vitamina B₁₂ e piridoxina) (McDOWELL, 2000).

Por serem moléculas pequenas, as vitaminas não são digeridas pelo animal para serem absorvidas, no entanto, as vitaminas lipossolúveis que são solúveis em lipídeos, são absorvidas no intestino delgado juntamente com lipídeos da dieta e são armazenadas no corpo. Já as vitaminas hidrossolúveis, as quais são solúveis em meio aquoso no lúmen intestinal, podem ser absorvidas diretamente pela parede intestinal, sendo que, algumas vitaminas como a vitamina C, são absorvidas por difusão passiva e não são armazenadas no corpo (RUTZ et al., 2014).

2.6. Vitamina C

O ácido ascórbico (AA) é um sólido cristalino branco, que escurece facilmente em contato com a luz. Faz parte do grupo das vitaminas hidrossolúveis apresentando uma elevada solubilidade em água.

A vitamina C ocorre em duas formas naturais (figura 3), o ácido ascórbico (forma reduzida) e ácido dehidroascórbico (forma oxidada). Ambas as formas são biologicamente ativas embora, a maior parte da vitamina exista como ácido ascórbico (McDOWELL, 2000). A vitamina C é muito susceptível à oxidação, uma mudança que é acelerada pelo calor e pela luz, sendo o carbono dois do anel de lactona o mais reativo e, conseqüentemente, o mais facilmente oxidado (TOLBERT et al., 1975) o que o torna um excelente agente antioxidante protegendo outras espécies químicas.



Fonte: adaptado de COMBS JR, 2008

Figura 4. Estrutura molecular do ácido ascórbico (forma natural), ácido semidehidroascórbico (forma intermediária) e ácido dehidroascórbico (forma natural).

As exigências nutricionais referentes a vitamina C ou ácido ascórbico não são conhecidas para as aves pois os frangos de corte possuem a enzima gulonolactona redutase necessária para sua síntese em quantidades suficientes para atender as exigências do organismo (RUTZ et al., 2017). Sendo assim, a vitamina C é classificada como não essencial. Sua síntese em frangos ocorre predominantemente nos rins utilizando como substratos glucose, manose e frutose (KHAN et al., 2012). A D-glicose é convertida a D-glucuronolactona, logo em seguida em 2-ceto-gulonolactona, que espontaneamente se converte em ácido ascórbico (LOHAKARE et al., 2005).

Sua absorção ocorre de forma semelhante à de carboidratos monossacarídeos, absorção por meio de transporte ativo secundário ou seja, dependente de Na⁺. O ácido ascórbico é prontamente absorvido quando as quantidades ingeridas são baixas; entretanto, quando as quantidades ingeridas são excessivas ocorre absorção intestinal limitada, mas, aparentemente 80 a 90% são absorvidos (McDOWELL, 2000).

Entretanto, quando expostos ao estresse excessivo, a vitamina C sintetizada pode não ser suficiente para atender as exigências metabólicas (RUTZ et al., 2017), por causa do aumento na taxa de seu uso para eliminação de radicais livres (ALBA et al., 2015), além de sua síntese e absorção serem prejudicadas necessitando de maior aporte de vitaminas (MILTENBURG, 1999) portanto, podendo causar prejuízos no desempenho e aumento na taxa de mortalidade em situações de estresse.

A vitamina C é um importante antioxidante devido a sua capacidade redutora, regenerando a forma ativa da vitamina E (SKRIVAN et al., 2012) que atua na neutralização de radicais livres (RUTZ et al., 2017) auxiliando a manter a integridade estrutural e funcional das células.

A inclusão de vitamina C aumentou a degradação dos corticosteroides, podendo-se então, concluir que a inclusão de vitamina C nas rações de aves em estresse pelo calor é uma alternativa nutricional para melhorar o desempenho das aves (SAHIN et al., 2002; MAHMOUD et al., 2004). Além disso, pode promover aumento das concentrações dos hormônios tireoidianos circulantes (T3 e T4), aumentando assim o metabolismo com conseqüente aumento no consumo de ração das aves em situações de estresse pelo calor, melhorando os resultados de desempenho (SAHIN et al., 2003).

A vitamina C também melhora a condição óssea em aves expostas ao estresse através da hidroxilação da prolina e da lisina, atuando na formação de colágeno e mucopolissacarídeos. Além disso, facilita a conversão de ácido fólico em tetrahidrofólico e permitindo a absorção de ferro através da parede intestinal (RUTZ et al., 2017).

Os principais efeitos positivos do uso de vitamina C estão diretamente associados à sua participação no sistema antioxidante de defesa, diminuindo a concentração de corticosteroides circulantes e a concentração sérica metabólitos nocivos ao organismo, principalmente quando as aves são criadas sob altas temperaturas saindo de sua zona de termoneutralidade (GHAZI et al., 2015), assim o uso da vitamina C visa amenizar ou compensar os efeitos deletérios nos índices zootécnicos e na imunidade das aves causados pelo estresse.

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da suplementação da arginina e da vitamina C sobre o desempenho e resposta imune de frangos de corte em ambiente de termoneutralidade e estresse cíclico pelo calor através das respostas no desempenho, parâmetros hematológicos e imunológicos de frangos de corte submetidos a suplementação com diferentes níveis de arginina e vitamina C sob estresse térmico.

Este estudo resultou no Capítulo II, artigo intitulado “Efeito do estresse térmico e suplementação da dieta com arginina e vitamina C no desempenho e imunidade de frangos de corte” a ser submetido para publicação na revista “Brazilian Journal of Poultry Science”, apresenta-se conforme as normas para a publicação, exceto pelo idioma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUÇÃO ANIMAL - UBABEF (Org.). **Relatório anual**. São Paulo: UBABEF, 2020.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMMING, J. S.; GEMAEEL, A.; SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. **Nutrição Animal**. São Paulo: Nobel, 1ed. Vol.2, p. 425, 1983.
- ALBA, M.; ESMAEILIPOUR, O.; MIRMAAHMOUDI, R. Effects of *Withania coagulans* fruit powder and vitamin C on growth performance and some blood components in heat stressed broiler chickens. **Livestock Science**, v. 173, p. 64-68, 2015.
- ATENCIO, A.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; OLIVEIRA, D.C.; VIEITES, F.M.; PUPA, J.M.R. Exigências de arginina digestíveis para frangos de corte machos em diferentes fases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1456-1466, 2004.
- BERTECHINI, A.G. **Nutrição de Monográsticos**. Lavras: Editora UFLA/FAEPE, 2004. 450p.
- BÍCEGO, K.C.; SCARPELLINI, C.S.; GARGAGLINONI, L.H. Termorregulação. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: FUNEP/ UNESP, 2017. 466-491p.
- BORGES, S.A.; MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.975-981, 2003.
- CARDOSO, A. L. S. P; TESSARI, E. N. C. Interação entre imunidade e nutrição das aves: revisão de literatura. **Revista científica de medicina veterinária**, n.24, 2015.
- CHAMRUSPOLLERT, M.; PESTI, G.M.; BAKALLI, R.I. Chick responses to dietary arginine and methionine levels at different environmental temperatures. **British Poultry Science**. v.45, v.1, p. 93-100, 2004.
- COMBS JR; G. F. **The Vitamins**. Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Ithaca, New York,; 3 ed., ELSEVIER, 2008.582p.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.
- ESSER, A.F.G.; GONÇALVES, D.R.M.; RORIG, A.; CRISTO, A.B.; PERINI, R.; FERNANDES, J.I.M. Effects of guanidinoacetic acid and arginine supplementation to vegetable diets fed to broiler chickens subjected to heat stress before slaughter. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, v. 19, n. 3, p. 429-436, 2017.
- FELIX, A.P.; MAIORKA, A.; SORBARA, J.O.B. Níveis vitamínicos para frangos de corte. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.619-626, 2009.

- FERNANDES, J. I. M.; MURAKAMI, A. E. Arginine metabolism in uricotelic species. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 32, n. 4, p. 357–366, 2010.
- GHAZI, S.; AMJADIAN, T.; NOROUZI, S. Single and combined effects of vitamin C and oregano essential oil in diet, on growth performance, and blood parameters of broiler chicks reared under heat stress condition. *International Journal of Biometereology*, v. 59, n. 8, p. 1019-1024, 2015.
- GERAERT, P.A.; PADILHA, J.C.F.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **British Journal of Nutrition**, v.75, p. 195-204, 1996.
- HAN, G.; YANG, H.; WANG, Y.; ZHANG, R.; TASHIRO, K.; BUNGO, T.; FURUSE, M.; CHOWDHURY, V. S. Effects of *in ovo*feeding of L-leucine on amino acids metabolism and heat-shock protein-70, and -90 mRNA expression in heat-exposed chicks. **Poultry Science**, v. 98, p. 1243-1253, 2019.
- KHAJALI, F.; WIDEMAN, R. F. Dietary arginine: metabolic, environmental, immunological and physiological interrelationships. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 4, p. 751-766, 2010.
- KHAN, R. U.; NAZ, S.; NIKOUSEFAT, Z.; SELVAGGI, M.; LAUDADIO, V.; TUFARELLI, V. Effect of ascorbic acid in heat – stressed poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, p. 477-489, 2012.
- KIDD, M.T.; PEEBLES, E.D.; WHITMARSH, S.K.; YEATMAN, J. B.; WIDEMAN JR, R. F. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. **Poultry Science**, v. 80, p. 1535-1542, 2001.
- KIDD, M.T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v.83 p.650-657, 2004.
- LAIKA, M.; JAHANIAN, R. Increase in dietary arginine level could ameliorate detrimental impacts of coccidial infection in broiler chickens. **Livestock Science**, v. 195, p. 38-44, 2017.
- LOHAKARE, J.D; KIM, J.K.; RYU, M.H.; HAHN, T.-W.; CHAE, B.J. Effects of vitamin C and vitamin D interaction on the performance, immunity, and bone characteristics of commercial broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, p. 670-678, 2005.
- MAHMOUD, K.Z.; EDENS, F.W.; EISEN, E.J.; HAVENSTEIN, G.B. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.137, n.1, p.35-42, 2004.
- MCDOWELL, L.R. **Vitamins in Animal and Human Nutrition**. Comparative aspects to human nutrition. California, Academy Press, 2000. 812p.
- MILTENBURG, G. Tendência futura del uso de aditivos em nutrición aviar. **Revista Avicultura Profesional**, v.17, p.33-35, 1999.
- MURAKAMI, A.E.; FERNANDES, J.I.M.; HERNANDES, L.; SANTOS, T.C. Effects of starter diet supplementation with arginine on broiler production performance and on small intestine morphometry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 259-266, 2012.
- NASCIMENTO, S.; SILVA, I. As perdas de calor nas aves: entendendo as trocas de calor com o meio. *Revista Avisite*. 2008. Disponível em

<https://www.avisite.com.br/cet/img/20100916_trocasdecalor.pdf>. Acesso em: 24 de novembro 2018.

NAVAS, T.O.; OLIVEIRA, H.F.; CARVALHO, F.B.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; HELLMEISTER FILHO, P. ESTRESSE POR CALOR NA PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 13, 2016.

NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. 6. ed., Porto Alegre. Artmed, 2014. 1298p.

OLÁH, I.; NAGY, N.; VERVELDE, L. Structure of avian lymphoid system. In: Avian Immunology. SCHAT, K.A.; Kapsers, B.; Kaiser, P. *Avian Immunology: 2nd edn*, ELSEVIER ACADEMIC PRESS INC, London, 2013, p. 11-44.

OLIVEIRA NETO, A.R.; OLIVEIRA, W.P. Aminoácidos para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, suplemento especial, p.205-208, 2009.

OXFORD, J. H.; SELVARAJ, R. K. Effects of Glutamine Supplementation on Broiler Performance and Intestinal Immune Parameters During an Experimental Coccidiosis Infection. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, Pages 1279-1287, 2019.

REN, W.; CHEN, S.; YIN, J.; DUAN, J.; LI, T.; LIU, G.; FENG, Z.; TAN, B.; YIN, Y.; WU, G. Dietary arginine supplementation of mice alters the microbial population and activates intestinal innate immunity. **The Journal of Nutrition**, v.144, p. 988-995, 2014.

RIBEIRO, J.R.V.; RIBEIRO, C.L.N.; MESSIAS, R.K.G.; ROCHA, T.C. Importância nutricional da arginina em dietas de aves. **Revista Eletronica Nutritime**, v.12, n. 4, p. 4149-4161, 2015.

RUTZ, F.; XAVIER, E.G.; ROLL, V.F. Exigências de vitaminas para Aves. In: SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; FERNANDES, J.B.K.; HAUSCHILD, L. *Nutrição de não ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2014. 389-403.

RUTZ, F.; LOPES, D.C.N.; LUVIZOTTO JR., J.M. Absorção e Metabolismo de vitaminas. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: FUNEP/ UNESP, 2017. 274-321p.

SAHIN, K.; KUCUK, O.; SAHIN, N.; SARI, M. Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation status, serum hormone, metabolite, and mineral concentrations of japonese quails reared under heat stress (34°C). *International Journal of Vitamin. Nutrition Research*, v.72, p.91-100, 2002.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H. S. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2016.

SANTIN, E.; MORAES, M.L.; SANCHES, A.W.D. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: FUNEP/ UNESP, 2017. 466-491p.

SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; LIMA, R.B. Digestão e absorção das proteínas. In: SAKAMOURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; FERNANDES, J.B.K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep-Unesp; 2014. p. 95-109.

SKRIVAN, M.; MAROUNEK, M.; ENGLMAIEROVÁ, M.; SKRIVANOVÁ, E. Influence of dietary vitamin C and selenium, alone and in combination, on the composition and oxidative stability of meat of broilers. **Food Chemistry**, v. 130, p. 660-664, 2012.

SOBRANE FILHO, S.T. **L-arginina suplementar para frangos de corte na fase final de criação (29 aos 42 dias)**. - 2018. 109 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2018.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 9 ed. São Paulo, Roca, 2014.

TOLBERT, B.M.; DOWNING, M.; CARLSON, R.W.; KNIGHT, M. K.; BAKER, E. M. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. **Annals New York Academy Science**, v.258, p.48-69, 1975.

WU, G.; BAZER, F.W; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; KIM, S.W.; KNABE, D.A.; LI, P.; LI, X.; MCKNIGHT, J.R.; SATTERFIELD, M.C.; SPENCER, T.E. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. **Amino acids**, v. 40, n. 4, p. 1053-1063, 2011.

WU, G. **Amino Acid: Biochemistry and Nutrition**. 1 ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group LLC, 2013. 458 p.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAI, Z.; LI, D.; WANG, J.; WU, Z. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *Annual Review of Animal Biosciences*, Palo Alto, v. 2, p. 387-417, 2014.

WU, Q. J.; LIU, N.; WU, X. H.; WANG, G. Y.; LIN, L. Glutamine alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, intestinal inflammatory response, and barrier integrity in broilers. *Poultry Science*, v. 97, p. 2675-2683, 2018.

XU, Y.Q.; GUO, Y.W.; SHI, B.I.; YAN, S.M.; GUO, X.Y. Dietary arginine supplementation enhances the growth performance and immune status of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 209, p. 8-13, 2018.

YAO, K.; GUAN, S.; LI, T.; HUANG, R.; WU, G.; RUAN, Z.; YIN, Y. Dietary L-arginine supplementation enhances intestinal development and expression of vascular endothelial growth factor in weanling piglets. **British Journal of Nutrition**, v.105, p. 703-709, 2011.

ZHANG, B.; LI, G.; SHABID, M. S.; GAN, L.; FAN, H.; LV, Z.; YAN, S.; GUO, Y. Dietary l-arginine supplementation ameliorates inflammatory response and alters gut microbiota composition in broiler chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Poultry Science**, v. 99, p.1862-1874, 2020.

CAPÍTULO 2

Suplementação da dieta com arginina e vitamina C impacta diretamente no desempenho e imunidade de frangos de corte

Resumo

Altas temperaturas influenciam negativamente a produção avícola pelo estresse por calor, afetando o sistema imunológico e expressão do potencial genético das aves. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de arginina e vitamina C sobre o desempenho e resposta imune de frangos de corte em ambiente de termoneutralidade e estresse cíclico pelo calor. Foram utilizados 384 frangos de corte machos no período de 1 a 35 dias de idade. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema fatorial 3x2x2: 3 níveis de inclusão de arginina digestível (100, 130 e 160% da exigência da arginina), dois níveis de inclusão de vitamina C (0 e 200 ppm) e 2 temperaturas (termoneutralidade e estresse cíclico por calor) totalizando 12 tratamentos com 8 repetições de 4 aves cada. Foram avaliados: índices zootécnicos, hemograma completo, perfil bioquímico sorológico, peso relativo dos órgãos imunes, histomorfometria Bursa de Fabricius e expressão relativa dos genes *HSP70* e *GPx*. O estresse cíclico por calor teve impactos negativos nos frangos de corte, reduzindo o consumo de ração e, por consequência, o ganho de peso aos 21 e 35 dias. Aos 21 e 35 dias de idade a suplementação de 200 ppm de vitamina C na dieta dos frangos de corte melhorou o consumo de ração e o ganho de peso dos frangos, entretanto, não influenciou o peso dos órgãos imunes e as concentrações séricas de glicose, colesterol e creatina quinase. Aos 35 dias de idade, a suplementação da arginina não influenciou o desempenho dos frangos, o peso dos órgãos, a concentração de glicose e de creatina quinase, mas influenciou a concentração sérica de colesterol. A vitamina C e a Arginina aumentaram a percentagem da área do córtex da Bursa. E a inclusão de arginina e vitamina C aumentou a expressão genética *HSP 70* e do *GPx*. Conclui-se os frangos de corte quando recebem vitamina C sofrem uma resposta ao estresse menos severa após exposição a altas temperaturas e a suplementação de Arginina e vitamina C aumentou a expressão genética do *HSP 70* dando maior resistência as aves durante períodos de calor e a expressão de *GPx* que indicando um aumento na atividade antioxidante de frangos de corte.

Palavras-chave: ácido ascórbico, aminoácido funcional, antioxidante, expressão gênica

Abstract

High temperatures negatively influence poultry production due to heat stress, affecting the immune system and expression of the birds' genetic potential. The objective of this study was to evaluate arginine and vitamin C supplementation effects on performance and immune response of broilers in a thermoneutral and cyclic heat stress environment. A total of 384 male broilers from 1 to 35 days of age were distributed in a 3x2x2 completely randomized factorial scheme: 3 digestible arginine levels (100, 130 and 160% of the requirement), two vitamin C levels (0 and 200 ppm) and 2 temperatures (thermoneutrality and cyclic heat stress), totaling 12 treatments with 8 repetitions of 4 birds each. Zootechnical indexes, complete blood count, serological biochemical profile, relative weight of immune organs, Bursa of Fabricius histomorphometry and relative expression of HSP 70 and GPx genes, using the actin gene as an internal control, were evaluated. Cyclic heat stress had negative impacts, reducing feed intake and, consequently, weight gain at 21 and 35 days. At 21 and 35 days of age, vitamin C supplementation at 200 ppm improved feed intake and weight gain, however, did not influence immune organs weight and serum glucose concentrations, cholesterol and creatine kinase. At 35 days of age, arginine supplementation did not influence the chicken's performance, the organs weight, concentration of glucose and creatine kinase, but it did influence serum concentration of cholesterol. Vitamin C and Arginine increased the Bursa cortex percentage. The inclusion of arginine and vitamin C increased HSP 70 and GPx gene expression. In conclusion, broilers when receiving vitamin C undergo a less severe stress response after high temperatures exposure and supplementation of arginine and vitamin C increased the genetic expression of HSP 70 promoting greater resistance during periods of heat. The expression of GPx indicates an increase in antioxidant activity of broilers.

Keywords: ascorbic acid, functional amino acid, antioxidant, gene expression

1. INTRODUÇÃO

O estresse é uma manifestação fisiológica da defesa do organismo contra os efeitos adversos do ambiente externo. O calor é considerado um dos estressores mais importantes nas regiões subtropicais e tropicais que podem causar enormes perdas econômicas na indústria avícola (Hosseini-Vashan *et al.*, 2020).

Em condições de estresse, complexos mecanismos são desencadeados e podem atuar no sistema imunológico das aves comprometendo suas defesas. Durante períodos de estresse térmico, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é ativado para manter a homeostase em resposta a estímulos estressantes o qual estimula a produção e liberação de glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal (Pagliarone & Sforzin, 2009). Os glicocorticoides estão associados ao aumento de suscetibilidade à doenças, involução do tecido linfóide, modificações na dinâmica de células imunológicas circulantes, supressão de citocinas, entre outros efeitos indesejáveis (Santin *et al.*, 2017) ou seja, estão associados a imunossupressão afetando diretamente a obtenção de altos níveis zootécnicos de produção.

No entanto, o aumento da ingestão de alguns nutrientes acima dos níveis atualmente recomendados pode ajudar a amenizar os efeitos causados pelo estresse e a otimizar as funções imunológicas, incluindo a melhoria da função de defesa do animal. As exigências nutricionais de animais em estresse modifica-se pois, nutrientes que estão relacionados a produção passam a ter menor importância do que os nutrientes que participam mais expressivamente do sistema imune (Oliveira Neto & Oliveira, 2009).

A arginina é o 5º aminoácido limitante para aves e tem sido tema de grande interesse por ser um dos aminoácidos mais importantes envolvidos nas funções imunes (Ren *et al.*, 2014), demonstrando ser necessária para respostas imunológicas ótimas (Kidd *et al.*, 2001) e podendo auxiliar em situações onde ocorre redução da resposta imune associada às condições de estresse, como no caso do calor.

As interações bioquímicas da L-arginina no organismo animal são complexas e envolvem muitas vias metabólicas, sendo este aminoácido, precursor de vários outros compostos como: ornitina, poliaminas (putrecina, espermidina e espermina), prolina (precursor do colágeno), creatina, citrulina e óxido nítrico. Além disso, apresenta funções na secreção de insulina pelas células β do pâncreas e do hormônio de crescimento, além de atuar como modulador imunológico devido ao seu papel como substrato para o sistema imune (Wu, 2013).

Outro nutriente muito importante é a vitamina C cujos principais efeitos positivos estão diretamente associados à sua participação no sistema antioxidante de defesa, sendo um importante antioxidante, além de regenerar a forma ativa da vitamina E devido a sua capacidade

reduzida (Skrivan *et al.*, 2012), diminui a concentração de corticosteroides circulantes e a concentração sérica de metabólitos nocivos ao organismo, principalmente quando as aves são criadas em altas temperaturas saindo de sua zona de termoneutralidade (Ghazi *et al.*, 2015) visando amenizar ou compensar os efeitos deletérios nos índices zootécnicos e na imunidade das aves causados pelo estresse.

Dessa forma, o uso de imunostimulantes como a arginina e o de antioxidantes como a vitamina C podem ser estratégias promissoras para minimizar os impactos negativos das condições de estresse e melhorar a imunidade dos frangos de corte. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de níveis de arginina digestível e vitamina C em dietas de frangos de corte, sobre o seu desempenho e resposta imune em ambiente de termoneutralidade e estresse cíclico pelo calor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista -Unesp, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, no Laboratório de Nutrição de Aves. Os procedimentos experimentais foram submetidos à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo N° 0006/2019) da mesma Instituição, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.1. Animais, instalações e delineamento experimental

Foram utilizados 384 pintainhos de corte macho com um dia de idade, machos da linhagem comercial Cobb® 500, vacinados no incubatório contra doenças de Marek, Gumboro e Bouda Aviária. Aos 10 dias de idade os pintainhos foram vacinados individualmente, via ocular, contra o vírus da doença de Newcastle (B1) e bronquite infecciosa (B1) (CEVAC®). Todas as aves foram criadas seguindo as normas preconizadas para o manejo sanitário e de criação do manual da linhagem.

Diariamente foram registrados os parâmetros de controle da qualidade do ambiente e a mortalidade. Durante todo o período experimental as aves receberam água e ração *ad libitum*.

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema fatorial (3x2x2): 3 níveis de inclusão de arginina digestível (100, 130 e 160% da exigência da arginina de Rostagno *et al.* (2017)), esses níveis foram escolhidos baseados em experimentos anteriores realizados no laboratório; dois níveis de inclusão de vitamina C (0 e

200 ppm) e 2 temperaturas (termoneutralidade e estresse cíclico por calor) totalizando 12 tratamentos com 8 repetições de 4 aves cada (Tabela 1) num período de 1 a 35 dias de idade.

Tabela 1. Tratamentos experimentais.

| Tratamentos | Temperatura | Arginina (% exigência da arg) | Adição de Vitamina C (ppm) |
|-------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| T1 | Termoneutra | 100 | 200 |
| T2 | Termoneutra | 130 | 200 |
| T3 | Termoneutra | 160 | 200 |
| T4 | Termoneutra | 100 | 0 |
| T5 | Termoneutra | 130 | 0 |
| T6 | Termoneutra | 160 | 0 |
| T7 | Estresse pelo calor | 100 | 200 |
| T8 | Estresse pelo calor | 130 | 200 |
| T9 | Estresse pelo calor | 160 | 200 |
| T10 | Estresse pelo calor | 100 | 0 |
| T11 | Estresse pelo calor | 130 | 0 |
| T12 | Estresse pelo calor | 160 | 0 |

As aves foram alojadas em 2 câmaras climatizadas em gaiolas de arame galvanizada, com dimensões de 0,60 x 0,50 x 0,45 m, equipadas com um comedouros frontal tipo calha e dois bebedouros tipo *nipple*.

A temperatura da câmara 1 foi regulada para promover condições de termoneutralidade conforme manual da linhagem Cobb[®] preconizadas para cada fase de vida e na sala 2 a temperatura foi regulada para condições de estresse cíclico pelo calor com 8 horas de calor por dia conforme demonstrado na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Temperaturas (°C) preconizadas para as câmaras termoneutra e de estresse cíclico.

| Idade em dias | Termoneutra | Estresse cíclico |
|---------------|-------------|------------------|
| 1-3 | 32-33 | 35 |
| 4-7 | 30-32 | 34 |
| 8-14 | 29-30 | 33 |
| 15-21 | 28-29 | 32 |
| 22-28 | 24-26 | 31 |
| 29-35 | 21-23 | 30 |

2.2. Rações experimentais

As rações experimentais isoenergéticas e isoprotéicas (Tabela 3) foram preparadas na fábrica de rações da FMVZ, e foram formuladas à base de milho e farelo de soja, seguindo a composição dos ingredientes e as recomendações de exigências nutricionais preconizadas por Rostagno *et al.* (2017). Foram formuladas rações para as fases pré-inicial (0 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias) e crescimento (22 dias a 35 dias de idade). Os níveis de arginina na dieta pré-inicial

foram de 1,430, 1,859, 2,288%; na inicial de 1,397, 1,816, 2,235%; na crescimento de 1,321, 1,717, 2,113%; para os tratamentos com 100, 130 e 160% de inclusão de arginina, respectivamente. Para atender os níveis de arginina de cada tratamento foram ajustados os valores de milho, farelo de soja, glúten, inerte e com a inclusão de L-arginina (96%) sintética. A inclusão da vitamina C foi totalmente ajustado pelo inerte.

2.3. Parâmetros avaliados

2.3.1. Desempenho zootécnico

Os dados do desempenho foram obtidos nos períodos de 1 a 7 dias, 1 a 21 dias, 1 a 35 dias de idade, sendo que os parâmetros analisados foram: consumo de ração, CR (g/ave/dia), ganho de peso, GP (g) e conversão alimentar, CA (kg de ração/kg peso do frango).

O consumo de ração (g/ave/dia) foi obtido pela diferença entre a quantidade de ração fornecida para cada período de criação e a sobra no final, ajustado pelo número médio de aves em função da mortalidade. Para cálculo do ganho de peso (g/ave), as aves foram pesadas no início e no final de cada período e conversão alimentar (CA) foi obtida pela relação entre o consumo total de ração pelo ganho de peso em cada parcela experimental, corrigido pelo peso das aves mortas no período.

Aos 35 dias foi calculado o índice de eficiência produtiva (IEP) através da multiplicação do ganho de peso médio diário (kg) e a viabilidade (%), dividido pela conversão alimentar, multiplicando posteriormente por 100.

Tabela 3. Composição percentual e nutricionais das rações basais.

| Ingredientes | Pré inicial | Inicial | Crescimento |
|--|-------------|---------|-------------|
| Milho, grão | 49,046 | 50,033 | 52,620 |
| Soja-46, farelo | 35,500 | 34,521 | 32,731 |
| Milho, gluten-60 | 7,680 | 6,549 | 4,732 |
| Óleo soja | 2,103 | 3,600 | 5,000 |
| Calcario calcítico | 0,990 | 0,893 | 0,842 |
| Fosfato bicálcico | 2,061 | 1,801 | 1,556 |
| Sal comum | 0,250 | 0,250 | 0,250 |
| Bicarbonato de sódio | 0,423 | 0,402 | 0,367 |
| DL-Metionina (99%) | 0,277 | 0,288 | 0,289 |
| L- Lisina (99,8%) | 0,301 | 0,276 | 0,262 |
| L-Treonina (98,1%) | 0,054 | 0,068 | 0,075 |
| L-Arginina (96,5%) | 0,018 | 0,033 | 0,038 |
| Cloreto de Colina (60%) | 0,105 | 0,095 | 0,075 |
| Vitamina C (35%) | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Premix vitamínico* | 0,130 | 0,130 | 0,100 |
| Premix mineral** | 0,050 | 0,050 | 0,050 |
| Anticoccidiano | 0,055 | 0,055 | 0,055 |
| Antibiótico | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Inerte | 1,074 | 1,074 | 1,074 |
| Total | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| Composição nutricional calculada | | | |
| Energia Metabolizável Aparente (kcal/kg) | 3000 | 3100 | 3200 |
| Proteína Bruta (%) | 25,310 | 24,300 | 22,620 |
| Cálcio (%) | 1,011 | 0,907 | 0,822 |
| Fósforo disponível (%) | 0,482 | 0,432 | 0,384 |
| Sódio (%) | 0,227 | 0,221 | 0,211 |
| Cloro (%) | 0,215 | 0,215 | 0,215 |
| Metionina dig. (%) | 0,646 | 0,637 | 0,609 |
| Metionina + Cistina dig. (%) | 0,989 | 0,966 | 0,914 |
| Lisina dig. (%) | 1,364 | 1,306 | 1,235 |
| Treonina dig. (%) | 0,882 | 0,862 | 0,815 |
| Triptofano dig. (%) | 0,256 | 0,246 | 0,233 |
| Valina dig. (%) | 1,05 | 1,004 | 0,928 |
| Isoleucina dig. (%) | 0,967 | 0,923 | 0,855 |
| Arginina dig. (%) | 1,43 | 1,397 | 1,321 |

*Premix vitamínico (níveis de garantia/kg de ração pré inicial e inicial): vitamina A, 14300 UI; vitamina D3, 5200 UI; vitamina E, 71,50 UI; vitamina k3, 3,90 mg; vitamina B1, 2,99 mg; vitamina B2, 9,10 mg; ácido pantotênico, 1,56 mg; vitamina B6, 5,2 mg; vitamina B12, 32,50 mcg; ácido nicotínico, 7,8 mg; ácido fólico, 2,60 mg; biotina, 0,325 mg; selênio 0,39 mg. Premix vitamínico (níveis de garantia/kg de ração crescimento): vitamina A, 11000 UI; vitamina D3, 4000 UI; vitamina E, 55,00 UI; vitamina k3, 3,00 mg; vitamina B1, 2,30 mg; vitamina B2, 7 mg; ácido pantotênico, 1,2 mg; vitamina B6, 4,0 mg; vitamina B12, 25 mcg; ácido nicotínico, 6,0 mg; ácido fólico, 2 mg; biotina, 0,25 mg; selênio 0,30 mg. **Premix mineral (níveis de garantia/kg de ração): ferro, 50 mg; cobre 10 mg; manganês, 65 mg; zinco, 65mg; iodo 1 mg.

2.3.2. Perfil bioquímico sorológico

Aos 35 dias de idade, 6 aves por tratamento foram selecionadas e foi colhido 5,0 ml de sangue, por meio da veia jugular, para obtenção de soro. O soro obtido foi transferido para tubos identificados e armazenados em freezer (-20°C) para posteriores análises. O soro foi enviado para o Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu. Foram utilizados os reagentes da marca Bioclin e o equipamento Cobas Mira Plus para determinação dos níveis séricos de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e creatina quinase (mg/dL).

2.3.3. Peso relativo de órgãos do sistema imune

Aos 35 dias de idade foram pesadas e abatidas 8 aves por tratamento por meio de deslocamento da cervical após jejum de duas horas. Posteriormente, foram coletados e pesados o baço, timo, Bursa de Fabrícus e fígado para o cálculo dos pesos relativos em relação ao peso corporal das aves.

2.3.4. Hemograma completo

Aos 10 dias de idade antes da vacinação de Newcastle e aos 35 dias foram coletados 2,0 mL de sangue por meio da punção da veia da jugular direita, com seringas estéreis, de 6 aves por tratamento, totalizando 72 aves. O sangue foi acondicionado em tubos devidamente identificados por tratamento, contendo EDTA a 5%, para análise do hemograma completo.

O hematócrito foi obtido por meio da técnica de microhematócrito, com uso de tubos capilares e centrifugação por cinco minutos à 12.000 G (Campbell, 2010).

A proteína plasmática total foi mensurada pela técnica de refratometria. A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método de cianometahemoglobina. A concentração de hemoglobina foi usada, conjuntamente com a contagem global de hemácias, para os cálculos de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Campbell, 2010).

Para contagem global de células (hemácias e leucócitos) foi realizada a contagem manual em hemocitometro. O fator de multiplicação utilizado para hemácias foi 5.050 e de leucócitos 252,5, diferindo apenas a área de contagem (Horobin, 2011).

Logo após a coleta, uma amostra de sangue foi utilizada para confecção de esfregaço sanguíneo para posterior contagem diferencial de leucócitos e determinação da relação heterofilo/linfócito (H/L) de acordo com metodologia proposta por Charles Noriega (2000). A

contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100x (lente sobre óleo de imersão). Foram contadas 100 células leucocitárias para determinar a relação H/L.

2.3.5. Histomorfometria da Bursa de Fabrícus

As bursas que foram coletadas e pesadas para peso relativo posteriormente, foram fixadas em formol a 10% neutro tamponado, para confecção de lâminas histológicas nas quais foram analisados 20 folículos completos por lâmina, correspondente a uma ave por parcela experimental, para a determinação da área cortical por meio das medidas da área do folículo e área medular com auxílio do programa Leica Application Suite versão 3.0.

2.3.6. Expressão gênica da *HSP70* e *GPx*

Para a realização da expressão gênica da *actina*, *HSP70* e *GPx* aos 35 dias de idade 4 aves por tratamento foram abatidas para coleta do fígado e foram imediatamente armazenados em freezer -80°C para extração do RNA. O RNA foi extraído de uma amostra de 50 mg do fígado, utilizando 500 µl de TRIzol® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) para cada amostra, de acordo com instruções do fabricante. O produto de extração foi visualizado em gel de agarose 1% e quantificado em aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80°C. Após, uma solução de oligo dT 0,75 mM; oligos aleatórios 0,15 mM; dNTPs 0,75 mM e 11 µl RNA tratado com DNase, foi preparada e incubada a 65°C por cinco minutos e colocada no gelo por um minuto. A esta preparação, foi adicionado tampão 1x DTT 0,005; RNase out 40 U e 100 U da enzima High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit da empresa Appliedbiosystems. Esta preparação foi incubada a 50°C por uma hora e depois a 70°C por 15 minutos.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems) utilizando o kit Brilliant III Ultra- Fast QPCR Master Mix da empresa Agilent Technologies nas seguintes condições: um ciclo a 95°C por 3 minutos; seguidos de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos. A curva de dissociação foi obtida da seguinte maneira: 95°C por 1 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos. A determinação da expressão dos genes *HSP 70* e *GPx* foi realizada pomeio de Real Time PCR, em triplicatas, utilizando o gene β -actina como controle. Para cada reação foi utilizado um controle negativo, constituído da mistura de reagentes e água. As sequências e informações dos oligonucleotídeos utilizados são descritas na Tabela 4. As análises para expressão gênica foram conduzidas no Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP, Campus de Botucatu.

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores de genes da actina, do *HSP70* e do *GPx*.

| Gene | Sequência dos <i>Primers</i> 5' - 3' | Amplificado (pb) | Referências |
|----------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|
| β-actina | F: 5'-TGCTGTGTTCCCATCTATCG-3' | 150 | Zhang et al., 2019 |
| | R: 5'-TTGGTGACAATACCGTGTTC-3' | | |
| HSP70 | F: 5'-GGGAGGACTTTGACAACCGA-3' | 219 | Han et al, 2019 |
| | R: 5'-CAAAGCGTGACGAGTGATG-3' | | |
| GPx | F: 5'-GACCAACCCGCAGTACATCA-3' | 205 | Zhang et al., 2018 |
| | R: 5'-GAGGTGCGGGCTTTCCTTTA-3' | | |

3. ANALISES ESTATÍSTICAS

Os dados do experimento foram submetidos à análise de variância e quando apresentarem diferenças significativas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR 5.1 (Ferreira, 2011).

Os resultados da análise da expressão de genes foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn, sem ajuste do valor $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Desempenho zootécnico

Os resultados dos parâmetros de desempenho dos frangos de corte, ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de 7, 21 e 35 dias de idade e o Índice de eficiência produtiva (IEP) aos 35 dias de idade são apresentados na tabela 5 e os desdobramentos das interações (arginina x vitamina C) estão apresentados na tabela 6.

A temperatura influenciou ($P < 0,05$) no ganho de peso e ganho de peso médio diário aos 7, 21 e 35 dias de idade, o consumo de ração aos 21 e 35 dias de idade e a conversão alimentar aos 7 dias de idade. Os pintainhos de 7 dias de idade que estavam sob estresse cíclico tiveram maior ganho de peso e maior ganho de peso diário e melhor conversão alimentar em relação aos que estavam em termoneutralidade e não influenciou ($P = 0,25$) no consumo de ração. No entanto, aos 21 e 35 dias de idade o estresse cíclico determinou ($P < 0,05$) menor ganho de peso, menor ganho de peso diário e menor consumo de ração em relação aos frangos que estava em termoneutralidade, mas também não influenciou a conversão alimentar.

Tabela 5. Desempenho dos frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina C aos 7, 21 e 35 dias de idade.

| | GP (g) | | | GPD (g) | | | CR (g) | | | CA | | | IEP |
|---|----------|-----------|-----------|---------|----------|---------|--------|-----------|-----------|----------|---------|---------|----------|
| | 7 dias | 21 dias | 35 dias | 7 dias | 21 dias | 35 dias | 7 dias | 21 dias | 35 dias | 7 dias | 21 dias | 35 dias | 35 dias |
| NÍVEIS DE ARGININA (ARG) | | | | | | | | | | | | | |
| 100% | 123,76 | 953,31 a | 2345,40 | 17,68 | 45,39 a | 67,01 | 145,64 | 1170,39 | 3195,78 | 1,251 b | 1,228 a | 1,369 | 479,19 |
| 130% | 109,12 | 908,47 b | 2279,71 | 15,58 | 43,27 b | 65,13 | 153,50 | 1137,30 | 3135,09 | 1,357 a | 1,250 a | 1,389 | 459,87 |
| 160% | 124,68 | 931,47 ab | 2279,71 | 17,81 | 44,35 ab | 65,13 | 160,26 | 1163,47 | 3140,78 | 1,290 ab | 1,253 a | 1,388 | 454,99 |
| NÍVEIS DE VITAMINA C (VIT C) | | | | | | | | | | | | | |
| 0 ppm | 114,14 | 912,14 b | 2264,34 b | 16,30 | 43,43 b | 64,69 b | 151,95 | 1138,81 | 3112,97 b | 1,347 a | 1,250 | 1,390 | 454,69 |
| 200 ppm | 124,23 | 950,21 a | 2338,87 a | 17,75 | 45,25 a | 66,82 a | 154,32 | 1175,29 | 3201,27 a | 1,254 b | 1,238 | 1,374 | 474,68 |
| TEMPERATURA (T°C) | | | | | | | | | | | | | |
| Termoneutralidade | 115,83 b | 946,20 a | 2345,18 a | 16,54 b | 45,05 a | 67,00 a | 154,76 | 1175,94 a | 3241,47 a | 1,355 a | 1,242 | 1,389 | 476,59 a |
| Estresse cíclico | 122,55 a | 916,14 b | 2258,03 b | 17,51 a | 43,62 b | 64,51 b | 151,51 | 1138,16 b | 3072,77 b | 1,246 b | 1,246 | 1,375 | 452,77 b |
| NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (Pr>Fc) | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,0000 | 0,0013 | 0,0556 | 0,0000 | 0,0013 | 0,0558 | 0,0003 | 0,0765 | 0,3533 | 0,0303 | 0,0421 | 0,2966 | 0,1858 |
| VIT C | 0,0000 | 0,0001 | 0,0042 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0042 | 0,4035 | 0,0041 | 0,0218 | 0,0045 | 0,1607 | 0,1995 | 0,0800 |
| T °C | 0,0045 | 0,0023 | 0,0009 | 0,0045 | 0,0023 | 0,0009 | 0,2538 | 0,0030 | 0,0000 | 0,0011 | 0,7069 | 0,2521 | 0,0376 |
| ARG*VITC | 0,0000 | 0,0900 | 0,3554 | 0,0000 | 0,0898 | 0,3549 | 0,0002 | 0,0083 | 0,8197 | 0,2020 | 0,2113 | 0,2322 | 0,3213 |
| ARG*T°C | 0,6072 | 0,4293 | 0,9288 | 0,6053 | 0,4284 | 0,9285 | 0,4830 | 0,2878 | 0,4386 | 0,4248 | 0,7533 | 0,1962 | 0,3380 |
| VITC* T°C | 0,8109 | 0,5375 | 0,4282 | 0,8117 | 0,5378 | 0,4288 | 0,1105 | 0,6254 | 0,5410 | 0,3398 | 0,1750 | 0,8073 | 0,7868 |
| ARG*VITC* T°C | 0,7852 | 0,8617 | 0,6819 | 0,7846 | 0,8615 | 0,6824 | 0,2927 | 0,5761 | 0,4821 | 0,5770 | 0,6157 | 0,1389 | 0,6325 |
| CV (%) | 9,46 | 5,04 | 5,39 | 9,46 | 5,04 | 5,39 | 9,05 | 5,24 | 5,86 | 12,09 | 3,48 | 4,23 | 11,89 |

CV (%) = Coeficiente variação.

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si.

A inclusão de arginina aos 21 dias de idade proporcionou diferenças significativas ($P < 0,05$) para conversão alimentar aos 7 dias de idade, para o ganho de peso e para o ganho de peso diário aos 21 dias de idade. Aos 7 dias de idade as variações de arginina de 100% e 130% apresentaram diferenças entre si na conversão alimentar, sendo que os frangos que receberam dieta com 100% da exigência de arginina tiveram melhor conversão alimentar que os frangos que receberam dieta com 130% de arginina. Aos 21 dias os frangos que receberam dieta de 100% de exigência de arginina apresentaram melhores ganho de peso e ganho de peso diário do que os frangos que receberam dieta com 130%. Aos 35 dias diferente do que aconteceu nas fases anteriores o ganho de peso ($P = 0,05$), o ganho de peso diário ($P = 0,05$), o consumo de ração ($P = 0,35$), conversão alimentar ($P = 0,29$) e índice de eficiência produtivo ($P = 0,18$) não foram influenciados pelos níveis de arginina.

A vitamina C determinou ($P < 0,05$) maior ganho de peso, maior ganho de peso diário aos 21 e 35 dias de idade e maior consumo de ração aos 35 dias de idade e melhor conversão alimentar aos 7 dias de idade em relação a dieta com ausência de vitamina C, aumentou em 4,17% no ganho de peso e 4,19% ganho de peso diário aos 21 dias e 3,29% o ganho de peso e ganho de peso diário e 2,83% o consumo de ração aos 35 dias de idade mas, não teve influência sobre a conversão alimentar e o índice de eficiência produtivo e melhorou a conversão alimentar das aves em 6,9%.

Tabela 6 – Desdobramento da interação nível arginina e vitamina C para ganho de peso (GP) ganho de peso diário (GPD) e consumo de ração (CR) aos 7 e 21 dias de idade.

| Vit C (ppm) | Arginina (%) | | |
|--------------------|--------------|------------|-----------|
| | 100 | 130 | 160 |
| GP (g) aos 7 dias | | | |
| 0 | 121,59 A | 95,06 Bb | 125,78 A |
| 200 | 125,94 | 123,19 a | 123,59 |
| GPD (g) aos 7 dias | | | |
| 0 | 17,37 A | 13,58 Bb | 17,96 A |
| 200 | 17,59 | 17,65 a | 17,99 |
| CR (g) aos 7 dias | | | |
| 0 | 156,71 A | 135,71 Bb | 163,40 A |
| 200 | 150,56 | 155,56 a | 157,12 |
| CR (g) aos 21 dias | | | |
| 0 | 1167,62 A | 1091,21 Bb | 1157,59 A |
| 200 | 1173,15 | 1183,38 a | 1169,34 |

A, B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha, diferem entre si para suplementação com arginina.

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si para suplementação com vitamina C.

Ocorreu interação ($P < 0,05$) entre os níveis de arginina e vitamina C para o ganho de peso, ganho de peso diário e consumo de ração que apresentaram comportamentos semelhantes

aos 7 dias de idade e consumo de ração aos 21 dias de idade. Aos 7 e 21 dias de idade em todas as variáveis os frangos que receberam dietas com 100% e 160% de arginina tiveram maiores resultados em relação aos que receberam 130% de arginina. No entanto, a inclusão de 200 ppm de vitamina C na dieta com 130% de arginina aos 7 dias de idade melhorou aproximadamente 30% o ganho de peso e o ganho de peso médio, no entanto houve um aumento de 14% do consumo de ração com a inclusão da vitamina C e aos 21 dias de idade aumentou o consumo em aproximadamente 8%.

4.2. Peso relativo de órgãos e histomorfometria de bursa de Fabrícus

Os resultados dos pesos relativos dos órgãos do sistema imune, bursa, timo, baço e da percentagem da área do córtex da bursa de Fabrícus de frangos de corte suplementados com arginina digestível e vitamina C em termoneutralidade e em estresse por calor são apresentados na tabela 7 e os desdobramentos das interações (arginina x vitamina C x temperatura) estão apresentados na tabela 8.

Os resultados para o peso dos órgãos linfoides Bursa, timo e baço não apresentaram diferenças significativas em função dos tratamentos e nem tiveram interações (tabela 7).

Tabela 7. Peso relativo de órgão do sistema imune e percentual do córtex da bursa de frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina C criados em termoneutralidade e estresse por calor.

| | Bursa (%) | Timo (%) | Baço (%) | Córtex da bursa (%) |
|---|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|
| NÍVEIS DE ARGININA (ARG) | | | | |
| 100 | 0,067 | 0,435 | 0,093 | 37,55 |
| 130 | 0,065 | 0,448 | 0,096 | 37,13 |
| 160 | 0,066 | 0,491 | 0,102 | 39,33 |
| NÍVEIS DE VITAMINA C (VIT C) | | | | |
| 0 | 0,064 | 0,455 | 0,096 | 37,12 |
| 200 | 0,068 | 0,462 | 0,098 | 38,93 |
| TEMPERATURA (T°C) | | | | |
| Termoneutralidade | 0,065 | 0,451 | 0,094 | 38,74 |
| Estresse cíclico | 0,066 | 0,465 | 0,100 | 37,36 |
| NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (Pr>Fc) | | | | |
| ARG | 0,8680 | 0,1714 | 0,4671 | 0,0000 |
| VIT C | 0,3739 | 0,7790 | 0,8018 | 0,0000 |
| T °C | 0,8377 | 0,5919 | 0,3364 | 0,0001 |
| ARG*VITC | 0,8717 | 0,6210 | 0,8745 | 0,0101 |
| ARG*T°C | 0,9371 | 0,6028 | 0,1180 | 0,0012 |
| VITC* T°C | 0,7440 | 0,0174 | 0,9739 | 0,9975 |
| ARG*VITC* T°C | 0,2185 | 0,1212 | 0,3386 | 0,0000 |
| CV (%) | 27,71 | 26,89 | 28,72 | 20,82 |

CV (%) = Coeficiente variação.

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si.

Foi verificada interação entre arginina, vitamina C e temperatura para o percentual da área cortical da bursa (tabela 8). Podemos observar que houve uma redução de 11% da área cortical da Bursa de frangos corte sob estresse cíclico em relação aos que estavam em termoneutralidade com 0ppm de vitamina C e 100% de arginina. Entretanto, os frangos de corte, criados em termoneutralidade que obtiveram maior área cortical receberam dietas com suplementação com 0 ppm de vitamina C com 100%; 200ppm de vitamina C com 130 e 160% de arginina. Mas, quando expostos ao estresse cíclico os frangos que obtiveram maior percentagem da área cortical da Bursa receberam dietas com suplementação de 200ppm de vitamina C ou 160% de arginina.

Tabela 8. Desdobramento da interação nível arginina, vitamina C e temperatura para o percentual do córtex da Bursa.

| Vit C (ppm) | Temperatura | Arginina (%) | | |
|---------------------|-------------------|--------------|-----------|------------|
| | | 100 | 130 | 160 |
| Córtex da Bursa (%) | | | | |
| 0 | Termoneutralidade | 38,67 Aax | 36,35 Bbx | 37,91 ABby |
| 200 | | 36,53 Bby | 41,53 Aax | 41,89 Aax |
| 0 | Estresse Cíclico | 34,22 Bby | 35,64 Bax | 40,52 Aax |
| 200 | | 41,17 Aax | 35,94 Bay | 37,25 Bby |

A, B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha, diferem entre si para suplementação com arginina.

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si para suplementação com vitamina C

x,y Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si para temperatura.

4.3. Perfil bioquímico

Os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos estão apresentados na tabela 9.

Os níveis de arginina, vitamina C e a temperatura não influenciaram ($P>0,05$) os níveis séricos de glicose e creatina quinase dos frangos de corte. No entanto, a arginina influenciou ($P<0,05$) os níveis de colesterol no sangue. A suplementação de arginina na dieta em 160% da exigência diminuiu o nível de colesterol sérico dos frangos em relação aos que receberam 130% da exigência.

Os níveis de arginina, vitamina C e a temperatura não influenciaram ($P>0,05$) os níveis séricos de glicose e creatina quinase dos frangos de corte. No entanto, a arginina influenciou ($P<0,05$) os níveis de colesterol no sangue. A suplementação de arginina na dieta em 160% da exigência diminuiu o nível de colesterol sérico dos frangos em relação aos que receberam 130% da exigência.

Tabela 9. Dados séricos bioquímicos suplementados com arginina e vitamina C criados em termoneutralidade e estresse por calor.

| | Glicose (mg/dL) | Colesterol (mg/dL) | CK (UI/L) |
|---|----------------------------|-------------------------------|----------------------|
| NÍVEIS DE ARGININA (ARG) | | | |
| 100 | 256,92 a | 154,71 ab | 17386,25 |
| 130 | 268,45 a | 163,79 a | 25547,91 |
| 160 | 257,61 a | 148,82 b | 30172,66 |
| NÍVEIS DE VITAMINA C (VIT C) | | | |
| 0 | 259,91 | 156,74 | 25613,44 |
| 200 | 262,08 | 154,80 | 23124,44 |
| TEMPERATURA (T°C) | | | |
| Termoneutralidade | 260,66 | 158,58 | 27088,33 |
| Estresse cíclico | 261,13 | 152,96 | 21649,55 |
| NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (Pr>Fc) | | | |
| ARG | 0,0418 | 0,0148 | 0,0838 |
| VIT C | 0,5967 | 0,6374 | 0,5945 |
| T °C | 0,9471 | 0,1751 | 0,2468 |
| ARG*VITC | 0,6407 | 0,9763 | 0,9859 |
| ARG*T°C | 0,0923 | 0,5243 | 0,5836 |
| VITC* T°C | 0,4339 | 0,5517 | 0,6775 |
| ARG*VITC* T°C | 0,1291 | 0,2302 | 0,7296 |
| CV (%) | 6,64 | 11,15 | 80,97 |

CV (%) = Coeficiente variação.

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si. CK = creatina quinase

4.4. Hemograma completo, contagem diferencial de leucócitos.

Os resultados do hemograma completo aos 10 dias de idade são apresentados na tabela 10 e os desdobramentos das interações duplas estão apresentados na tabela 11 e da interação nível arginina, vitamina C e temperatura na tabela 12.

Como pode ser observado a vitamina C não influenciou significativamente ($P > 0,05$) o hemograma completo e as análises de VCM, HCM, monócitos e eosinófilos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) para nenhuma das variáveis.

Os basófilos e a proteína total (PT) foram influenciadas pela arginina em que os frangos que receberam dieta de 160% de exigência de arginina apresentaram menores valores de proteína total em relação ao nível de 100% de arginina e os valores de basófilos apresentaram menores em relação a 130% de arginina.

A temperatura mostrou-se significativa ($P < 0,05$) para as hemácias, linfócitos e relação H/L o qual o estresse cíclico influenciou no aumento do número das hemácias e da relação H/L e diminuição número dos linfócitos em relação a termoneutralidade.

Tabela 10. Valores hematológicos de frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina C aos 10 dias de idade.

| | Hematócrito (%) | Hemoglobina (g/dL) | Hemácias (x10 ⁶ /mm ³) | VCM (fl) | HCM (pg) | PT (g/dL) | Leucócitos (µl) | Heterofilos (%) | Linfócitos (%) | H/L | Monocitos (%) | Eosinófilos (%) | Basófilos (%) |
|---|-----------------|--------------------|---|----------|----------|-----------|-----------------|-----------------|----------------|--------|---------------|-----------------|---------------|
| NÍVEIS DE ARGININA (ARG) | | | | | | | | | | | | | |
| 100% | 28,25 | 9,41 | 1,55 | 189,84 | 63,28 | 2,60 a | 9708,33 | 32,45 | 50,66 | 0,70 | 7,83 | 3,41 | 5,54 ab |
| 130% | 28,45 | 9,48 | 1,49 | 211,46 | 70,48 | 2,58 ab | 9375,00 | 29,33 | 54,00 | 0,60 | 7,58 | 1,87 | 7,20 a |
| 160% | 27,25 | 9,08 | 1,45 | 203,96 | 67,98 | 2,33 b | 9565,21 | 30,16 | 50,58 | 0,62 | 8,41 | 2,41 | 4,25 b |
| NÍVEIS DE VITAMINA C (VIT C) | | | | | | | | | | | | | |
| 0 ppm | 28,25 | 9,41 | 1,51 | 206,64 | 68,88 | 2,55 | 9916,66 | 29,08 | 53,19 | 0,71 | 7,19 | 2,27 | 5,41 |
| 200 ppm | 27,72 | 9,24 | 1,48 | 196,87 | 65,62 | 2,46 | 9171,42 | 32,22 | 50,30 | 0,58 | 8,69 | 2,86 | 5,91 |
| TEMPERATURA (T°C) | | | | | | | | | | | | | |
| Termoneutralidade | 27,50 | 9,16 | 1,40 b | 216,99 | 72,33 | 2,56 | 9055,55 | 28,22 | 55,44 a | 0,54 b | 8,05 | 2,61 | 5,61 |
| Estresse cíclico | 28,47 | 9,49 | 1,59 a | 186,52 | 62,17 | 2,45 | 10057,14 | 33,08 | 48,05 b | 0,75 a | 7,83 | 2,52 | 5,72 |
| NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (Pr>Fc) | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,0907 | 0,0905 | 0,6540 | 0,5743 | 0,5744 | 0,0336 | 0,2311 | 0,5396 | 0,5017 | 0,5231 | 0,8371 | 0,1134 | 0,0281 |
| VIT C | 0,2678 | 0,266w0 | 0,7987 | 0,5660 | 0,5661 | 0,3221 | 0,7202 | 0,1898 | 0,2879 | 0,0839 | 0,2044 | 0,3357 | 0,5718 |
| T °C | 0,0437 | 0,0436 | 0,0393 | 0,0773 | 0,0772 | 0,2197 | 0,9682 | 0,0443 | 0,0080 | 0,0069 | 0,8499 | 0,8902 | 0,8999 |
| ARG*VITC | 0,6871 | 0,6873 | 0,3286 | 0,3837 | 0,3837 | 0,6413 | 0,2700 | 0,4406 | 0,5226 | 0,5972 | 0,5361 | 0,1827 | 0,8954 |
| ARG*T°C | 0,0222 | 0,0219 | 0,2869 | 0,8161 | 0,8160 | 0,2477 | 0,0167 | 0,8684 | 0,8580 | 0,8614 | 0,1231 | 0,1827 | 0,6590 |
| VITC* T°C | 0,3210 | 0,3217 | 0,7655 | 0,7362 | 0,7363 | 0,928 | 0,1668 | 0,7702 | 0,7118 | 0,3632 | 0,2395 | 0,0629 | 0,5718 |
| ARG*VITC* T°C | 0,8983 | 0,8996 | 0,5663 | 0,3491 | 0,3491 | 0,8888 | 0,0576 | 0,0195 | 0,4403 | 0,0333 | 0,2454 | 0,0659 | 0,6734 |
| CV (%) | 7,1538 | 7,1562 | 25,3138 | 35,6302 | 35,6300 | 15,538877 | 32,5960 | 32,7560 | 22,0879 | 48,80 | 62,4386 | 99,2454 | 65,8456 |

CV (%) = Coeficiente variação. VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, média, PT= Proteína total, H/L = relação heterofilo/linfócito.

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si.

Foi verificada correlação entre arginina e temperatura para hematócitos, hemoglobinas e leucócitos. Quando expostos a termoneutralidade os níveis de arginina não foram significativos para o hematócrito, leucócitos e para hemoglobina, no entanto, os frangos de corte que estavam sob o estresse cíclico foram influenciados pelos os níveis de arginina, frangos que receberam dieta com 160% de arginina diminuiu os valores do hematócrito em relação a 100% de arginina.

A % do hematócrito dos frangos que receberam a dieta com 130% de arginina em termoneutralidade aumentou em relação aos frangos com 130% de arginina e estresse.

Os frangos de corte que estavam recebendo a mesma dieta de 100% de arginina obtiveram maior valor de leucócitos sob estresse cíclico do que sob termoneutralidade. No entanto, observa-se que quando adicionou 130% e 160% de arginina nos frangos que estava sob estresse cíclico reduziu os valores de leucócitos em relação aos de 100%.

Tabela 11. Desdobramento da interação nível arginina e temperatura para hematócrito, leucócitos e hemoglobina aos 10 dias.

| Temperatura | Arginina (%) | | |
|-------------------|--------------|-----------|------------|
| | 100 | 130 | 160 |
| Hematócrito | | | |
| Termoneutralidade | 28,50 | 27,08 b | 26,91 |
| Estresse Cíclico | 29,83 A | 28,00 Aa | 27,58 B |
| Leucócitos | | | |
| Termoneutralidade | 8333,33 b | 9333,33 | 9500,00 |
| Estresse Cíclico | 11083,33 Aa | 7166,66 B | 8833,33 AB |
| Hemoglobina | | | |
| Termoneutralidade | 9,50 | 9,02 b | 8,97 |
| Estresse Cíclico | 9,33 AB | 9,94 Aa | 9,19 B |

A, B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha, diferem entre si para suplementação com arginina.

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si para suplementação com vitamina C

Tabela 12. Desdobramento da interação nível arginina, vitamina C e temperatura para heterofilos aos 10 dias de idade.

| Vit C (ppm) | Temperatura | Arginina (%) | | |
|-------------|-------------------|--------------|-------|----------|
| | | 100 | 130 | 160 |
| Heterofilos | | | | |
| 0 | Termoneutralidade | 33,83 | 27,83 | 26,66 y |
| 200 | | 24,66 y | 27,50 | 28,83 |
| 0 | Estresse Cíclico | 33,00 | 35,66 | 41,00 ax |
| 200 | | 38,33 x | 31,00 | 24,16 b |

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si para suplementação com vitamina C

x, y Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha, diferem entre si para temperatura.

Houve interação entre arginina, vitamina C e temperatura para heterofilos aos 10 dias de idade. Frangos de corte criados com a mesma dieta com 100% de arginina e 200 ppm de vitamina C observou-se um aumento de 35% no número de heterofilos nos animais que estavam sob estresse do que nos animais que estavam em termoneutralidade.

Frangos de corte que recebiam 160% de arginina e 200 ppm de vitamina C diminuiu o número de heterofilos em frangos que recebiam dieta de 0 ppm de vitamina C e 160% arginina sob estresse térmico.

E ao comparar frangos que recebiam a dieta com 160% de arginina com 0ppm de vitamina C observa-se maior número de heterofilos com estresse cíclico do que os frangos que se encontram em termoneutralidade.

Tabela 13. Valores hematológicos de frangos de corte alimentados com arginina digestível e vitamina C aos 35 dias de idade.

| | Hematócrito (%) | Hemoglobina (g/dL) | Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | VCM (fl) | HCM (pg) | PT (g/dL) | Leucócitos (μl) | Heterofilos (%) | Linfócitos (%) | H/L | Monócitos (%) | Eosinófilos (%) | Basófilos (%) |
|---|-----------------|--------------------|--|----------|----------|-------------------|------------------------------|-----------------|----------------|--------|---------------|-----------------|---------------|
| NÍVEIS DE ARGININA (ARG) | | | | | | | | | | | | | |
| 100% | 30,92 | 10,31 | 1,89 | 171,71 | 57,24 | 6,28 | 15208,33 | 37,42 | 46,63 | 0,88 | 3,79 | 3,08 | 4,92 |
| 130% | 30,92 | 10,31 | 1,86 | 177,80 | 59,27 | 5,99 | 16500,00 | 38,96 | 46,08 | 0,98 | 5,67 | 4,17 | 5,13 |
| 160% | 31,33 | 10,44 | 1,74 | 186,49 | 62,17 | 6,17 | 16791,67 | 40,67 | 45,83 | 0,99 | 5,38 | 3,00 | 6,29 |
| NÍVEIS DE VITAMINA C (VIT C) | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 30,50 | 10,17 | 1,88 | 172,41 | 57,47 | 6,17 | 16694,44 | 39,36 | 44,08 | 0,89 | 5,11 | 3,53 | 5,14 |
| 200 ppm | 31,61 | 10,54 | 1,78 | 184,92 | 61,64 | 6,12 | 15638,89 | 38,67 | 48,28 | 1,00 | 4,78 | 3,31 | 5,75 |
| TEMPERATURA (T°C) | | | | | | | | | | | | | |
| Termoneutralidade | 31,17 | 10,39 | 1,92 | 168,09 | 56,03 | 6,32 ^a | 16888,89 | 41,64 | 43,14 | 1,12 a | 5,91 a | 3,58 | 5,94 |
| Estresse cíclico | 30,94 | 10,31 | 1,74 | 189,25 | 63,08 | 5,96 b | 15444,44 | 36,39 | 49,22 | 0,78 b | 3,97 b | 3,25 | 4,94 |
| NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (Pr>Fc) | | | | | | | | | | | | | |
| ARG | 0,909 | 0,9097 | 0,3965 | 0,5397 | 0,5395 | 0,0576 | 0,5515 | 0,6265 | 0,9769 | 0,7263 | 0,235 | 0,3592 | 0,4399 |
| VIT C | 0,2211 | 0,2211 | 0,2523 | 0,2545 | 0,2545 | 0,5625 | 0,4036 | 0,8004 | 0,1746 | 0,3817 | 0,7287 | 0,7639 | 0,5172 |
| T °C | 0,8055 | 0,8053 | 0,0604 | 0,0563 | 0,0563 | 0,0004 | 0,2543 | 0,0596 | 0,0509 | 0,0096 | 0,0465 | 0,6524 | 0,2906 |
| ARG*VITC | 0,1573 | 0,1566 | 0,6702 | 0,8052 | 0,8052 | 0,5555 | 0,1801 | 0,9557 | 0,5783 | 0,7574 | 0,1292 | 0,34 | 0,2277 |
| ARG*T°C | 0,4315 | 0,4308 | 0,2001 | 0,1958 | 0,1957 | 0,3664 | 0,9621 | 0,9011 | 0,4222 | 0,6754 | 0,8762 | 0,4841 | 0,2047 |
| VITC* T°C | 0,0525 | 0,0527 | 0,5865 | 0,1824 | 0,1824 | 0,9077 | 0,8256 | 0,6785 | 0,3433 | 0,8520 | 0,7725 | 0,4998 | 0,4443 |
| ARG*VITC* T°C | 0,6918 | 0,6916 | 0,0379 | 0,0834 | 0,0834 | 0,5667 | 0,595 | 0,3167 | 0,9462 | 0,6457 | 0,8501 | 0,9831 | 0,3515 |
| CV (%) | 12,27 | 12,27 | 20,73 | 25,81 | 25,81 | 6,59 | 32,93 | 29,74 | 28,05 | 0,55 | 82,07 | 91,44 | 73,09 |

CV (%) = Coeficiente variação. VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, média, PT= Proteína total, H/L = relação heterofilo/linfócito

a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si.

Tabela 14. Desdobramento da interação nível arginina, vitamina C e temperatura para hemácias de frangos de corte aos 35 dias.

| Vit C (ppm) | Temperatura | Arginina (%) | | |
|-------------|-------------------|--------------|--------|---------|
| | | 100 | 130 | 160 |
| | | Hemácias | | |
| 0 | Termoneutralidade | 2,02 x | 1,9 | 1,73 |
| 200 | | 2,07 | 1,75 | 1,99 x |
| 0 | Estresse Cíclico | 1,56y | 1,67 | 1,76 |
| 200 | | 1,87 AB | 2,09 A | 1,46 By |

A, B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha, diferem entre si para suplementação com arginina.

x,y Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna, diferem entre si para temperatura.

Os resultados do hemograma completo aos 35 dias de idade são apresentados na tabela 13 e os desdobramentos das interações estão apresentados na tabela 14.

Como pode ser observado aos 35 dias a arginina e a vitamina C não influenciaram significativamente ($P>0,05$) no hemograma completo, no entanto, a temperatura influenciou significativamente ($P>0,05$) a proteína total, relação H/L e os monócitos no qual, os frangos de corte que estavam sob estresse térmico apresentaram uma diminuição dos valores em relação aos frangos que estavam sob termoneutralidade.

Foi verificada correlação entre arginina, vitamina C e temperatura para hemácias. O estresse térmico diminuiu a porcentagem de hemácias em frangos de corte que recebiam dieta 100% arginina e 0ppm de vitamina C e dieta com 160% arginina e 200ppm de vitamina C em relação aos animais que estavam em termoneutralidade.

4.5. Expressão genica da *HSP 70* e *GPx*

Os resultados da análise da expressão relativa dos genes *HSP 70* e *GPx* se encontram no gráfico 1A, 1B, 1C e 1D respectivamente.

Para o gene *HSP 70* observou-se (Gráfico 1A) para o tratamento com 100% arginina e 200ppm de vitamina C tanto para frangos em estresse cíclico ou em termoneutralidade apresentaram regulação positiva no tratamento não apresentando diferença significativa entre eles. No entanto, o tratamento com 130% e 160% de arginina frangos que estavam em ambiente de termoneutralidade observou-se regulação negativa, mas, para os que estavam sob estresse cíclico apresentou regulação positiva, apresentando diferença significativa em relação a temperatura. Todos os tratamentos dentro do ambiente termoneutro diferiram significativamente entre si, o que mesmo expressou o gene *HSP 70* foi o tratamento 130% de arginina e 200ppm, entretanto, quando observamos todos os tratamentos do ambiente com

estresse cíclico os frangos que mais expressaram esse gene estava recebendo a dieta com 130% de arginina e 200ppm.

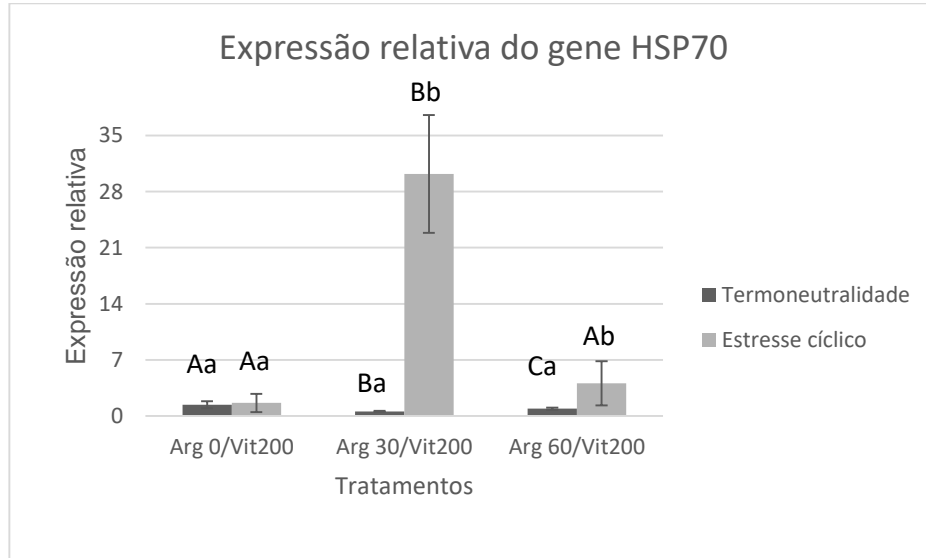
No gráfico 1 B observou-se para o tratamento com 130% de arginina e 0 ppm de vitamina C em termoneutralidade apresentou uma regulação negativa, no entanto, em estresse cíclico apresentou regulação positiva e apresentaram diferença significativa entre eles. Já o tratamento com 160% de arginina e 0ppm de vitamina C em ambas as temperaturas apresentaram regulação positiva também apresentaram diferença significativa entre eles. Ao comparar todos os tratamentos dentro do ambiente termoneutro apresentaram diferença significativa e os tratamentos com estresse cíclico também apresentaram diferença significativa entre eles.

Para o gene GPx observou-se (Gráfico 2A) que todos os tratamentos que estavam sob termoneutralidade apresentaram regulação negativa, já o tratamentos que estavam sob estresse cíclico apresentaram regulação positiva. Dentro das dietas 100% e 200ppm de vitamina C e 160% e 200ppm de vitamina C apresentaram diferença significativamente ao comparar a mesma dieta com diferentes temperaturas. O tratamento 130% de arginina e 200 ppm não apresentou diferença significativa entre as diferentes temperaturas. O tratamento 160% de arginina e 200ppm de vitamina C dentro do ambiente termoneutro apresentou maior expressão desse gene diferindo significativamente dos outro 2 tratamentos. Já no ambiente de estresse entre si, o que mesmo expressou o gene *HSP 70* foi o tratamento 100% de arginina e 200ppm, entretanto, quando observamos todos os tratamentos do ambiente com estresse cíclico os frangos que menos expressaram esse gene estava recebendo a dieta com 130% de arginina e 200ppm.

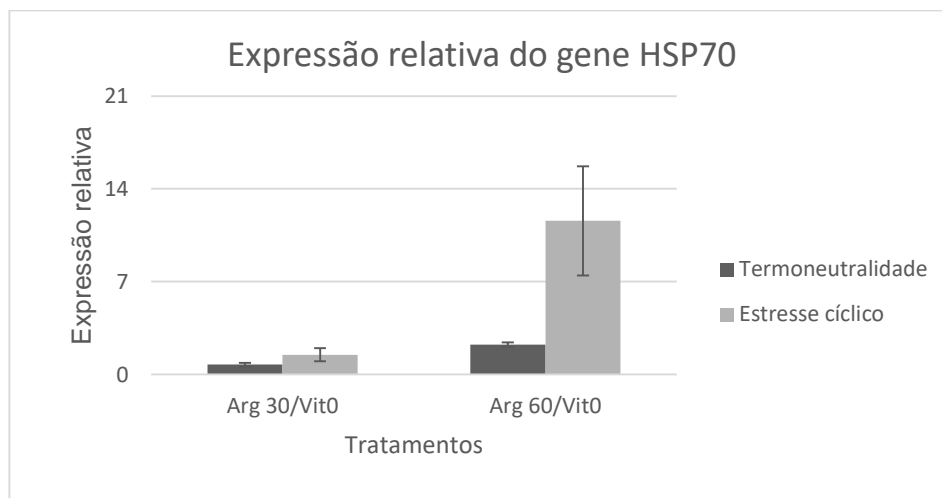
No gráfico 2B observou-se para o tratamento com 130% de arginina e 0 ppm de vitamina C em termoneutralidade apresentou uma regulação negativa, no entanto, em estresse cíclico apresentou regulação positiva e apresentaram diferença significativa entre eles. Já o tratamento com 160% de arginina e 0ppm de vitamina C em ambas as temperaturas apresentaram regulação positiva também apresentaram diferença significativa entre eles. Ao comparar todos os tratamentos dentro do ambiente termoneutro apresentaram diferença significativa, no entanto, os tratamentos com estresse cíclico não apresentaram diferença significativa entre eles.

Gráfico 1- Expressão relativa dos genes (A) (B) *HSP 70* em frangos de corte suplementados com arginina e vitamina C

(A)



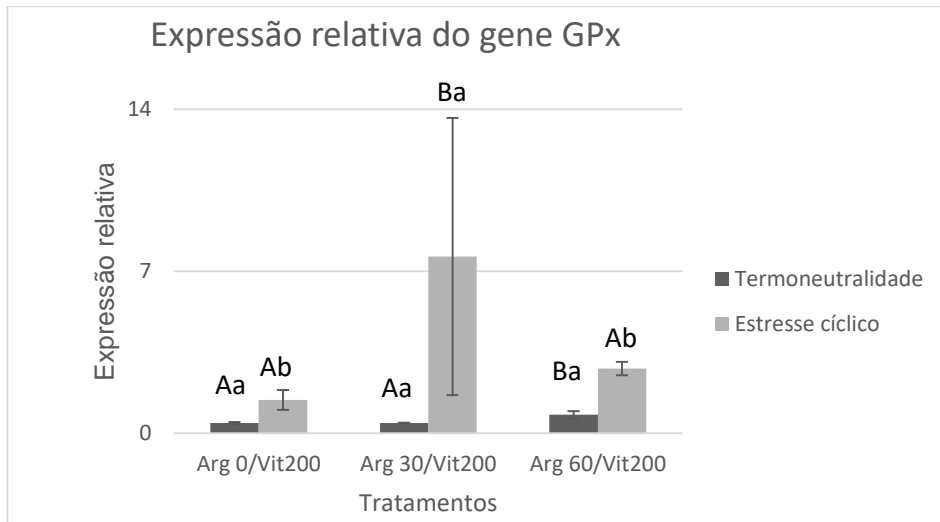
(B)



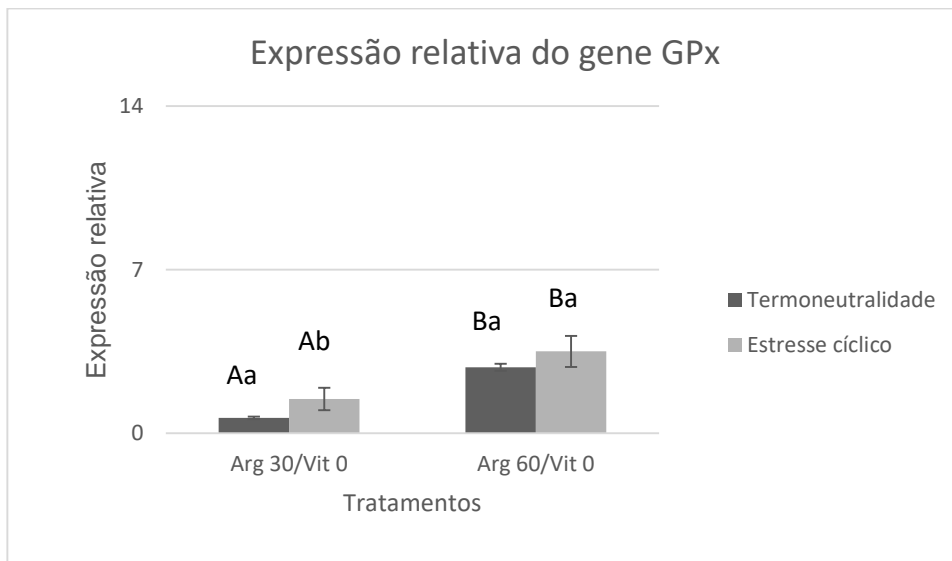
A, B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes dentro das temperaturas
a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes dentro de cada dieta

Gráfico 2- Expressão relativa dos genes (C) (D) GPx em frangos de corte suplementados com arginina e vitamina C.

(A)



(B)



A, B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes dentro das temperaturas
a, b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes dentro de cada dieta

5. DISCUSSÃO

Neste estudo vimos que aos 7 dias de idade os pintainhos apresentaram melhor adaptação a alta temperatura, visto que esses animais nos primeiros dias não estavam ofegantes e apresentaram melhores índices zootécnicos do que nos frangos que estavam em menor temperatura, já aos 21 e 35 dias idade o estresse cíclico diminuiu os índices zootécnicos. Na fase inicial os pintainhos são mais suscetíveis ao frio do que ao calor essa situação muda

conforme esses pintainhos vão crescendo isso ocorre porque inicialmente há a formação do tecido ósseo e depois o desenvolvimento do tecido muscular (VIEIRA et al. 2017) que aumenta a produção de calor metabólico pelo animal tornando-os mais suscetíveis ao calor.

O efeito negativo do estresse por calor nos parâmetros zootécnicos ocorre porque sob condições de estresse as aves buscam manter a termorregulação através de mecanismos fisiológicos e comportamentais diminuindo o consumo de ração para diminuir a produção de calor metabólico e alocam seus nutrientes e energia que seriam destinados a produção de proteína para manter a homeostase (Bícego *et al.*, 2017) diminuindo a disponibilidade de nutrientes para o metabolismo e prejudicando, assim, o desempenho desses animais.

O impacto negativo do estresse cíclico por calor foi amenizado pela inclusão da vitamina C que pode ser observado através do aumento do ganho de peso, aumento do ganho de peso diário e aumento do consumo de ração. A vitamina C promove aumento dos níveis de T₃ e T₄ circulantes resultando no aumento do metabolismo consequentemente melhorando o consumo de ração, melhorando o desempenho dos frangos mantidos sob estresse (Souza *et al.*, 2011).

A vitamina C também está envolvida no sistema antioxidante que é responsável por reparar danos oxidativos nas células causados pelo excesso de calor mantendo sua integridade (Combs Jr., 2008). Além disso, a suplementação pode ter reduzido os níveis de corticosteroides durante o estresse, resultando em diminuição da degradação tissular, permitindo aos pintos ganharem mais peso (Silva *et al.*, 1993) Mahmoud *et al.* (2004) encontraram redução dos níveis de corticosteróides e de HSP70 em frangos de corte expostos a estresse cíclico por calor (21-30 °C) quando suplementados com Vitamina C (500 mg/kg) na ração.

Aos 35 dias de idade a arginina não afetou o desempenho pode ser explicado que em altas temperaturas apresentam menor atividade arginase renal, desaceleraram o metabolismo de arginina afetando negativamente as vias de síntese de creatina (Chamruspollert *et al.* 2004) sendo que, a creatina desempenha um importante papel no metabolismo energético das aves, principalmente nos tecidos nervosos e musculares (Wu, 2013).

No presente trabalho, a inclusão da arginina, da vitamina C e do estresse por calor não alteraram o peso relativo dos órgãos do sistema imune. No entanto, o estresse por calor causou redução de 11% no percentual da área do córtex da bursa, região em que ocorre a diferenciação e maturação dos linfócitos B, as principais células de defesa do sistema humoral. Entretanto, adição de 160% de arginina ou de 200ppm de vitamina C aumentou em 18,41% e 20,30% a área percentual do córtex da bursa de Fabrícus em frangos de corte sob estresse cíclico pelo calor. A corticosterona pode ocasionar involução do tecido linfóide e a supressão da imunidade humoral e celular (Rosales *et al.*, 1989) a não alteração do peso dos órgãos pode indicar que a

corticosterona que é liberada pelo desafio de estresse pode não ter sido suficiente para provocar uma involução dos tecidos linfoides mas, diminuiu a percentagem da área do córtex da bursa que pode estar relacionado com a responsividade do sistema imune das aves sendo que menor percentagem de área pode ter relação com redução na produção e/ou amadurecimentos das células do sistema imunológico. Entretanto, a maior área percentual do córtex da Bursa com a suplementação da vitamina C pode estar relacionada a suas propriedades antioxidantes e por reduzir as concentrações plasmáticas de corticosterona pode melhorar a resposta imune das aves (Souza *et al.*, 2011). A arginina é precursora do glutamato que por sua vez é precursor da glutamina que é o principal combustível metabólico para enterócitos, linfócitos, macrófagos e fibroblastos (Andrews & Griffiths, 2002).

O sistema sanguíneo é particularmente sensível às mudanças de temperatura e se constitui em um importante indicador das respostas fisiológicas da ave a agentes estressores (Borges *et al.*, 2003) podem-se observar alterações nos níveis bioquímicos e ou até mesmo no simples hemograma. A inclusão vitamina C e do estresse por calor não alteraram as concentrações sanguíneas de glicose, colesterol e creatina. A arginina alterou somente a concentração de colesterol, o que pode ter ocorrido devido a redução da expressão da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGR), que é a enzima responsável pela síntese do colesterol (Fouad *et al.*, 2013).

Aos 10 dias de idade teve um aumento da relação heterófilo/linfócito e diminuição da concentração de monócitos nos frangos com 35 dias sendo, indicativos de estresse. Essas alterações podem ser causadas pelos hormônios glicocorticoides que regulam vários processos biológicos e podem inibir o tráfego de células T, B, NK, eosinófilos, basófilos, macrófagos e monócitos (Sapolsky *et al.*, 2000) diminuindo a concentração dessas células no sangue. Entretanto, um dos principais indicadores de estresse pelo hemograma é o aumento razão heterófilos: linfócitos, devido ao número reduzido de linfócitos circulantes e maior número de heterófilos, é indicativo mais seguro de estresse ambiental (Mcfarlane *et al.*, 1989) nesse método é o parâmetro mais confiável para a medição do estresse em aves domésticas porque é menos variável do que o número total de células (Gross & Siegel, 1983).

A expressão de *HSP 70* foi consistentemente maior nos frangos que estava sob estresse cíclico por calor. Isso ocorre porque a *HSP 70* é uma proteína de choque térmico que tem como objetivo proteger o organismo contra lesões celulares desempenhando um papel profundo na modificação da resposta fisiológica ao estresse e na aquisição da tolerância ao estresse. Os tratamentos que continham 130% ou 160% sob estresse tiveram uma expressão maior desse gene do que os tratamentos com 100% de arginina, uma explicação para isso é que a arginina é

precursora de compostos entre eles a glutamina pela via da prolina (Wu, 2013) e de acordo com Zulkifli *et al.* (2016) o fornecimento de glutamina + ácido glutâmico aumentou, em frangos de corte, tolerância ao calor conforme medido pela expressão da proteína de choque térmico (HSP). Sugere-se que o mecanismo pelo qual a suplementação de glutamina + ácido glutâmico aumentou a expressão de *HSP 70* se deva ao metabolismo da glutamina na via biossintética da hexosamina. Esse efeito parece ser mediado via O-glicosilação, translocação nuclear e ativação transcricional de Sp1 e HSF-1 (Hamiel *et al.*, 2009).

Entretanto, verificamos que tratamentos em termoneutralidade obtiveram redução da expressão do *HSP 70* quando suplementados com vitamina C que tem efeito contrário ao da arginina. Mahmoud *et al.*, (2004) sugerem que os radicais livres de oxigênio contribuem para a indução de *HSP*, portanto, a vitamina C conhecida por sua atividade antioxidante diminuindo produção de radicais livres, cujo acúmulo tem sido sugerida como início para a indução da ativação do gene *HSP* levando a conclusão que o status antioxidante melhorado pode atenuar bastante a expressão do gene *HSP 70* em frangos alimentadas com vitamina C.

A expressão da glutationala peroxidase (*GPx*) foi maior nos frangos que estavam sob estresse cíclico e o tratamento que mais expressou foi o dos frangos que receberam dieta com 160% de arginina e 200ppm. Neste estudo, a suplementação com arginina e vitamina C na dieta aumentou significativamente a atividade de *GPx* no fígado, o que é importante para frango corte pois, o *GPx* catalisa a redução do peróxido de hidrogênio diminuindo os danos causados pelo peróxido de hidrogênio causado pelo estresse oxidativo (Mahmoud *et al.*, 2004).

6. CONCLUSÃO

Frangos de corte quando recebem vitamina C sofrem uma resposta ao estresse menos severa após exposição a altas temperaturas, com menor perda dos índices zootécnicos. A suplementação de arginina e vitamina C aumenta a expressão gênica do *HSP70* dando maior resistência as aves durante períodos de calor e aumenta a expressão de *GPx*, indicando aumento na atividade antioxidante dos frangos de corte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrews F J, Griffiths R.D. Glutamine: Essential for immune nutrition in the critically ill Br. J. Nutr., 2002; 87: 3-8.

Abdukalykova ST, Ruiz-Feria CA Arginine and vitamin E improve the cellular immune response of broiler chickens. International Journal of Poultry Science 2006; 5(2): 121-127 2006.

- Bícego KC, Scarpellini CS, Gargaglinoni LH. Termorregulação. In: MACARI M., MAIORKA A. Fisiologia das aves comerciais. Jaboticabal: Funep- Unesp; 2017. p. 466-491p.
- Borges SA, Maiorka A, Silva AVF. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Ciência Rural* 2003; 33 (5):975-981.
- Campbell T W. Hematology of pittcines. In: WEISS D. J., WARDROP J. K. 6th editor Schalm's veterinary hematology. Iowa: Blackwell; 2010. p .968- 976.
- Charles Noriega M L V C. Apuntes de hematología aviar: material didático para curso de hematología aviária. Departamento de Producción Animal: Aves Universidad Nacional Autónoma de México México. 70 p. 2000.
- Chamruspollert, M; Pesti, G M; Bakalli, R I. Chick responses to dietary arginine and methionine levels at different environmental temperatures. *British Poultry Science*, 2004; v.45 (1):93-100, 2004.
- Combs Jr, G F. The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Ithaca New York: 3 ed. ELSEVIER; 2008.
- Fernandes J I M, Rosa D D, Ribeiro M V, Lima E T, Fernandes N L M. Avaliação da arginina dietética sobre a resposta imunológica de frangos de corte imunizados contra a Doença de Gumboro. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 2011; 33(2):151-155.
- Ferreira D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 2011; 35(6).
- Fouad A M, Yang X J, Yao J H Dietary L-arginine supplementation reduces abdominal fat content by modulating lipid metabolism in broiler chickens. *Animal* 2013; 7:1239–1245.
- Hamiel C R, Pinto S, Hau A, Wischmeyer P E. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity *American Journal of Physiol* 2009, 297:1509-1519.
- Han G, Yang H, Wang Y, Zhangr, K Tashiro K, Bung M Furuse Chowdhury V S Effects of in ovo feeding of L-leucine on amino acids metabolism and heat-shock protein-70 and -90 mRNA expression in heat-exposed chicks. *Poultry Science* 2019; 98:1243–1253.
- Horobin RW How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem Glasgow* 2011; 86 (1): 36-51.
- Hosseini-Vashan SJ, Safdari-Rostamabad M, Piray AH, Sarir H The growth performance plasma biochemistry indices immune system antioxidant status and intestinal morphology of heat-stressed broiler chickens fed grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Animal Feed Science and Technology* 2020; 259: 1-10.
- Johnson I R, Ball R O, Baracos V E, Field CJ. Glutamine supplementation influences immune development in the newly weaned piglet *Developmental e Comparative Immunology*, 2006; 30: 1191-1202.
- Kidd MT Peebles ED Whitmarsh SK Yeatman JB Wideman Jr RF. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. *Poultry Science* 2001; 80:1535-1542.
- Lentfer T L, Pendl H, Gebhardt-Henrich S G, Fröhlich E K F, Von Borell E. H/L ratio as a measurement of stress in laying hens – methodology and reliability, 2015; 56 (2):157 – 163.

Oliveira Neto AR, Oliveira WP. Aminoácidos para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia* v.38 suplemento especial 2009; 205-208.

Mahmoud K Z, Edens F W, Eisen E J, Havenstein GB. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2004, 137: 35–42.

Mcfarlane J M, Curtis S E, Simon J, Izquierdo O. A. Multiple Concurrent Stressors in Chicks: 2. Effects on Hematologic, Body Composition, and Pathologic Traits. *Poultry Science* 1989; 68 (4):510–521.

Pagliarone AC, Sforcin JMS Estresse: revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico. *Biosaúde* 2009; 11(1): 57-90.

Santin E, Moraes M L, Sanches A W D. *Imunologia aplicada*. In: MACARI M., MAIORKA A. *Fisiologia das aves comerciais*. Jaboticabal: Funep/ Unesp 2017. p. 466-491.

Skrivan M , Marounek M , Englmaierová M , Skrivanová E Influence of dietary vitamin C and selenium alone and in combination on the composition and oxidative stability of meat of broilers. *Food Chemistry* 2012; 130:660-664.

Silva R D M, Menten J F M, Cardoso M K, Ghihardi G G. Suplementação de vitamina C associada à densidade de criação no desempenho de frangos de corte. *Scientia Agricola* 1993; 50 (3) 490 – 497.

Souza M G, Oliveira R F M, Donzele J L, Maia A P A, Balbino E M, Oliveira W P. Utilização das vitaminas C e E em rações para frangos de corte mantidos em ambiente de alta temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia* v. 40 n. 10 p. 2192-2198 2011.

Ren W , Chen S , Yin J , Duan J , Li T , Liu G , Feng Z , Tan B , Yin Y , Wu G. Dietary arginine supplementation of mice alters the microbial population and activates intestinal innate immunity. *The Journal of Nutrition* 2014; 144: 988-995.

Rosales A G, Villegas P, Lukert P D, Fletcher O J, Mohamed M A, Brown J. Isolation identification and pathogenicity of two field strains of infectious Bursal Virus. *Avian Disease* 1989; 33: 35-41.

Rostagno H S, Albino L F T, Hannas M I, Donzele J L, Sakomura N K , Perazzo F G , Saraiva A Abreu M L T , Rodrigues P B , Oliveira R F , Barreto S L T , Brito C O. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 4. ed. Viçosa: Editora UFV. 2017.

Sapolsky R M, Romero L M, Munck A U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 2000; 21:55-89.

Wang J P, Yan L, Lee J H, Zhou T X, Kim I H. Effects of dietary delta-aminolevulinic acid and vitamin C on growth performance immune organ weight and ferrum status in broiler chicks. *Livestock Science* 2011, 135: 148-152.

Wu G. *Amino Acid: Biochemistry and Nutrition*. 1 ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group LLC, 2013. 458 p.

Zhang J F, Bai K W, Su W P, Wang A A Zhang L L , Huang K H , Wang T. Curcumin attenuates heat-stress-induced oxidant damage by simultaneous activation of GSH-related antioxidant enzymes and Nrf2-mediated phase II detoxifying enzyme systems in broiler chickens. *Poultry Science* 2018; 7:1209–1219.

Zulkifli M, Shakeri A, Soleimani. Dietary supplementation of L-glutamine and L-glutamate in broiler chicks subjected to delayed placement. *Poultry Science* 2016; 95: 2757-2763.

Capítulo 3

1. Implicações

O intuito desse estudo foi, melhorar o sistema imunológico das aves e a sua resistência ao calor através da suplementação dos frangos de corte com arginina, que isoladamente apresenta efeito sobre a resposta imune celular e através da suplementação da vitamina C que é ótimo antioxidante. Existem muitos estudos sobre eles separadamente, no entanto, são raros os estudos com ambos e por isso pouco se sabe sobre o sinergismo entre eles. Este trabalho é um dos poucos estudos sobre o sinergismo desses dois nutrientes importantes pra saúde animal e pode ser o primeiro a avaliar seus efeitos com duas temperaturas diferentes: termoneutralidade e estresse cíclico por calor. Portanto, os resultados desse estudo ajuda no melhor entendimento da associação da arginina e vitamina C na melhoria da saúde de frangos de corte sob um dos principais fatores que influenciam negativamente a produção de frangos de corte que o estresse por calor causando grandes perdas econômicas.

Nesse estudo podemos observar que quando os frangos de corte recebem vitamina C sofrem uma resposta ao estresse menos severa após exposição a altas temperaturas, com menor perda dos índices zootécnicos. A suplementação de arginina e vitamina C aumenta a expressão gênica do HSP70 protegendo mais o organismo contra lesões celulares, assim, dando maior resistência as aves durante períodos de calor, e aumenta a expressão de GPx, indicando aumento na atividade antioxidante dos frangos de corte.

Esse estudo se torna importante para ajudar a amenizar os efeitos negativos do estresse pelo calor nos frangos de corte e conseqüentemente, diminuir perdas econômicas no campo.

Visto que, a arginina e a vitamina C são precursores do colágeno futuros estudos poderiam avaliar o efeito da suplementação da arginina e da vitamina C sob diferentes temperaturas na qualidade final da carne de frango.