UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Departamento de Nutrição e Produção Animal

Cássia Yumi Yonemura

**Efeitos da utilização da levedura hidrolisada como fonte de
nucleotídeos sobre o desempenho e imunidade de frangos de corte**

Pirassununga
2011

Cássia Yumi Yonemura

**Efeitos da utilização da levedura hidrolisada como fonte de
nucleotídeos sobre o desempenho e imunidade de frangos de corte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque

Pirassununga

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE

11/5/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2442
FMVZ

Yonemura, Cássia Yumi

Efeitos da utilização da levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos sobre o desempenho e imunidade de frangos de corte / Cássia Yumi Yonemura. -- 2011.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque.

1. Aditivos. 2. Desempenho. 3. Imunidade. 4. Avicultura. 5. Nucleotídeos.
I. Título.

CERTIFICADO DA BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da utilização de levedura hidrolisada sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte", protocolado sob o nº 1944/2010, utilizando 576 (quinhentos e setenta e seis) frangos de corte, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Effects of hydrolyzed yeast supplementation on performance, intestinal morphology and immunity of broilers", protocol number 1944/2010, utilizing 576 (five hundred seventy-six) broilers, under the responsibility Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: YONEMURA, Cássia Yumi

Título: Efeitos da utilização da levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos sobre o desempenho e imunidade de frangos de corte.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais, Toshico e Lauro, pelos anos dedicados a mim,
por todo apoio, incentivo, carinho e compreensão em todos os desafios
e momentos da minha vida, e aos meus irmãos, Alexandre e Márcio,
que mesmo longe são minhas referências.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ricardo de Albuquerque pela confiança e amizade nesses dois anos de convivência.

Ao meu marido, Tiago Urbano, pelo carinho, compreensão e tolerância. Tudo fica mais fácil quando você está por perto. Amo muito você!

Aos funcionários, Edinho e China, por toda a ajuda e contribuição indispensável durante a realização do experimento.

A todos do CEPTOX, em especial a Ester, Paulo Cesar (PC) e Isis, pela orientação, auxílio, sugestões e momentos de descontração.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Lúcio Francelino Araújo, pela inestimável ajuda e amizade.

Ao professor Otto Mack Junqueira por te aceitar participar da banca e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os professores do departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), pelo convívio e aprendizado durante o curso.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, em especial a Francine, Nayara, João, Pedro, Maria Fernanda, Maria Tereza e Estelinha, sem vocês eu não teria conseguido.

A minha amiga Marília, pela amizade, carinho, e momentos de desabafo quando tudo parece perdido.

Ao Big e Skifa pelos momentos de alegria, companhia e descontração.

Ao Glycon Duarte Santos, meu diretor, pelo apoio e confiança em mim depositada.

A todo o pessoal da empresa ICC, pelo incentivo e compreensão, em especial a Elaine e Júlio, pela companhia, paciência e as boas gargalhadas e ao Alexandre Silva, pela ajuda na coleta de material e principalmente pela paciência e amizade.

As companheiras Carolina (Dorf), Roberta (Alemã), Bia, Joana (Angu) e Eliana por terem me recebido de braços abertos.

A empresa Tortuga pela doação do suplemento vitamínico mineral.

As aves que sem entendimento e razão proporcionaram o aprendizado.

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que nominalmente não estejam aqui citadas.

Muito obrigada!

RESUMO

YONEMURA, C. Y. Efeitos da utilização da levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos sobre o desempenho e imunidade de frangos de corte. [Effects of hydrolyzed yeast as a source of nucleotides on performance and immunity of broilers]. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP., 2011.

Existe atualmente uma restrição muito forte ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação avícola, uma vez que tais produtos passaram a ser vistos como fatores de risco para a saúde humana. Estudos com produtos alternativos tornaram-se necessários e, neste sentido, as leveduras vem sendo exploradas, principalmente, seu conteúdo celular. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de levedura hidrolisada, fonte de nucleotídeos, sobre o desempenho e imunidade de frangos de corte, suplementados no período de 1 a 14 dias de idade. Foram utilizados 576 pintos de corte, machos, linhagem Ross 308, criados até 42 dias de idade sobre cama reutilizada. O delineamento foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos: controle negativo (sem suplementação); controle positivo (com antibiótico) e diferentes níveis de adição de levedura hidrolisada (0,25%; 0,50%; 0,75% e 1,00%), sendo 8 repetições/tratamento. Considerando-se o período total de criação, foram observados efeitos significativos para os parâmetros de ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA). Por sua vez, o parâmetro de consumo de ração (CR) não apresentou efeitos significativos entre os tratamentos. Com relação à imunidade, a suplementação com levedura hidrolisada apresentou efeito sobre a resposta a vacinação contra a doença de Newcastle, produção de água oxigenada, óxido nítrico e influenciou também no peso relativo dos órgãos linfóides, com destaque para o nível 0,75% de suplementação. Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a levedura hidrolisada, suplementada durante o período de 1 a 14 dias de idade, promove efeitos significativos no desempenho durante todo o período de criação e também influencia na imunidade das aves.

Palavras-chave: Aditivos. Desempenho. Imunidade. Avicultura. Nucleotídeos.

ABSTRACT

YONEMURA, C. Y. **Effects of hydrolyzed yeast as a source of nucleotides on performance and immunity of broilers.** [Efeitos da utilização da levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos sobre o desempenho e imunidade de frangos de corte]. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP., 2011.

There is currently a strong restriction on the usage of antibiotics as growth promoters in broiler feed, since such products were seen as risk factors for human health. Research with alternative products has become necessary, and the yeast has been exploited, particularly its cellular content. Thus, this experiment was aimed at evaluating the use of hydrolyzed yeast, source of nucleotides on performance and immunity of broiler chickens supplemented during the period of 1 to 14 days old. A total of 576 male chicks, Ross 308 were raised up to 42 days old, on reused litter. The design was completely randomized with six treatments: negative control (no supplementation), positive control (with antibiotic) and different levels of hydrolyzed yeast (0.25%; 0.50%; 0.75% e 1.00%), with 8 replicates per treatment. Considering the whole breeding period, significant effects were observed for parameters of weight gain (WG) and feed conversion (FC). However, the parameter of feed consumption (FC) had no significant effect among the treatments. Regarding to immunity, the hydrolyzed yeast supplementation had an effect on the response to vaccination against Newcastle disease, production of hydrogen peroxide, nitric oxide and also influenced the relative weight of lymphoid organs, especially the 0.75% level of supplementation. With the results obtained in this experiment it is possible to conclude that the hydrolyzed yeast supplementation, during the period of 1 to 14 days old, promotes a significant effect on performance throughout the whole rearing period and also influences the immunity of the broiler chicks.

Keywords: Additives. Performance. Immunity. Poultry. Nucleotides.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina 5' monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CA	Conversão alimentar
CD4	<i>Cluster of differentiation</i> – molécula presente em todos os linfócitos T-helper
CoA	Coenzima A
CO ₂	Dióxido de carbono
CR	Consumo de ração
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
g	grama
GMPC	Guanosina 5' monofosfato cíclico
GP	Ganho de peso
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kg	kilograma
μl	microlitros
ml	mililitros
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanomoles
NO	Óxido Nítrico
P	Probabilidade
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (pH 7,2)
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

SAS	Statistical Analysis System
sp	Espécie
spp	Espécie
SRBC	Sheep Red Blood Cell
VG/GA	Villegas Glisson/Georgia
Well	Poços

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural dos nucleotídeos.....	27
Figura 2 -	Fórmula estrutural dos nucleosídeos	27
Figura 3 -	Fórmula estrutural das bases nitrogenadas	28
Figura 4 -	Digestão de nucleoproteínas e absorção de nucleosídeos no trato gastrointestinal	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dietas experimentais e níveis nutricionais	37
Tabela 2 - Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte suplementados ou não com levedura hidrolisada, para o período de 1 a 14 dias de idade	45
Tabela 3 - Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte suplementados ou não com levedura hidrolisada, para o período de 1 a 42 dias de idade	47
Tabela 4 - Títulos médios de anticorpos de frangos de corte suplementados ou não com levedura hidrolisada durante o 1º ao 14º dia de idade	49
Tabela 5 - Títulos médios de anticorpos anti-SRBC em frangos de corte, aos 28 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada no período de 1 a 14 dias de idade	51
Tabela 6 - Valores médios das taxas de fagocitose em frangos de corte, aos 35 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada no período de 1 a 14 dias de idade	53
Tabela 7 - Valores médios de água oxigenada liberada por macrófagos de frangos de corte de 35 dias de idade, com ou sem PMA, suplementados ou não com levedura hidrolisada durante no período de 1 a 14 dias de idade	54
Tabela 8 - Valores médios de óxido nítrico, em n moles de nitrito liberados por células peritoneais de frangos de corte com 35 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada durante o período de 1 a 14 dias de idade	56
Tabela 9 - Pesos médios relativos dos órgãos linfóides: bursa, timo e baço de frangos de corte, aos 42 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada em diferentes níveis	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 NUTRIÇÃO INICIAL DAS AVES	19
2.2 LEVEDURAS	23
2.3 USO DE NUCLEOTÍDEOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL	26
2.4 NUCLEOTÍDEOS E IMUNIDADE DAS AVES	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E PERÍODO EXPERIMENTAL	36
3.2 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
3.3 RAÇÕES EXPERIMENTAIS	37
3.4 MANEJO DAS AVES	38
3.5 PARÂMETROS AVALIADOS	38
3.5.1 Desempenho Zootécnico	38
3.5.1.1 <i>Ganho de Peso Médio</i>	39
3.5.1.2 <i>Consumo de Ração</i>	39
3.5.1.3 <i>Conversão Alimentar</i>	39
3.5.2 Imunidade Humoral	39
3.5.2.1 <i>Resposta à Vacinação de Newcastle</i>	39
3.5.2.2 <i>Resposta à Sensibilização Prévia com Eritrócitos de Carneiro</i>	40
3.5.3 Atividade de Macrófagos Peritoneais	41
3.5.3.1 <i>Fagocitose</i>	42
3.5.3.2 <i>Produção de Água Oxigenada</i>	43
3.5.3.3 <i>Óxido Nítrico</i>	43
3.5.4 Peso Relativo dos Órgãos Linfóides	44
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO	45
4.1.1 Desempenho Zootécnico de 1 a 14 dias de idade	45
4.1.2 Desempenho Zootécnico de 1 a 42 dias de idade	47
4.2 IMUNIDADE HUMORAL	49
4.2.1 Resposta à Vacina de Newcastle	49

4.2.2 Resposta à Sensibilização Prévia com Eritrócito de	
<i>Carneiro</i>	51
4.3 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	52
4.3.1 Fagocitose	53
4.3.2 Produção de água oxigenada	54
4.3.3 Óxido Nítrico	55
4.4 PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES	57
5 CONCLUSÕES	59
6 REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A levedura vem sendo estudada desde a década de 70 através de inúmeras pesquisas que tiveram por objetivo viabilizar o uso deste ingrediente como uma fonte proteica alternativa para alimentação animal e, a partir da década de 90, a levedura passou a ter outro enfoque que não apenas a proteína, pois suas propriedades extranutricionais, tais como os carboidratos com funções prebióticas e os nucleotídeos, condicionalmente essenciais, despertaram o interesse dos produtores.

Em paralelo, o setor avícola vem apresentando constante crescimento nas últimas décadas, principalmente devido à competitividade pela conquista de mercado em relação às demais atividades. Esse crescimento está atrelado ao melhoramento genético, adaptação da nutrição aos novos conceitos da genética de alto desempenho, além de rigorosos programas sanitários nos plantéis.

Na nutrição avícola, os antibióticos em doses subterapêuticas foram utilizados, inicialmente, de forma discreta com o objetivo de melhorar o desempenho das aves. Posteriormente, o uso de antibióticos como promotores de crescimento evoluiu para um uso amplo e generalizado na indústria de alimentação animal.

Existe atualmente uma restrição muito forte ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação avícola, uma vez que tais produtos passaram a ser vistos como fatores de risco para a saúde humana, tanto pela presença de resíduos na carne e ovos, como por induzirem a resistência cruzada de bactérias patógenas para humanos.

Diante deste cenário, tornou-se evidente a necessidade de estudos de produtos que possam substituir os antibióticos na nutrição avícola, sem causar perdas de produtividade e comprometer a saúde das aves. Neste contexto, as leveduras como fonte de nucleotídeos vêm sendo exploradas, pois este nutriente pode atuar como alternativo aos antibióticos promotores de crescimento (MATEO; PETERS; STEIN, 2004).

Os nucleotídeos participam da divisão celular, do crescimento da célula e da modulação do sistema imunológico. Adicionado a isso, os nucleotídeos dietéticos podem ajudar na manutenção da saúde intestinal, reduzindo a incidência de doenças entéricas. Ainda segundo Mateo, Peters e Stein (2004), os nucleotídeos quando fornecidos na dieta dos animais aumentam a atividade das enzimas digestivas presentes no intestino.

Diante dessa realidade, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico e alguns parâmetros de imunidade de frangos de corte suplementados até os 14 dias de idade com levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Hoje em dia, é possível notar a grande eficiência na produção de frangos de corte em todo o país e, cada vez mais tem-se conseguido explorar o máximo potencial produtivo das aves, proporcionado pelo desenvolvimento genético e nutricional das linhagens atuais. Entretanto, qualquer alteração no processo produtivo pode resultar em perdas zootécnicas e econômicas significativas para o produtor, que deve estar atento durante todas as fases de criação, até que as aves sejam levadas para o abate. Contudo, especial atenção deve ser dispensada na fase inicial, tendo em vista que as duas primeiras semanas de vida da ave são fundamentais para o bom desenvolvimento do lote, assegurando bons resultados zootécnicos e econômicos da criação.

Um dos fatores que contribui para esses bons resultados e consequente aumento da produtividade é, sem dúvida, a utilização de promotores de crescimento na dieta. Esses promotores podem incluir os antibióticos e os quimioterápicos (MENTEN; LODDI, 2003).

O uso dos antibióticos na ração impede que os microrganismos patogênicos invadam e se multipliquem no intestino animal, permitindo assim que os nutrientes da dieta sejam aproveitados para o tecido de crescimento do músculo ao invés do sistema imune (MURAROLLI, 2008). No entanto, as dosagens sub-terapêuticas dos antibióticos vem sendo condenada, pois seu uso contínuo pode levar ao desenvolvimento e disseminação de populações bacterianas resistentes, e essa resistência pode ser transferida aos microrganismos patogênicos, representando um risco, tanto para a saúde humana quanto animal (DAWSON; PIRVULESCU, 1999; MENTEN; LODDI, 2003).

Com a forte pressão da sociedade contra o uso e várias campanhas para banir os antibióticos utilizados na alimentação animal como promotores de crescimento e, diante da necessidade da manutenção e até mesmo do aumento dos níveis produtivos, é necessária a busca constante por alternativas seguras para uso na alimentação animal. Neste sentido, novos conceitos passíveis de substituição dos antibióticos começaram a ser formados (MURAROLLI, 2008). Entre eles está se destacando o uso de nucleotídeos nas primeiras semanas de vida das aves, conforme observado por Barbalho (2009) e Hoffmann (2007).

Os nucleotídeos dietéticos podem estimular o crescimento de bifidobactérias (UAUY, 1994) e promover o crescimento e maturação intestinal (UAUY, 1989), além de estarem relacionados com a melhora no sistema imunológico (WESTWOOD, 1999).

Além disso, os nucleotídeos participam de vários processos bioquímicos essenciais (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995) e, nutricionalmente não são considerados essenciais, pois são sintetizados via *de novo* pelo organismo utilizando aminoácidos como precursores ou por via de salvamento, a partir da degradação de aminoácidos e nucleotídeos dietéticos (LERNER; SHAMIR, 2000). Os nucleotídeos são comumente considerados essenciais nas fases de estresse e desenvolvimento dos animais, uma vez que nestas condições os animais necessitam de rápida resposta celular.

2.1 NUTRIÇÃO INICIAL DAS AVES

Cada vez mais os frangos têm maior capacidade de ganho de peso e de conversão alimentar, sendo que seu peso corporal aumenta mais de 50 vezes em 40 dias (RUTZ, 2007). O manejo ambiental e uma nutrição adequada nas primeiras semanas de vida (que representa 20% da criação) são cruciais para o bom desempenho dos frangos no período final de crescimento, adicionado ao fato de que neste período as aves ainda não apresentam um sistema enzimático completamente desenvolvido. Além disso, é interessante destacar que nesta fase o sistema imunológico ainda se encontra prematuro e é dependente da imunidade transferida pela matriz. É justamente nas primeiras semanas de vida que a ave atravessa, fisiologicamente, um dos momentos mais difíceis, passando de uma dieta com nutrientes altamente disponíveis (rica em proteínas e lipídeos presentes no saco vitelíneo) a uma alimentação exógena à base de lipídeos, proteínas e carboidratos complexos de difícil digestão (RUTZ, 2007).

O saco vitelíneo representa aproximadamente 10% do peso vivo do pintinho ao eclodir, sendo seu conteúdo composto de nutrientes, principalmente água, gordura e proteína. É também um reservatório de imunoglobulinas A e G representando proteção ao pintinho na forma de imunidade passiva. As reservas contidas no saco vitelíneo, normalmente são inteiramente consumidas até o sétimo dia de vida, ainda que a partir do terceiro dia não representem mais do que uma ínfima contribuição ao total de nutrientes necessários para o desenvolvimento adequado das aves (VIEIRA, 2000).

A utilização do conteúdo do saco vitelíneo ocorre, principalmente, pela absorção direta através da membrana do próprio saco vitelíneo (MURAKAMI; AKIBA; HORIGUCHI, 1992). Entretanto, parte desse conteúdo pode passar ao intestino sendo digerido através das

secreções digestivas do próprio intestino (SULAIMAN et al., 1996). Aparentemente, esta passagem para o conteúdo intestinal pode acelerar o desenvolvimento das funções digestivas e absorptivas intestinais (NOY; SKLAN, 1997). A disponibilização imediata de alimento após a eclosão acelera a utilização do conteúdo do saco vitelino (NOY; SKLAN, 1996).

De acordo com Dibner et al. (1998), a alimentação precoce também afeta positivamente o peso da bursa, a proliferação de linfócitos e o desenvolvimento precoce da capacidade de resposta à administração de vacinas. Adicionalmente, os autores citam que se há a disponibilidade de alimento e água para as aves logo após a eclosão, as reservas do saco vitelino podem ser destinadas para fins não nutricionais, o que envolveria sua ação na imunidade passiva das aves através do fornecimento de anticorpos maternos, além de estar envolvido com o desenvolvimento do sistema nervoso central, da retina, de membranas celulares e da síntese de imunomoduladores.

Privar o pintinho da alimentação precoce reduz o peso da bursa e o desenvolvimento do sistema imunológico. Isso acontece, pois a ingestão de ração, por si só, já é considerada uma exposição a antígenos que ajudarão a maturar o sistema imunológico, evitando a depressão do sistema imune como acontece nos casos de jejum, além de ser fonte de nutriente (POLINUTRI, 2011). Dibner et al. (1998) demonstraram que pintinhos alimentados com um suplemento nutricional apresentaram alta proliferação de linfócitos na bursa três dias após a eclosão. Ao contrário, pintinhos mantidos em jejum apresentaram ausência de linfócitos, demonstrando que o conteúdo residual do saco vitelino, presente no pintinho após a eclosão, não serve como substituto à alimentação exógena.

Com a incorporação de novos conhecimentos, várias modificações têm sido propostas para a nutrição durante a primeira semana de vida da ave. Moran Jr (1985); Penz Jr e Vieira (1998) e Croom et al. (1999), ressaltaram que as razões que justificariam a adoção de uma dieta diferenciada na primeira semana de idade das aves seriam, a anatomia e fisiologia diferenciada do trato digestório, a dificuldade de digestão e absorção de alguns nutrientes, o grande potencial de desenvolvimento expressado neste período, além da dificuldade de sobrevivência em ambientes frios.

Segundo Lilburn (1998), a dieta pré-inicial deve ser utilizada nos primeiros sete ou dez dias de vida das aves, sendo considerada como um investimento e não como custo no sistema de produção. Outros autores afirmam ainda que a dieta pré-inicial poderia ser adotada por um período de 7 até 14 dias (FRANCO; CURVELLO; CAMPOS, 1983; ZÚNIGA; CAMPOS; FERREIRA, 1994; SHIROMA et al., 1996; SILVA et al., 2004). É importante ressaltar que, animais submetidos à deficiências nutricionais após o nascimento, dificilmente recuperam o

potencial total de ganho de peso daqueles em condições de nutrição adequada (WINICK; NOBLE, 1966). Tendo isso em mente, o nutricionista deve atentar-se para a utilização de ingredientes de alta digestibilidade e elevado teor proteico, a fim de serem usados conjuntamente com o milho, atendendo assim as exigências nutricionais da ave neonata.

Em trabalho conduzido por Barbalho (2009), ao suplementar frangos de corte com levedura hidrolisada em diferentes níveis (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0%) até os 14 dias de idade, foi observado melhora no desempenho das aves ao final da produção (42 dias de idade). Outro estudo, realizado por Hoffmann (2007), com frangos de corte suplementados com RNA e nucleotídeos nos primeiros 10 dias de idade, mostrou um avanço de quatro dias no desenvolvimento dos vilos intestinais comparados com aves não suplementadas. Segundo Esteve-Garcia e Martínez-Puig (2007), estes resultados positivos podem ser atribuído a necessidade do animal à suplementação com nucleotídeos dietéticos, uma vez que há restrita disponibilidade de nucleotídeos durante períodos de intenso desenvolvimento, limitando a maturação de tecidos de rápida replicação celular e baixa capacidade biossintética, como o intestino, reduzindo, desta forma, a taxa de crescimento devido a menor capacidade de digestão e absorção de nutrientes.

Em outro experimento, apresentado por Stringhini et al. (2010), verificaram que o fornecimento das rações pré-iniciais nos primeiros 14 dias de idade, pioraram o desempenho dos frangos aos 21 dias de idade, mas resultaram em incremento no rendimento de carcaça aos 49 dias de vida. Esses dados mostram a importância das rações pré-iniciais, tendo em vista ser nesse período de fornecimento de ração em que se desenvolve o tecido muscular das aves. Dessa forma, o fornecimento de nutrientes adequados gera benefícios nas fases finais de desenvolvimento, conforme já mencionado por Vieira (2000). De acordo com este autor, a ausência de ganho compensatório por animais submetidos à deficiências nutricionais imediatamente após o nascimento, está provavelmente ligada à processos de desenvolvimento e diferenciação muscular, uma vez que os animais não alteram o número de células musculares após o nascimento. Entretanto, devido à característica multinucleada das células musculares e da capacidade de fusão de núcleos de células satélite às mesmas, existe a possibilidade de que a nutrição pós-eclosão esteja ligada à maximização dessa fusão. Desta forma, estaria aberta uma janela momentânea para o aumento da capacidade de síntese proteica e, portanto, de aumento muscular. Esta possibilidade decorre do fato de que a taxa de crescimento muscular depende do número de unidade de DNA presentes nestas células. Perdas em crescimento muscular em peito de perus foram observadas pela inibição do

aumento no número de núcleos nas miofibras logo após a eclosão (MOZDZIAK; SCHULZ; CASSENS, 1997).

Com todas essas informações em mente, a prática adotada hoje em dia na maioria dos incubatórios é o contato imediato, após o rompimento da casca do ovo, dos pintinhos com a ração, pois a presença de nutrientes no lúmen é fator estimulante do crescimento dos vilos e das criptas (BARANYIOVÁ; HOLMAN, 1976; MORAN JR., 1985). Em estudo conduzido por Noy e Sklan (1999), observou-se que o fornecimento de dietas sólidas, semi-sólidas ou líquidas, imediatamente após a eclosão, proporcionaram maior ganho de peso quando comparadas a aves submetidas ao jejum de até 34 horas antes do alojamento.

Contudo, é importante ressaltar que apenas o estímulo físico do alimento não é suficiente para o crescimento das vilosidades. Tarachai e Yamauchi (2000), avaliaram o uso de caulim sobre o desenvolvimento da mucosa e verificaram que a mesma parece não responder unicamente ao estímulo físico. Os autores verificaram que na presença de nutrientes o lúmen intestinal apresenta maior desenvolvimento, traduzido pela altura de vilos, número de células em mitose e renovação celular, sugerindo que o estímulo primário para o desenvolvimento da mucosa são as características químicas dos nutrientes.

Em caso de jejum prolongado, as células epiteliais passam a apresentar grandes vacúolos autofágicos lisossomais, o que caracteriza morte celular, sugerindo que o jejum causa digestão intracelular (YAMAUCHI; KAMISOYAMA; ISSHIKI, 1996), levando provavelmente a um aumento da taxa de renovação celular e consequente redução na altura dos vilos. A restrição alimentar também causa uma regressão no desenvolvimento da mucosa, mas seus efeitos sobre as três regiões do intestino delgado podem ser diferentes. Segundo Nakage (2000), restrições precoce (durante a 2ª semana de vida) e tardia (5ª semana de vida) causam uma redução significativa no comprimento vilo-cripta no duodeno, mas não no jejuno e no íleo. Por sua vez, Noy e Sklan (1997), mostraram que alimentação à vontade da eclosão até o 21º dia de idade, promove um aumento das vilosidades intestinais em todos os segmentos, porém a altura de vilos aumenta mais rapidamente no duodeno e jejuno comparado com o íleo.

2.2 LEVEDURAS

Leveduras são microrganismos unicelulares, pertencentes à classe Ascomycetos, que se reproduzem sexuada ou assexuadamente por brotamento ou cissiparidade. Dentre as culturas de levedura existentes, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, que geralmente possui um formato elipsoidal, variando de 5 a 10 μm no diâmetro maior e 1 a 7 μm no diâmetro menor, sendo seu tamanho aumentado conforme a idade da célula. As médias de volume celular são de 29 ou 55 μm^3 para células haploides ou diploides, respectivamente (WALKER, 1998). Apresentam membrana celular definida, pouco espessa em células jovens e rígidas em células adultas e seus constituintes macromoleculares compreendem em proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos, polifosfatos, lipídeos e ácidos nucleicos.

A levedura é um subproduto obtido da fermentação alcoólica da cana-de-açúcar e das indústrias de cervejaria. São empregados no Brasil dois diferentes métodos de secagem da levedura, o método dos rolos rotativos e o *spray dried*. O primeiro consiste na centrifugação da vinhaça, que posteriormente é desidratada através dos rolos rotativos, no qual a temperatura pode atingir mais de 200°C. O método *spray dried* consiste em conduzir o creme de levedura até uma câmara quente onde este é aspergido, resultando na secagem pela entrada de ar quente. Neste método, o tempo de exposição e a temperatura atingida são menores em relação ao método anterior, o que resulta num produto final de melhor qualidade (FURUYA et al., 2000).

As leveduras hidrolisadas são obtidas através de um processo de autólise e posterior adição de enzimas exógenas (hidrólise), para maior exposição do conteúdo celular e quebra dos ácidos nucleicos em nucleosídeos e nucleotídeos livres (melhor forma de absorção) (ICC, 2010). Esse processo torna a levedura hidrolisada diferenciada, pois as leveduras íntegras apesar de terem uma alta porcentagem de ácidos nucleicos, não estão na melhor forma para absorção pelo animal. Além dos nucleotídeos e nucleosídeos, a levedura hidrolisada possui também em sua composição mananoligossacarídeos (MOS), beta glucanas, glutamina, glutamato, peptídeos e dipeptídeos (ICC, 2010).

Estima-se que para cada litro de etanol produzido, gera-se um excedente de 25 a 30g de leveduras, obtendo-se cerca de 420 mil toneladas somente pela fermentação alcoólica, que devem ser reutilizados, uma vez que, como resíduo, seu descarte provoca problemas ambientais (COSTA, 2004).

A produção de leveduras no Brasil é de cerca de 750.000 toneladas por ano, e tem crescido a uma taxa de, aproximadamente, 4,0% ao ano. O potencial de produção de levedura pela indústria de etanol, considerando a tecnologia e a produção presente, é de cerca de 500.000 toneladas por ano, ou seja, atualmente aproveita-se apenas 15% das leveduras disponíveis para processamento (SANTOS, 2009).

As leveduras inativas íntegras apresentam em sua composição química básica: de 33,0 a 46,0% de carboidratos, 38,0 a 50,0% de proteínas, 3,0% de bases nitrogenadas, 1,0% de amônia, 2,0% de lipídeos e esteróis, 6,0 a 8,0% de nitrogênio (HORII, 1997) e de 5,0 a 10,0% de minerais, sendo o potássio e o fósforo seus principais componentes, além do cálcio, magnésio, sódio e enxofre na forma de sulfitos (GAMBOA, 2008). Contem também elevado teor de nitrogênio não proteico (20,0 a 30,0% do nitrogênio total), representado basicamente por ácidos nucleicos (8,0 a 12,0% do nitrogênio total). O seu nível de lipídeos (2,0 a 7,0%) varia em função do substrato utilizado para o crescimento (BUTOLO, 1997). É rica ainda em vitaminas do complexo B, especialmente tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico e em ergosterol, o que a torna excelente fonte de vitamina D (GAMBOA, 2008). De acordo com Tibbetts (2004), a levedura hidrolisada é rica ainda em nucleotídeos, inositol (importante promotor de crescimento) e glutamato (estimulante de palatabilidade). Segundo o Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (1988), de todas as leveduras, a do gênero *Saccharomyces* é a de maior valor nutricional e comercial, devido ao seu alto teor de lisina, tornando-a um excelente suplemento às proteínas de cereais, geralmente deficientes em lisina. Os aminoácidos sulfurados, metionina, cisteína e cistina, são limitadas na levedura (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

A variação da sua composição depende de uma série de fatores, entre os quais se destacam, a natureza do subproduto utilizado, grau de aeração do meio, espécie de levedura, tratamento imposto ao meio de cultura, concentração de sais e tampões que otimizam o processo de fermentação e os processamentos usados para beneficiar os produtos, como o de secagem (BAPTISTA, 2001).

O aproveitamento da biomassa da levedura pode ser feito integralmente (ativa e inativa), ou apenas por alguns dos seus componentes como produtos derivados da parede celular e também do conteúdo celular. As células íntegras e a parede celular são utilizadas principalmente na alimentação animal, enquanto o extrato de levedura vem sendo utilizados de longa data na formulação de produtos para humanos, como complemento nutritivo e flavorizante.

Recentemente, a levedura tende a ser fortemente explorada pelo comércio, através do isolamento de seus principais componentes como as enzimas invertase e lactase, nucleotídeos, proteínas (mananoproteínas), polissacarídeos (glucana e manana), além de lipídeos (fosfolipídios e ergosterol) (GAIOTTO, 2005). Esse fracionamento também tem atraído pesquisadores com vistas ao uso específico e na formulação de produtos com propriedades funcionais diferenciadas (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000; PADUA; OLIVEIRA; SGARBIERI, 2000). Kollar, Sturdik e Sajbidor (1992), desenvolveram um método de fracionamento completo da biomassa de levedura e isolamento de vários componentes como invertase, fosfolipídios, ergosterol, glucanas, mananas e glicoproteínas. Métodos para isolamento do ácido ribonucléico de levedura e sua conversão em nucleotídeos e nucleosídeos já foram estabelecidos e são amplamente utilizados assim como os componentes da parede celular.

As leveduras íntegras são as mais antigas fontes de proteína unicelulares e vem sendo utilizadas na alimentação animal por décadas. Um estudo realizado por Medri, Medri e Caetano Filho (2005), substituindo fontes tradicionais de proteína na dieta de tilápias do Nilo, por levedura inativa íntegra, observaram que a inclusão de 28,23% apresentou resultados estatísticos sobre o ganho de peso e sobrevivência dos animais. Moreira et al. (2002), ao realizarem um experimento com suínos utilizando a levedura inativa íntegra, também como substituto proteico, observaram que a inclusão de até 21% possui efeito sobre a espessura de toucinho e na relação carne:gordura.

Conforme citado anteriormente, não somente a levedura inativa íntegra vem sendo amplamente utilizada. Sua composição de parede celular é rica em beta glucanas (50 a 60%) e mananoligossacarídeos (30 a 40%) e comumente utilizada na nutrição das aves, pois parecem ter impacto no sistema imunológico, no estímulo do desenvolvimento da mucosa e habilidade em prevenir a colonização de bactérias patogênicas, principalmente *Salmonella* spp e *E. coli*, no trato gastrointestinal (BARBALHO, 2009). De acordo com Fairchild et al. (2001), os mananoligossacarídeos agem como sítio de aderência de alta afinidade para bactérias patogênicas com fímbrias manose-específicas ou tipo 1, impedindo-as de aderirem às células intestinais, fazendo com que se movam pelo intestino sem colonizá-lo.

Outro importante componente vem sendo pesquisado para uso na alimentação animal, o extrato da levedura, fonte de nucleotídeos representados pelos ácidos nucleicos, geralmente utilizados em situações de estresse e, principalmente, em fases iniciais de desenvolvimento animal. É um ingrediente rico em inositol, que estimula a síntese da biotina, vitamina essa que

participa de uma série de reações de carboxilação e também em glutamato, que tem efeito sobre a palatabilidade, peptídeos e nucleotídeos (COSTA, 2004).

Rutz (2007), ao utilizar extrato de levedura na inclusão de 2% na dieta pré-inicial (1 a 8 dias de idade) de frangos de corte, observou resultados positivos para as aves suplementadas quando comparadas com aves controle (sem suplementação). Similar resultado foi observado por Tibbetts (2002) e Maribo (2003), ao suplementarem o mesmo produto em dietas de suínos.

Spring e Maribo (2003), avaliando a utilização do conteúdo celular de leveduras em rações de suínos na fase de crescimento, verificaram uma melhora na viabilidade e no desempenho dos animais alimentados com extrato de leveduras quando comparado com dietas sem o uso de quaisquer antibióticos. Demonstrou-se assim, a presença de componentes que agem no sistema imune e, dessa forma, podem ser uma alternativa em situações em que é necessário o fornecimento de rações sem antibióticos promotores de crescimento.

O uso de levedura como substituto ao antibiótico foi pesquisado por Grigoletti et al. (2002) ao suplementarem frangos de corte com níveis crescentes de levedura (0,00; 0,15; 0,45 e 0,60%). Os autores observaram que, para as condições do experimento, a levedura pode substituir os antibióticos sem perda no desempenho e índice de eficiência produtivo.

Em pesquisa realizada por Gaiotto (2005), ao utilizar levedura íntegra, parede celular e levedura autolisada (2,5 e 5,0%) em dietas de juvenis de pintado observou que os animais suplementados tiveram um efeito positivo sobre a composição da carcaça e consumo de ração. A autora observou ainda que os animais não suplementados apresentaram menor taxa de sobrevivência, podendo-se inferir que a levedura, independentemente da forma que for oferecida ao animal, podem melhorar o sistema imunológico para os animais testados.

2.3 USO DE NUCLEOTÍDEOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Os nucleotídeos são componentes intracelulares de baixo peso molecular que são integrados a numerosos processos metabólicos e essenciais para todas as células. É composto por uma base nitrogenada (purina ou pirimidina), uma pentose e um ou mais grupos fosfatos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995) (Figura 1). As bases pirimídicas do nucleotídeo são a citosina, timina e uracila e as bases púricas são a adenina e guanina (Figura 3). A pentose pode ser a ribose para o ácido ribonucleico (RNA) ou a 2-desoxi-ribose para o ácido

desoxirribonucleico (DNA). Quando o grupo fosfato é ausente, o composto é conhecido como nucleosídeo (Figura 2) e são formados pela combinação da pentose e uma base nitrogenada através de ligações glicosídicas (RIEGEL, 2002).

Figura 1 - Fórmula estrutural dos nucleotídeos

Figura 2 - Fórmula estrutural dos nucleosídeos

Figura 3 - Fórmula estrutural das bases nitrogenadas

Os nucleotídeos participam de vários processos bioquímicos essenciais para o funcionamento do organismo (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995), atuando como precursores dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), fonte de energia (ATP e GTP), coenzimas (FAD, NAD e CoA) e reguladores fisiológicos (AMPc, GMPc) (LERNER; SHAMIR, 2000).

São conhecidos por aumentarem a resistência imunológica (UAUY, 1989; QURESHI, 2002) e melhorarem a integridade intestinal e a flora microbiana do trato gastrointestinal, com desenvolvimento de microrganismos benéficos (MATEO et al., 2004; BOHORQUEZ et al., 2007), resultando em melhor digestão e absorção de nutrientes e em redução da excreção e da poluição ambiental (MAIA et al., 2002).

Existem algumas situações de estresse em que os nucleotídeos se tornam nutricionalmente essenciais, embora a sua ausência na dieta não leve a sintomas clássicos de deficiência clínica: doenças do trato digestório, que aumentam o *turnover* dos enterócitos na mucosa da membrana intestinal; doenças em geral, que resultam em alta taxa de reprodução de células do sistema imune; dietas formuladas exclusivamente com ingredientes de origem vegetal e animais jovens, cujo sistema digestório e imune ainda está em desenvolvimento, sendo esta situação considerada a mais crítica (BIOIBERICA, 2010). Nestas condições, apenas a síntese endógena (via *de novo*) não é suficiente para suprir as necessidades dos animais, pois as células de rápido crescimento apresentam capacidade limitada para síntese de purinas e pirimidinas, portanto é necessária a suplementação exógena para manter o *pool* de nucleotídeos (UAUY, 1994). A síntese dos nucleotídeos via *de novo*, cujo custo energético é

extremamente elevado, é realizada pelo organismo utilizando aminoácidos como precursores e a síntese via de salvamento é realizada a partir da degradação de aminoácidos e nucleotídeos da dieta.

Geralmente, alimentos ou ingredientes contendo elementos celulares são potenciais fontes dietéticas de nucleotídeos (BARNES, 1994; KOJIMA, 1974; CLIFFORD; STORY, 1976), além das leveduras e outras fontes proteicas que também contém alta concentração desse nutriente (INGLEDEW, 1999; TIBBETTS, 2002).

Os nucleotídeos da dieta são ingeridos principalmente como nucleoproteínas, derivadas do núcleo das células, que para serem absorvidos precisam ser hidrolisados enzimaticamente, pois somente os nucleosídeos, bases e pequenas quantidades de nucleotídeos são absorvidos. A digestão das nucleoproteínas é iniciada pelas proteases, liberando ácidos nucleicos que sofrem hidrólise parcial no estômago e, em seguida, são expostos à hidrólise no intestino delgado, utilizando principalmente as enzimas endonucleases, fosfodiesterases e nucleosídeos fosforilase originadas no bordo em escova (MARKIEWICS et al., 1983; MORLEY et al., 1987), no suco pancreático (WEICKMAN; ELSON; GLITZ, 1981) e na bile (HOLDSWORTH; COLEMAN, 1975). Essas enzimas irão clivar o grupo fosfato dos nucleotídeos em nucleosídeos e, posteriormente, pela ação das nucleosidases, serão liberadas as bases nitrogenadas (Figura 4).

Fonte: (UAUY; QUAN; GIL, 1994)

Figura 4 - Digestão de nucleoproteínas e absorção de nucleosídeos no trato gastrointestinal

O transporte dos nucleotídeos nos enterócitos pode ser através de difusão facilitada ou por mecanismos mediados por carreador dependente de sódio (UAUY; QUAN; GIL, 1994). Do enterócito, parte dos produtos metabólicos dietéticos, nucleosídeos e nucleotídeos, são carregados para os hepatócitos, através da veia portal hepática, para posteriormente serem metabolizados. Do fígado, os produtos metabólicos são liberados para a circulação sistêmica e penetram nos tecidos musculares. Entretanto, esses produtos não são reutilizados para a produção de nucleotídeos e nem reabsorvidos, sendo as bases púricas e pirimídicas catabolizadas à ácido úrico, β -alanina ou β -aminoisobutirato (RUDOLPH, 1994; CARVER; WALKER, 1995; THORELL; SJOBERG; HERNELL, 1996). Nos mamíferos, com exceção dos primatas, o ácido úrico é posteriormente catabolizado na via alantoína à enzima uricase. A alantoína é excretada na urina, enquanto os produtos do catabolismo das bases pirimídicas, β -alanina ou β -aminoisobutirato, são posteriormente metabolizados na amônia, dióxido de carbono e acetil coenzima A (ROSSI; XAVIER; RUTZ, 2007).

De acordo com Bronk e Hastewell (1987), a porção do intestino que possui a maior capacidade absorptiva é o duodeno. Estudos com animais indicam que 2 a 5% dos nucleotídeos dietéticos são retidos no intestino delgado, fígado e tecido muscular esquelético (SAVIANO; CLIFFORD, 1978), sendo verificado o aumento da retenção de nucleotídeos nos tecidos de animais jovens (KOBOTA, 1969), e durante crescimento (SAVIANO; CLIFFORD, 1978; GROSS; SAVIANO, 1991), o que pode ser a manifestação da exigência fisiológica.

Cosgrove (1998) e Schlimme, Martin e Meisel (2000), relataram que os nucleotídeos melhoram a absorção intestinal do ferro, afetam positivamente o metabolismo de lipoproteínas e ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa e possuem efeitos tróficos na mucosa intestinal e no fígado. Além disso, os nucleotídeos modificam o tipo e o crescimento da microflora intestinal (UAUY; QUAN; GIL, 1994), podendo favorecer o desenvolvimento da flora fecal com predominância de bifidobactérias, semelhante à observada no leite materno. As bifidobactérias possuem um potencial benéfico, pois diminuem o pH intestinal devido a sua capacidade de hidrolisar açúcar para ácido lático, suprimindo a proliferação de bactérias patogênicas e inibindo o crescimento de enterobactérias causadoras de diarreia (BRUNO, 2009).

Produtos a base de nucleotídeos tem sido utilizados com sucesso na dieta de suínos e peixes (BURRELLS; WILLIAMS; FORNO, 2001; MARIBO, 2003). Maribo (2003), conduziu um experimento com suínos, cujos animais infectados com *E. coli* e alimentados com dietas de extratos de leveduras, tiveram redução de diarreia e melhor ganho de peso e conversão alimentar comparado com animais da dieta controle. Esse mesmo efeito foi

encontrado por Spring (2001), ao avaliar a inclusão de uma fonte de nucleotídeos sobre o desempenho e saúde de suínos desmamados. Os leitões suplementados com nucleotídeos apresentaram uma tendência de maior ganho de peso, consumo de ração e eficiência alimentar, além de apresentar menor incidência de diarreia. Em contrapartida Garcia (2007), não detectou qualquer efeito significativo em ganho de peso e consumo de ração em suínos alimentados com dietas contendo nucleotídeos.

Rutz et al. (2006), ao suplementarem com extrato de levedura dieta de frangos de corte, observaram melhora na conversão alimentar e consumo de ração. Lundeen (2006), apresentou um trabalho realizado com extrato de levedura sobre o desempenho na dieta de perus. O produto teve a inclusão de 4% na dieta pré-inicial e 2% na dieta inicial; 3% em ambas as dietas e uma dieta controle. Foi observado um melhor peso corporal aos 84 dias para as aves suplementadas, comparadas com as aves controle. Estudo realizado por Pelicia et al. (2007), sem desafio sanitário, não observaram efeitos da suplementação com nucleotídeos na dieta de frangos de corte aos 7, 21 e 42 dias de idade.

Gentilini et al. (2009), ao avaliarem o uso de extrato de levedura como fonte de nucleotídeos, em diferentes níveis de inclusão, na dieta de poedeiras, concluíram que, independentemente da inclusão utilizada, 1%, 2% ou 3% não houve efeito da suplementação sobre os parâmetros de desempenho produtivo (consumo de ração, produção de ovos, conversão alimentar por dúzia de ovos e peso corporal) e nem da qualidade externa e interna dos ovos (peso dos ovos, gravidade específica, altura da clara, espessura da casca e unidade Haugh).

De acordo com Menten e Pedroso (2005), é necessário um desafio sanitário de campo para que os aditivos produzam efeitos significativos sobre o desempenho de aves e suínos.

2.4 NUCLEOTÍDEOS E IMUNIDADE DAS AVES

O desenvolvimento do sistema imunológico da ave inicia-se durante o período embrionário e continua na primeira semana após eclosão. Durante esta semana ocorre um rápido aumento na população de leucócitos, e um rápido crescimento dos órgãos linfóides, mediando à imunidade celular (BARBALHO, 2009). Existe também outro tipo de resposta imune específica, denominada imunidade humoral mediada por moléculas chamadas anticorpos, responsáveis pelo reconhecimento e eliminação dos antígenos e que podem ser

transferidas através do soro ou do plasma de um indivíduo imunizado para outro não imunizado (MORGULIS, 2002).

Na eclosão, os órgãos primário/central do sistema imune (timo e bursa de Fabricius) estão presentes e com tecido linfóide ativo e os órgãos imunológicos secundário/periférico como o baço, tonsilas cecais, divertículo de Meckel, glândula de Harder e tecido linfóide difuso do intestino e do sistema respiratório, são imaturos à eclosão (SAKAMOTO, 2009). A bursa e o timo são cruciais durante as primeiras semanas após a eclosão, mas estes órgãos sofrem uma involução fisiológica à medida que a ave se aproxima da maturidade sexual e são substituídos pelos sítios periféricos de produção de células (MALE; ROITT, 1993).

A habilidade de gerar uma resposta imune secundária (indicada pela presença de centros germinais, ou de circulação de imunoglobulinas G e A – IgG e IgA) começa a manifestar-se apenas entre a 1ª e 4ª semana após a eclosão. No momento da eclosão, a imunoglobulina predominante na bursa é a M (IgM), produzidas pelas células B presentes nas tonsilas cecais. Os linfócitos carreadores de IgM são os precursores de células produtoras de IgA e IgG, assim, o pintinho ao nascer não possui capacidade de produção de IgG e é totalmente depende dos anticorpos maternos para a proteção humoral (SOUZA; ROSTAGNO; DIONIZIO, 2005), assim como a IgA, que o pintinho não é capaz de produzir. Entretanto, o aparecimento de IgA é considerado um sinal de que o sistema humoral está plenamente desenvolvido. A presença de centros germinativos é outro sinal da imunocompetência das aves, pois nestes locais há presença significativa de linfócitos T e B e células receptoras de antígenos, importantes no desenvolvimento de uma memória do sistema imune como, por exemplo, aquela requerida nas respostas à vacinação (DIBNER et al., 1998).

Os linfócitos T não produzem anticorpos, pois são encarregados das respostas imunes celulares (linfócitos T efetores), da destruição de células infectadas (linfócitos T citotóxicos) e, de promover a produção de anticorpos pelos linfócitos B (linfócitos T auxiliares). Quando a ave alcança a maturidade, a bursa de Fabricius e o timo diminuem de tamanho e a imunocompetência da ave passa a depender do sistema imune periférico (SIMON, 2000). Linfócitos ativados requerem a suplementação de energia, proteína e nucleotídeos para satisfazer a rápida divisão celular (RUTZ; COLLET, 2006), porque a falta de nucleotídeos na dieta resulta em imunossupressão.

A estrutura e a distribuição do tecido linfóide das aves diferem acentuadamente daquelas existentes em mamíferos. Uma das principais diferenças é a ausência de linfonodos na maioria das espécies aviárias. Em vez de linfonodos, as aves apresentam coleções ou concentrações de tecido linfóide junto à maioria dos órgãos (SHARMA, 1998). Nunes (2008),

relata que o trato intestinal é o órgão de maior responsabilidade no desenvolvimento imune das aves. Órgãos linfóides como placas de Peyer, as tonsilas cecais e a bursa de Fabricius encontram-se ao longo do trato intestinal, captando antígenos do trato digestório que estimulam a ativação de macrófagos, células B precursoras de IgA e células T colaboradoras das placas de Peyer.

Segundo Simon (2000), a nutrição possui um impacto fundamental sobre os mecanismos de imunidade, pois alguns nutrientes têm influência sobre a resposta imune quando incluídos na dieta. A deficiência de certos nutrientes tem efeito direto sobre o desenvolvimento da imunidade e alguns nutrientes são requeridos pelo sistema imune em níveis de inclusão superiores aos requeridos para otimizar o crescimento e produção.

Em função destes fatores, tem surgido grande interesse na melhoria imunológica através da nutrição, com o uso dos chamados imunomoduladores dietéticos que promovem a ativação do sistema imune (QURESHI, 2002). Este mesmo autor afirma a importância de alcançar um equilíbrio entre a resposta de proteção e imunopatologias ao criar estratégias imunomoduladoras, pois tanto o excesso como a deficiência de nutrientes pode ser prejudicial ao desenvolvimento do sistema imune das aves. Uma dieta inadequada pode levar a uma super estimulação do sistema imune, causando um estado de disfunção ou a um funcionamento defectivo do sistema imune na ave adulta, caso no desenvolvimento embrionário ou nas primeiras semanas após o nascimento, a nutrição não tenha sido adequada (MORGULIS, 2002).

A literatura faz referência a vários tipos de aditivos com ação imunomoduladores (CHANDRA; KUMARI, 1994; OUWEHAND et al., 1999; COPPOLA; TURNES, 2004; GUO et al., 2004). Contudo, os nucleotídeos vêm ganhando destaque, uma vez que animais jovens possuem o sistema imune prematuro e uma capacidade limitada de síntese de nucleotídeos, seja pela via *de novo* ou pela via de salvamento (UAUY, 1989). Os nucleotídeos dietéticos têm sido associados a ambas as imunidades humoral e celular, mas o mecanismo exato ainda não foi elucidado. De acordo com Kulkarni, Rudolph e Van Buren (1994) e Carver e Walker (1995), os nucleotídeos contribuem para a circulação de nucleosídeos disponíveis para o estímulo a produção de leucócitos. Além do papel trófico na estimulação de células do sistema imune, tem sido detectada uma relação direta entre o nível de nucleotídeo e a atividade dos linfócitos CD4 e a ativação de macrófagos (BIOIBERICA, 2010). Os efeitos benéficos dos nucleotídeos também têm sido descrito na imunidade humoral, pois após a administração de vacinas anti-*Haemophilus influenzae* e anti-difteria,

dietas suplementadas com nucleotídeos têm promovido uma melhora na produção de anticorpos (PICKERING et al., 1998).

Li e Gatlin III (2003), verificaram a influência da adição de 1 ou 2% de levedura parcialmente autolisada sobre o desempenho, resposta imune e resistência em resposta a infecção com *Streptococcus iniae*. Verificaram que a resposta imunológica do animal foi alterada com tendência a um aumento dos macrófagos, resultando também em uma melhor sobrevivência (73 a 90%), quando comparado ao grupo controle (53,3%), concluindo que a inclusão da levedura traz benefícios ao crescimento e a resposta imunológica de peixes. Burrells, Williams e Forno (2001), ao suplementarem 2 g de nucleotídeos/kg de ração na dieta de salmão do atlântico, três semanas antes da vacinação e cinco semanas após a vacinação, observaram um aumento na titulação de anticorpos e diminuição na taxa de mortalidade dos peixes suplementados quando comparados à peixes que receberam a dieta controle.

Qureshi (2002), realizou um experimento com diferentes níveis de inclusão de nucleotídeos, 2,5%; 5,0% e 10,0% na dieta de frangos de corte e relatou um aumento na atividade de macrófagos das aves suplementadas.

De acordo com o relatado por Simon (2000), os macrófagos estão presentes precocemente no desenvolvimento do sistema imune das aves e sobrevivem por longos períodos, sendo ativadas durante os processos inflamatórios e multiplicadas por influência de fatores de crescimento produzidos por linfócitos. Os macrófagos participam no processo de quimiotaxia, fagocitose, lise microbiana, digestão intracelular, lise extracelular e secreção de monocinas, interferon e interleucinas. Os macrófagos estão amplamente distribuídos pelo corpo, mais especificamente no baço, fígado, pulmão, sistema nervoso central, ossos e na pele, onde apresentam características morfológicas e funcionais específicas para cada tecido (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Estas células fagocíticas, em resposta ao processo de fagocitose, apresentam antígenos específicos na sua superfície os quais são reconhecidos pelos linfócitos T, que produzem linfocinas que ativam os linfócitos B a produzirem e liberarem anticorpos específicos aos antígenos apresentados pelos macrófagos. Além de apresentarem antígenos, estas células ativadas produzem, secretam e respondem a diversos mediadores inflamatórios, citocinas, proteases e fatores de crescimento importantes no reparo de tecidos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Testes funcionais *in vitro* podem ser utilizados para mensurar a atividade fagocítica de macrófagos em aves. Os macrófagos são incubados com partículas de levedura, potente estimulador de macrófagos e neutrófilos e inibidor de reação de hipersensibilidade contra

eritrócitos, ovoalbumina ou aloantígenos (IBARGUENGOYTIA, 2000) e, mensurando-se o número de macrófagos que fagocitaram estas partículas, é obtida a porcentagem de fagocitose (FAIRBROTHER; SMITS; GRASMAN, 2004). Sabe-se que a fagocitose envolve várias etapas, entre elas: ingestão, morte e digestão do antígeno. A destruição do antígeno englobado ocorre através de mecanismos oxidativos (peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) ou não oxidativos (hidrolases ácidas, lisozimas e proteínas catiônicas), não necessitando transcorrer muito tempo após o estímulo (OLIVEIRA; OLIVEIRA; BUCHI, 2003).

O óxido nítrico (NO) tem merecido a atenção dos pesquisadores devido a sua função mediadora citotóxica de células imunes efectoras ativas (SAKAMOTO, 2009). Faz parte da primeira barreira de defesa do organismo com poder microbicida (antibactericida, antiparasítica e antiviral). Nestes casos, o NO atua em concentrações maiores, sendo tóxico aos microrganismos invasores. Existe um tênue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade às células hospedeiras e a toxicidade necessária para ação microbicida. No caso de doenças autoimunes e situações de sobrecarga exagerada do organismo, o NO encontra-se em concentrações tóxicas para as células do organismo (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Chin, Schauer e Deen (2008), observaram aumento da concentração de NO produzidos pelos macrófagos durante processos inflamatórios, como câncer do cólon, em células das criptas da mucosa intestinal de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritas as principais etapas e os procedimentos adotados na realização do experimento.

3.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em junho e julho de 2010, no aviário experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade São Paulo, Campus de Pirassununga.

No galpão, foram utilizados 48 boxes de 1,0 m de largura por 1,20 m de comprimento, cumeeira com orientação leste-oeste e pé direito de 2,5 m coberto com telhas de fibrocimento. Foi utilizado maravalha como cama nos boxes e foram equipados com comedouros tubulares e bebedouros tipo nipple.

3.2 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 576 pintos de um dia, machos da linhagem comercial Ross 308, criados até 42 dias de idade.

As aves foram pesadas no primeiro dia experimental e alojadas nos boxes de forma inteiramente casualizada, sendo: controle negativo (sem adição de antibióticos promotores de crescimento e/ou levedura hidrolisada); controle positivo (com adição de 0,05% de bacitracina de zinco) e diferentes níveis de adição de levedura hidrolisada (0,25%; 0,50%; 0,75% e 1,00%), fornecida pela empresa ICC Indl. Com. Exp. e Imp. Ltda, com a marca comercial Hilyses[®], totalizando 6 tratamentos com oito repetições de 12 aves cada, perfazendo um total de 48 unidades experimentais.

A suplementação com levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos e antibiótico promotor de crescimento, ocorreu no período de 1 a 14 dias de idade. Após este período, as aves receberam a mesma dieta.

3.3 RAÇÕES EXPERIMENTAIS

As dietas experimentais foram formuladas para atender as exigências nutricionais recomendadas pelo manual de recomendações nutricionais Ross 308 (Tabela 1). Foram utilizadas quatro dietas experimentais: inicial (1 a 14 dias), crescimento (15 a 26 dias), final (27 a 35 dias) e de retirada (36 a 42 dias).

Tabela 1 - Dietas experimentais e níveis nutricionais calculadas

Ingredientes	Inicial (%)	Crescimento (%)	Final (%)	Retirada (%)
Milho	53,232	59,270	65,288	68,883
Farelo de soja	37,237	32,163	26,454	23,437
Óleo de soja	4,147	4,648	4,493	4,146
Fosfato bicálcico	2,084	1,845	1,716	1,462
Calcário	0,905	0,838	0,834	0,786
Sal	0,424	0,429	0,435	0,437
Metionina	0,272	0,201	0,206	0,208
Lisina	0,204	0,150	0,218	0,255
Treonina	0,040	0,003	0,051	0,081
Vit./Min. ¹	0,400	0,400	0,250	0,250
Coccidiostático	0,055	0,055	0,055	0,055
Inerte	0-1,000	0,000	0,000	0,000
Levedura hidrolisada	0-1,000	0,000	0,000	0,000
Antibiótico	0-0,050	0,000	0,000	0,000
Total	100,000	100,000	100,000	100,000
Níveis Nutricionais				
EM (kcal/kg)	3.042	3.141	3.196	3.218
PB (%)	22,00	20,00	18,00	17,00
Ca (%)	1,00	0,90	0,85	0,76
Pd (%)	0,50	0,45	0,42	0,37
Metionina dig. (%)	0,46	0,41	0,38	0,37
Lisina dig. (%)	1,21	1,05	0,97	0,93
Treonina dig. (%)	0,77	0,67	0,64	0,63

¹ Suplemento vitamínico mineral: vit. A, 35250 UI; vit. D3, 8513 UI; vit. K, 6,0 mg; vit. E, 49,57 mg; vit. B1, 6,67 mg; vit. B2, 15 mg; vit. B6, 8,33 mg; vit. B12, 40 mcg; niacina, 100 mg; ácido fólico, 2,5 mg; pantotenato de cálcio, 39,13 mg; biotina, 0,033 mg; ferro, 144,80 mg; zinco, 144,50 mg; cobre, 28,53mg; manganês, 186,67 mg; iodo, 1,87 mg; selênio, 1,13 mg; antioxidante, 14 mg.

3.4 MANEJO DAS AVES

A ração e a água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os pintinhos chegaram à instalação experimental já vacinados contra a Doença de Marek, Gumboro e Coccidiose.

A cama de maravalha era reutilizada, com o objetivo de estabelecer um desafio sanitário que aproximasse das condições experimentais à campo.

O controle do aquecimento foi feito através de um sistema automático a gás que era acionado de acordo com a necessidade de temperatura das aves. O programa de luz adotado foi de 24 horas de iluminação em todas as fases de criação, sendo o galpão completamente fechado (blue house).

3.5. PARÊMETROS AVALIADOS

Nos itens abaixo serão descritas a metodologia e os parâmetros zootécnico realizados neste experimento.

3.5.1 Desempenho Zootécnico

O peso das aves e o consumo de ração foram quantificados através de pesagens aos 14 dias e 42 dias de idade, a fim de determinar as variáveis de desempenho nos intervalos de 1-14 dias e 1-42 dias. Diariamente, registrou-se o número de aves mortas para efeitos de ajuste no consumo de ração.

3.5.1.1 Ganho de Peso Médio (g)

Determinado pela diferença entre o peso médio final das aves e o peso médio inicial do respectivo intervalo.

3.5.1.2 Consumo de Ração (g)

Obtido pela diferença entre o peso da ração fornecida durante o respectivo intervalo e o peso da sobra ao final deste.

3.5.1.3 Conversão Alimentar (g/g)

Obtido pela relação entre o consumo médio de ração e o ganho de peso médio no respectivo intervalo.

3.5.2 Imunidade Humoral

Nos itens abaixo serão descritas a metodologia e os parâmetros imunológicos realizados neste experimento.

3.5.2.1 Resposta à Vacinação de Newcastle

Todas as aves do experimento foram vacinadas contra a doença de Newcastle aos 14 dias de idade pela via ocular. A vacina liofilizada era viva atenuada e continha a cepa

enterotrópica VG/GA. A dose vacinal utilizada foi de 0,03 ml/ave (30 ml de diluente/1000 doses vacinais/1000 aves), conforme as recomendações do fabricante.

Foram coletadas amostras de sangue de 16 aves experimentais de cada tratamento (duas de cada unidade experimental), identificadas individualmente. A identificação permitiu a coleta de sangue das mesmas aves aos 14 dias (antes da vacinação), 28 e 42 dias de idade, por punção da veia ulnar.

Estas amostras de sangue foram colocadas em microtubos sem anticoagulante e centrifugadas para obtenção do soro. Para titulação de anticorpos contra Newcastle, as amostras séricas foram submetidas ao ensaio imunenzimático com kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), produzido pela empresa Idexx Laboratórios.

As amostras foram diluídas em proporção 1:500 com Diluente de Amostra antes de ser efetuada a análise (os controle não foram diluídos).

Foram distribuídos 100 µl do Controle Negativo, Controle Positivo e das amostras diluídas nas cavidades apropriadas das placas para análise e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, o conteúdo líquido foi aspirado das cavidades e desprezado em reservatório apropriado. As cavidades foram lavadas quatro vezes com aproximadamente 350 µl de água destilada. Foram distribuídos 100 µl de conjugado HRPO: (cabra) anti-galinha em cada cavidade e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Novamente, o conteúdo líquido foi aspirado e cada cavidade foi lavada com água destilada. A solução de substrato TMB foi distribuída em cada cavidade e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram distribuídos 100 µl de Solução de Interrupção em cada cavidade para parar a reação. As placas foram medidas e os valores de absorbância a 650 nm foram registradas.

3.5.2.2 Resposta à Sensibilização Prévia com Eritrócitos de Carneiro

A titulação de anticorpos contra eritrócitos de carneiro (anticorpos anti-SRBC) foi outro teste de imunidade (FAIRBROTHER; SMITS; GRASMAN, 2004) proposto no trabalho.

Previamente foi coletado sangue de carneiro adulto sadio em tubos heparinizado e mantidos à temperatura de 10°C por 24 horas antes da sua utilização.

O sangue de carneiro foi centrifugado e seu sobrenadante desprezado, acrescentando-se solução salina para que fosse submetido a uma nova centrifugação e retirada de

sobrenadante. O procedimento foi repetido por três vezes. A seguir foi determinado, em câmara de Neubauer, o número de eritrócitos em 1 ml do sangue processado. A viabilidade das células foi determinada pela técnica de exclusão de Azul de Tripan, onde apenas as células não viáveis coram-se em azul.

Conhecendo-se o número de eritrócitos em 1 ml de sangue, preparou-se uma solução salina contendo 5×10^9 eritrócitos/ml.

Aos 21 dias de idade, 16 aves de cada tratamento (duas de cada unidade experimental) foram imunizadas com os eritrócitos de carneiro. Injetou-se pela veia ulnar 0,1 ml da solução descrita acima.

O sangue das aves previamente imunizadas foi coletado 7 dias após a sensibilização (aos 28 dias de idade). O soro extraído do sangue coletado foi armazenado a -20°C até plaqueamento.

Para a titulação de anticorpos, utilizaram-se placas de 96 *wells* de fundo em U, sendo colocados 30 μl de solução salina pura em cada poço. Cada ave, para sua titulação, utilizou uma linha da placa com poços numerados de 1 a 8. No primeiro poço da linha colocou-se 30 μl do soro da ave e, a partir deste primeiro poço foi realizada uma diluição seriada deste soro ao longo da linha. A todos os poços foram, então, adicionados 30 μl de uma suspensão salina de eritrócitos de carneiro previamente preparada (9×10^9 eritrócitos/ml).

A primeira linha da placa representava o controle negativo, onde foi plaqueado um *pool* de soro de 10 aves antes da sensibilização com os eritrócitos de carneiro.

As placas foram incubadas em estufa a 41°C durante 1 hora. Após a incubação, as placas foram mantidas a 10°C por 12 horas e, por fim, foram feitas as leituras das placas.

3.5.3 Atividade de Macrófagos Peritoneais

Adaptando-se a metodologia descrita por Fairbrother, Smits e Grasman (2004), foi injetado na cavidade peritoneal de 8 aves de cada tratamento (uma de cada unidade experimental), aos 34 dias de idade, 1 ml para cada 200g de peso corpóreo de solução de Sephadex (Sephadex G-50 Fine a 3,0% em solução salina 0,9%), com a finalidade de atrair os macrófagos para a cavidade peritoneal.

Quarenta e oito horas após a inoculação, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical. A seguir, inoculou-se na cavidade peritoneal 20 ml de meio RPMI – 1640 com

massageamento da região para o desprendimento das células e, posterior aspiração do lavado peritoneal, sendo este transferido para tubos plásticos mantidos em gelo.

Em laboratório foi determinado o número de células de cada amostra através da contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi determinada pela técnica de exclusão pelo Azul de Tripán, onde apenas as células não viáveis coram-se em azul.

Após a determinação do número de células viáveis de cada amostra lavado, foram retiradas alíquotas destas amostras para posterior realização dos testes de fagocitose, produção de água oxigenada e óxido nítrico.

3.5.3.1 Fagocitose

Para a determinação da taxa de fagocitose, foram retiradas alíquotas das amostras do lavado conforme citado no item 3.5.3.. Tais alíquotas foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI – 1640 para padronizar uma solução de concentração 2×10^6 células/ml. Esta solução de concentração celular conhecida, para cada amostra, foi distribuída em placas de cultivo (placas de 6 *wells* com uma lamínula quadrada de vidro dentro de cada poço).

Em cada *well* foram colocados 200 μ l da alíquota ressuspensa e as placas repousaram 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se a lavagem das placas com PBS e foram adicionados 1 ml de meio RPMI – 1640 e 7 μ l de parede células mortas de *Saccharomyces cerevisiae* (Zymosan). As placas foram incubadas em estufa de CO₂, 5% a 41°C por 1 hora. Após a incubação, as células não aderentes foram removidas através de nova lavagem com PBS. Finalmente, foi adicionado glutaraldeído 0,5% para conservação e fixação das células aderidas à lamínula.

As lamínulas foram coradas com Panótipo (corante hematológico) para a leitura em microscópio óptico, com aumento de 100 vezes em imersão.

Realizou-se contagem do número de células que fagocitaram uma ou mais partículas de Zymosan em um total de 200 células aderidas a cada lamínula. O resultado foi expresso em porcentagem de células que realizaram fagocitose.

3.5.3.2 Produção de Água Oxigenada

A liberação de água oxigenada (H_2O_2) pelos macrófagos foi quantificada pelo método da oxidação do vermelho de fenol pela água oxigenada, dependente de peroxidase (PICK; KEISARI, 1980, adaptado por PICK; MIZEL, 1981 e modificado por RUSSO; TEIXEIRA; MARCONDES, 1989).

As alíquotas das amostras de lavado citados no item 3.5.3., foram ressuspensas em 1 ml de *Phenol Red*, para padronizar uma solução de concentração 2×10^6 células/ml. Esta solução foi, então, plaqueada (placas de 96 *wells*). Cada amostra foi repetidamente plaqueada em 8 poços e, a metade dos poços de cada amostra foi adicionado *phorbol myristate acetate* (PMA). O PMA é um conhecido potencializador da produção de água oxigenada pelos macrófagos e, foi utilizado a fim de criar um controle positivo (OLIVEIRA; OLIVEIRA; BUCHI, 2003). Em suma, cada amostra foi submetida ao teste na ausência e na presença de PMA.

Após o preparo das placas, estas foram mantidas em estufa de CO_2 , 5% a $41^\circ C$ por 1 hora. Finalizada a incubação, foi adicionado 10 μl de NaOH (1M) a cada poço para cessar a reação de oxidação.

A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada através da leitura de absorbância em leitor de ELISA, utilizando filtro de 620 nm. A produção de peróxido de hidrogênio em n moles foi calculada com base em uma curva padrão, cujos valores de absorbância foram obtidos para os seguintes valores de diluição da H_2O_2 : 1:10, 1:40 e 1:60 (sem PMA) e 1:20, 1:80 e 1:320 (com PMA).

3.5.3.3 Óxido Nítrico

Para a determinação do óxido nítrico, foram retiradas alíquotas das amostras do lavado conforme citado no item 3.5.3.. Foi utilizado uma placa limpa, não estéril, de 96 *wells*, sendo na primeira coluna desta placa, pipetado 50 μl de RPMI, utilizado como branco. Nas colunas seguintes, 2 e 3, foram pipetados 10 μl da curva padrão nas diferentes concentrações (120, 60, 30 e 15 μM).

Para o preparo da curva padrão foi utilizado NaNO_2 (solução mãe à 1 mM) e RPMI incompleto e utilizados 4 micro tubos de 1,5 ml, sendo que no primeiro micro tubo foram colocados 60 μl da solução mãe (NaNO_2) e adicionados 940 μl de RPMI. Nos demais micro tubos foram colocados 500 μl de RPMI. Logo após, uma diluição seriada foi realizada, transferindo-se 500 μl do primeiro micro tubo para o segundo e assim consecutivamente, até o quarto micro tubo, sendo que ao término deste, o volume foi desprezado. Desse modo, foram obtidas concentrações de 120, 60, 30 e 15 μmol respectivamente.

Nos demais *wells*, foram transferidos 50 μl de amostras já ajustadas na concentração de 2×10^6 células/ml. Em todos os poços (branco, padrão e amostras), foram pipetados 50 μl de reagente de Griess. As placas foram, então, para a estufa de CO_2 por 1 hora. A leitura foi feita através de absorbância em leitor ELISA à 540 nm.

Os resultados obtidos após a leitura foram expressos em densidade óptica, sendo transformados em $n\text{moles}$ de nitrito liberados por $2,0 \times 10^6$ células peritoneais mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

3.5.4 Peso Relativo dos Órgãos Linfóides

Aos 42 dias de idade, 8 aves de cada tratamento (uma de cada unidade experimental) foram sacrificadas por deslocamento cervical para a coleta e pesagem dos seguintes órgãos linfóides: bursa, timo e baço. Os resultados expressos representam a relação entre o peso do órgão e o peso vivo da respectiva ave.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o procedimento ANOVA do programa SAS (2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na realização do experimento e os mesmo serão discutidos.

4.1 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

4.1.1 Desempenho Zootécnico de 1 a 14 dias de idade

Os resultados para consumo de ração (CR), ganho de peso corporal (GP) e conversão alimentar (CA) durante o período de suplementação com levedura hidrolisada fonte de nucleotídeos (do 1º ao 14º dia de idade), estão apresentados na Tabela 2.

Não foi observado efeito significativo no consumo de ração das aves durante o período ($P>0,05$), mas pode-se observar efeitos significativos para os parâmetros de ganho de peso e conversão alimentar, quando as aves foram suplementadas com levedura hidrolisada de 1 a 14 dias de idade. Observa-se ainda efeito significativo ($P<0,05$) entre as diferentes suplementações com levedura hidrolisada, sendo 0,50% e 0,75% os melhores níveis de inclusão na dieta.

Tabela 2 - Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte suplementados ou não com levedura hidrolisada, para período de 1 a 14 dias de idade

Níveis de suplementação	CR (g)	GP (g)*	CA (g/g)*
0,00%	407	307 b	1,33 b
0,25%	403	304 b	1,32 b
0,50%	407	323 a	1,26 a
0,75%	394	315 a	1,28 a
1,00%	410	305 b	1,34 b
Antibiótico	405	303 b	1,34 b
P	0,863	0,027	0,017

*médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna, dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Os resultados observados no presente experimento corroboram com Barbalho (2009), que também observou efeitos significativos de ganho de peso e conversão alimentar ao suplementar frangos de corte com levedura hidrolisada em diferentes níveis (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0%) até os 14 dias de idade. Este autor observou que a inclusão de 1,0% de levedura hidrolisada para o parâmetro ganho de peso foi 6,74% superior as aves não suplementadas. Similar estudo foi conduzido por Rutz et al. (2006), que ao suplementarem a dieta de frangos de corte com 2,0% de extrato de levedura a partir da primeira semana de vida, observaram resultado de ganho de peso superior quando comparado com aves não suplementadas, permanecendo assim durante todo o período experimental. De acordo com Carver e Walker (1995), estes resultados podem ter ocorrido em decorrência do aumento da relação vilo:cripta, propiciado por ação dos nucleotídeos, presente na levedura hidrolisada. Sabe-se que animais jovens necessitam de suplementação com nucleotídeos, uma vez que há restrita disponibilidade desse nutriente durante períodos de intenso desenvolvimento, o que limita a maturação de tecidos de rápida replicação celular e baixa capacidade biossintética, como o intestino (ESTEVE-GARCIA; MARTÍNEZ-PUIG, 2007). Essa suplementação com nucleotídeos dietéticos favorece o aumento da capacidade de digestão e absorção dos nutrientes por ampliar a área de superfície absorptiva (VANDER; SHERMAN; LUCIANO, 1990).

Wang et al. (2009), ao suplementarem a dieta de frangos de corte com extrato de levedura observaram que a inclusão de 2,0% até 14 dias de idade não apresentou efeitos significativos para conversão alimentar, mas observaram melhor resultado no peso corporal quando comparado com aves suplementadas apenas na primeira semana de vida (1 a 7 dias de idade). Corroborando com este autor, Pelicia (2008), não observou efeitos significativos nos parâmetros de desempenho (consumo de ração, conversão alimentar e ganho de peso) ao suplementar dieta de frangos de corte com níveis crescentes de nucleotídeos (0,0; 0,04; 0,05; 0,06 e 0,07%), aos 21 dias de idade. Esta autora observou que, numericamente, houve maior ganho de peso diário e melhor conversão alimentar para aves tratadas com 0,05% de nucleotídeos aos 7 dias de idade e melhor ganho de peso diário, aos 21 e 42 dias de idade, para aves tratadas com 0,07% de nucleotídeos, atribuindo esse resultados à melhora na integridade intestinal e conseqüentemente, melhora na digestão e absorção de nutrientes.

Alguns estudos (GARCIA, 2007; ANDRADE, 2009), não observaram efeitos significativos da inclusão de levedura hidrolisada na dieta de leitões. Com o aumento do nível de inclusão de levedura hidrolisada, como fonte de nucleotídeos, piorou os parâmetros de desempenho destes animais, contradizendo os dados apresentados por Rutz et al. (2006), cujos

resultados pode-se observar maior ganho de peso diário e consumo de ração para leitões suplementados com nucleotídeos.

4.1.2 Desempenho Zootécnico de 1 a 42 dias de idade

As médias para o período de 1 a 42 dias de idade dos parâmetros de consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte suplementados de 1 a 14 dias de idade, com levedura hidrolisada, estão apresentados na Tabela 3.

Para o parâmetro de consumo de ração não foi observado efeito significativo ($P>0,05$), mas pode-se observar um efeito significativo para os parâmetros de ganho de peso e conversão alimentar ($P<0,05$).

A suplementação com 0,75% de levedura hidrolisada apresentou melhor resultado para ganho de peso comparado com os demais níveis de suplementação. As aves suplementadas com 0,75% de levedura hidrolisada apresentaram resultado de ganho de peso 4,3% superior em relação as aves não tratadas.

Tabela 3 - Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte suplementados ou não com levedura hidrolisada, para o período de 1 a 42 dias de idade

Níveis de suplementação	CR (g)	GP (g)*	CA (g/g)*
0,00%	4.174	2.619 b	1,59 ab
0,25%	4.238	2.641 b	1,60 bc
0,50%	4.223	2.583 b	1,63 c
0,75%	4.288	2.731 a	1,57 a
1,00%	4.239	2.627 b	1,61 bc
Antibiótico	4.289	2.632 b	1,63 c
P	0,944	0,004	0,046

*médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna, dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

O resultado encontrado para o parâmetro conversão alimentar das aves não suplementadas, comparadas com as aves suplementadas com 0,75% de levedura hidrolisada, não diferem entre si, concordando com resultados encontrados por Wang et al. (2009), que

também não observam efeitos significativos para conversão alimentar entre aves controle e suplementadas com 2,0% de extrato de levedura.

Neste experimento, o fornecimento dos nutrientes essenciais com a suplementação de nucleotídeos pode ter sido o fator da ausência de efeito significativo no consumo de ração pelas aves. O consumo de ração em animais monogástricos está dentro de certos limites regulados pelo nível de energia da dieta, assumindo-se que a mesma contenha níveis adequados de nutrientes essenciais (ESPÍDOLA et al., 1995).

A nutrição adequada nas primeiras semanas de vida faz com que as aves se desenvolvam plenamente e mantenham esse desenvolvimento até o final da produção, pois a maturação dos enterócitos, vilosidades intestinais e da imunidade é influenciada diretamente pela qualidade da dieta nas primeiras semanas de vida (NOY; SKLAN, 1997; UNI; GANOT; SKLAN, 1998; GEYRA; UNI; SKLAN, 2001; RUTZ et al., 2007). De acordo com Winick e Noble (1966), animais submetidos a deficiências nutricionais após o nascimento dificilmente recuperam o potencial total de ganho de peso daqueles em condições de nutrição adequada, confirmando os resultados obtidos neste experimento, uma vez que as aves que receberam a suplementação obtiveram melhores resultados ao final do período experimental. Da mesma forma Barbalho (2009), observou efeitos positivos ao suplementar frangos de corte nas duas primeiras semanas de vida com levedura hidrolisada. Ao final do estudo, aos 42 dias de idade, este autor pode observar melhores resultados de ganho de peso para aves suplementadas, corroborando com resultados encontrados por Rutz et al. (2006), que observaram melhor resultado de ganho de peso para aves suplementadas nos primeiros 7 dias e nos últimos 5 dias de vida com 2,0% de extrato de levedura, fonte de nucleotídeos, quando comparado com aves não suplementadas

Contudo, Bruno (2009), não observou efeito significativo ao suplementar a dieta de frangos de corte com níveis crescentes de nucleotídeos, do mesmo modo que Santos Jr. et al. (2007), também não observaram efeitos do uso, em até 15%, de extrato de levedura como fonte de nucleotídeos sobre o peso corporal de frangos de corte. Pelicia et al. (2007), comprovaram que níveis crescentes de nucleotídeos na dieta de frangos de corte, sem desafio sanitário, não possui efeito significativo sobre o desempenho das aves. É relatado por Menten e Pedroso (2005), que um desafio sanitário é necessário para que aditivos promotores de crescimento produzam efeitos significativos sobre o desempenho de aves e suínos.

Silva (2009), ao suplementar dieta de leitões com levedura hidrolisada, não observou influência desse aditivo nos parâmetros de desempenho na fase inicial, similarmente aos dados encontrados por Miyada et al. (1997), mas pôde observar um efeito significativo na fase

final para os parâmetros de ganho de peso e conversão alimentar, além da menor incidência de diarreia.

4.2 IMUNIDADE HUMORAL

Neste sub capítulo serão apresentados os resultados obtidos para os parâmetros de imunidade humoral, na realização do experimento e os mesmos serão discutidos.

4.2.1 Resposta à Vacina de Newcastle

Os resultados referentes aos títulos médios de anticorpos vacinais contra a doença de Newcastle estão apresentados na Tabela 4.

Observa-se efeito significativo ($P < 0,05$) à resposta vacinal à doença de Newcastle nos diferentes períodos de vida da ave, sendo observadas as melhores respostas com os níveis de suplementação de 0,75 e 1,0%. Aos 28 dias de idade, pode-se observar efeitos significativos entre os diferentes níveis de inclusão de levedura hidrolisada. Aos 42 dias de idade, a resposta vacinal à doença de Newcastle, com a suplementação com 1,0% e 0,75% de levedura hidrolisada foram melhores quando comparadas aos demais tratamentos.

Tabela 4 - Títulos médios de anticorpos de frangos de corte suplementados ou não com levedura hidrolisada durante 1º ao 14º dia de idade

Níveis de suplementação	14 dias	28 dias	42 dias
0,00%	2,09 c	2,59 c	2,47 b
0,25%	2,15 c	2,64 c	2,64 b
0,50%	2,21 b	2,59 c	2,59 b
0,75%	2,31 a	2,72 b	2,72 a
1,00%	2,36 a	2,78 a	2,79 a
Antibiótico	2,12 c	2,63 c	2,55 b
P	0,019	0,028	0,008

*médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna, dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Aos 14 dias de idade, antes da vacinação, observa-se efeito significativo nos títulos de anticorpos vacinais contra a doença de Newcastle, infecção causada por um vírus do sorotipo *Paramyxovirus* aviário tipo 1 (APMV-1) (PAULILLO; DORETTO JR., 2000). Até esta data, as médias dos títulos de anticorpos avaliados são consideradas passivas (de origem materna). Pode-se observar que as aves suplementadas com 0,75% e 1,0% de levedura hidrolisada apresentaram valores significativamente ($P < 0,05$) maiores em relação ao grupo controle e tratado com antibiótico, sendo que estes não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Após o nascimento, fisiologicamente ocorre queda gradativa nos níveis de anticorpos maternos que, para a doença de Newcastle, tem meia vida de 4 a 5 dias e títulos de anticorpos maternos acima de 1:8 interferem com a primeira vacinação (PAULILLO; DORETTO JR., 2000). Com os dados obtidos neste experimento, pode-se observar que as aves suplementadas com levedura hidrolisada retardaram a queda nos níveis de anticorpos maternos.

Observa-se resultados numéricos similares para resposta vacinal aos 28 e 42 dias de idade nos tratamentos. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato dos nucleotídeos presentes na levedura hidrolisada terem estimulado os linfócitos B, células produtoras de anticorpos no organismo das aves (MORGULIS, 2002). Aos 14 dias de idade, data da vacinação, as aves ainda estavam recebendo suplementação com levedura hidrolisada e, de acordo com Uauy (1989), os linfócitos apresentam capacidade limitada para síntese de nucleotídeos, seja pela via *de novo* ou pela via de salvamento, pois estas células devem ser programadas e sofrer expansão clonal para se reproduzirem (BUTCHER; MILES, 2011). Portanto, a suplementação com levedura hidrolisada neste período pode ter contribuído para a manutenção normal do sistema imunológico, atendendo a rápida divisão mitótica que ocorre em resposta à estimulação pelo antígeno (WESTWOOD, 1999).

Hoffmann (2007), apresentou dados de experimento cujas aves foram vacinadas contra doença de Newcastle e suplementadas com nucleotídeos, uma semana antes até uma semana depois da vacinação; durante duas semanas após a vacinação e um grupo que não foi suplementado e observou que 65% das aves do grupo controle estavam protegidas contra a doença, mas para as aves suplementadas a proteção foi acima de 80%. O autor atribuiu essa resposta aos nucleotídeos, que resultam em um rápido aumento da titulação de anticorpos e persistem por longo período, mais pronunciadamente, se as aves receberem a suplementação antes da vacinação. Similarmente Rossi, Xavier e Rutz (2007), observaram um aumento de anticorpos após vacinação em tilápias híbridas tratadas com 5/kg de nucleotídeos durante 120 dias.

Os resultados apresentados neste experimento contradizem os observados por Silva (2006), que ao suplementar dieta de frangos de corte com 2,0% de extrato de levedura do 1º ao 21º dia de idade não observou efeitos significativos do extrato de levedura nos títulos de anticorpos vacinais contra a doença de Newcastle aos 28 e 42 dias de idade das aves. Contudo, Nunes (2008), observou efeitos significativos nos títulos de anticorpos aos 28 dias de idade, quando suplementou a dieta de frangos de corte com prebiótico a base de parede celular de levedura.

4.2.2 Resposta à Sensibilização Prévia com Eritrócitos de Carneiro

Os resultados de títulos médios de anticorpos anti-SRBC (eritrócitos de carneiro) encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Títulos médios de anticorpos anti-SRBC em frangos de corte, aos 28 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada no período de 1 a 14 dias de idade

Níveis de suplementação	Títulos
0,00%	5,63
0,25%	6,19
0,50%	5,94
0,75%	5,00
1,00%	6,13
Antibiótico	6,00
P	0,267

Este teste foi proposto devido a resultados contraditórios na literatura que utilizando a vacinação contra Newcastle como método de avaliação, mostram uma variação na titulação de anticorpos muito acentuada entre animais submetidos a um mesmo tratamento. Tem-se o conhecimento prévio de que matrizes e pintos nunca tiveram contato com eritrócitos de carneiro e, portanto, não poderiam ter anticorpos contra os mesmos.

Pode-se observar que não houve efeitos significativos ($P>0,05$) entre os tratamentos para titulação de anticorpos anti-SRBC. Esses resultados podem ser justificados pela ausência

de nucleotídeos dietéticos no período da coleta. A suplementação com levedura hidrolisada foi durante o período de 1 a 14 dias de idade, ocorrendo a sensibilização com eritrócitos de carneiro aos 21 dias e, a coleta sanguínea, aos 28 dias de idade. Apesar de alguns estudos indicarem que 2 a 5% dos nucleotídeos dietéticos são retidos no intestino, fígado e tecido esquelético (SAVIANO; CLIFFORD, 1978), com maior retenção nos tecidos em animais jovens (KOBOTA, 1969) e durante crescimento (SAVIANO; CLIFFORD, 1978; GROSS; SAVIANO, 1991), nas condições do presente experimento, a retenção de nucleotídeos para futuros desafios imunológicos não foi observada. Provavelmente, os nucleotídeos dietéticos tenham sido mobilizados para a replicação de células produtoras de anticorpos (contra Newcastle) e para possíveis presenças de desafios sanitários, pois a cama era reutilizada.

Em linfócitos normais ocorre uma influência muito grande de nucleotídeos para atender a rápida divisão nucleica que ocorre em resposta a estimulação de antígenos, porém esses linfócitos possuem uma capacidade limitada de síntese de nucleotídeos, sendo necessária a suplementação dietética. Este fato reforça as justificativas da falta de efeitos significativos ($P>0,05$) sobre a titulação anticorpo anti-SRBC apresentados neste experimento.

Em estudo conduzido por Kulkarni et al. (1988), também não foi observado efeitos significativos na titulação de anticorpos de diferentes grupos de animais sensibilizados com eritrócitos de carneiro ou bactéria, suplementados com nucleotídeos livres na dieta, da mesma forma que Nunes (2008), não observou efeitos da suplementação com parede celular de levedura sobre a titulação de anticorpos anti-SRBC de frangos de corte.

4.3 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Neste sub capítulo serão apresentados os resultados obtidos para os parâmetros de imunidade celular, na realização do experimento e os mesmos serão discutidos.

4.3.1 Fagocitose

A taxa de fagocitose expressa pela porcentagem de macrófagos peritoneais que fagocitaram uma ou mais partícula de Zymosan, está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios das taxas de fagocitose em frangos de corte, aos 35 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada no período de 1 a 14 dias de idade

Níveis de suplementação	Taxa de Fagocitose (%)
0,00%	43,0
0,25%	37,0
0,50%	29,0
0,75%	46,0
1,00%	44,0
Antibiótico	43,0
P	0,673

Não observa-se efeito significativo ($P > 0,05$) para taxa de fagocitose entre os tratamentos, o que pode ser justificado pela dificuldade deste protocolo experimental em obter resultados devido à distância do trato intestinal (onde agem os aditivos alternativos) aos locais onde normalmente são realizadas as avaliações do sistema imune (no presente caso, a cavidade peritoneal) (ERICKSON; HUBBARD, 2000). Em estudo realizado com carpas (*Cyprinus carpio* L), por Sakai et al. (2001), foi observado um aumento da resposta fagocítica dos peixes tratados com 15 mg de levedura digerida (RNA) durante 3 dias, corroborando com os resultados encontrados por Qureshi (2002), que mensurou o número de leucócitos e a atividade de macrófagos em frangos de corte com 42 dias de idade e observou aumento do número de leucócitos e da atividade de macrófagos quando 5% do extrato de levedura foi suplementado na dieta.

Da mesma forma, Davis et al. (2004), suplementando leitões com levedura demonstraram que macrófagos (isolados da lâmina própria do jejuno) dos animais suplementados fagocitaram maior número de eritrócitos de carneiro comparado ao controle. Contradizendo esses autores e corroborando com os dados apresentados neste experimento, Nunes (2008), avaliou frangos de corte suplementados com parede celular de levedura e não

observou efeitos significativos dessas aves comparadas com o grupo controle para o parâmetro fagocitose.

4.3.2 Produção de Água Oxigenada

Os valores médios de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) liberada pelos macrófagos ativados, com e sem a presença de PMA, de frangos de corte com 35 dias de idade, nos diferentes tratamentos, estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7 Valores médios de água oxigenada liberada por macrófagos de frangos de corte de 35 dias de idade, com ou sem PMA, suplementados ou não com levedura hidrolisada durante no período de 1 a 14 dias de idade

Níveis de suplementação	H ₂ O ₂ sem PMA (<i>n</i> moles)	H ₂ O ₂ com PMA (<i>n</i> moles)
0,00%	0,96 c	1,16 b
0,25%	0,97 c	1,09 c
0,50%	0,75 d	0,75 d
0,75%	1,38 a	1,42 a
1,00%	1,16 b	1,17 b
Antibiótico	1,18 b	1,08 c
P	0,039	0,042

*médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna, dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Para este estudo, observa-se efeitos significativos ($P < 0,05$) da levedura hidrolisada sobre a produção de água oxigenada, com e sem a presença de PMA. Diferentemente do esperado, a presença do PMA não potencializou a produção de água oxigenada, observando-se resultados similares comparado com a análise sem o PMA. Os resultados encontrados neste estudo não estão de acordo com Nunes (2008), que não observou efeitos significativos em aves suplementadas com parede celular de levedura, com ou sem a presença de PMA.

Provavelmente as aves do presente estudo tenham enfrentado algum desafio com a cama reutilizada, culminando na produção de água oxigenada pelos macrófagos, o que explica os efeitos significativos encontrados nos resultados sem a presença do PMA (potencializador da produção de água oxigenada pelos macrófagos). Como a levedura hidrolisada é uma fonte

de nucleotídeos, estes compostos podem ter atuado positivamente na atividade de macrófagos, elevando os níveis de produção de água oxigenada das aves suplementadas. Segundo Xavier, Rutz e Roll (2006), a adição de mononucleotídeos em dietas contendo baixo nível de nucleotídeos aumenta a produção de linfócito T.

O peróxido de hidrogênio (água oxigenada) é um dos metabólitos reativos do oxigênio produzidos pelos macrófagos após a ativação (OLIVEIRA; OLIVEIRA; BUCHI, 2003). Ainda de acordo com este autor, a produção de água oxigenada pelos macrófagos ocorre através de um processo conhecido como “explosão respiratória”, que consiste basicamente em um aumento no consumo de oxigênio molecular pela célula fagocítica. A quantidade produzida pode variar de acordo com o estágio de ativação celular.

4.3.3 Óxido Nítrico

Os valores médios de óxido nítrico, em n moles de nitrito liberados por células peritoneais, em frangos de corte com 35 dias de idade, suplementadas ou não com levedura hidrolisada, fonte de nucleotídeos, encontram-se na Tabela 8.

Observa-se efeitos significativos ($P < 0,05$) entre os diferentes tratamentos, sendo a suplementação com 0,75% de levedura hidrolisada a melhor média de óxido nítrico comparado com os demais tratamentos. Pode-se observar também que houve efeitos significativos entre as diferentes suplementações com levedura hidrolisada e, a suplementação com 0,25% de levedura hidrolisada não diferiu significativamente do tratamento com antibiótico.

Tabela 8 - Valores médios de óxido nítrico, em *n* moles de nitrito liberados por células peritoneais de frangos de corte com 35 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada durante o período de 1 a 14 dias de idade

Níveis de suplementação	NO (<i>n</i> moles)
0,00%	0,94 d
0,25%	1,11 c
0,50%	0,93 d
0,75%	1,78 a
1,00%	1,49 b
Antibiótico	1,24 c
P	0,046

*médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna, dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

A levedura hidrolisada, além dos nucleotídeos, possui em sua composição o glutamato, que é o mediador da liberação de óxido nítrico (nitric oxide – NO) por receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) estimulados (GARTHWAITE et al., 1989). De certa forma, a produção de NO pelas células, como os macrófagos das aves do presente estudo, foi uma medida de defesa do organismo contra algum antígeno invasor, talvez propiciado pela cama reutilizada neste experimento. Corroborando com a afirmação, Chin, Schauer e Deen (2008), observaram um aumento da concentração de NO produzidos pelos macrófagos durante processos inflamatórios, como câncer do cólon, em células das criptas da mucosa intestinal de ratos.

O NO faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida, atuando em concentrações maiores que o mensageiro, sendo tóxico aos microrganismos invasores. 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.

Contradizendo as premissas acima citadas, Sakamoto (2009), não observou efeitos significativos dos nucleotídeos e/ou glutamato sobre a dosagem de óxido nítrico de frangos de corte aos 7, 21 e 41 dias de idade, vacinados ou não contra coccidiose. Contudo, aos 14 dias a autora observou maior concentração de dosagem de NO nas aves controle e as suplementadas com glutamina.

4.4 PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES

Os resultados das médias dos pesos relativo dos órgãos linfóides (bursa, timo e baço), em porcentagem do peso vivo de frangos de corte aos 42 dias de idade, suplementados com levedura hidrolisada fonte de nucleotídeos, no período de 1 a 14 dias de idade, encontram-se na Tabela 9.

Apenas para o peso relativo da bursa não foi observado efeito significativo entre os diferentes tratamentos ($P>0,05$). Para o órgão linfóide timo, observa-se que as suplementações com 0,25; 0,50 e 0,75% não diferiram entre si e a suplementação com 1,0% e com antibiótico tiveram efeitos similares. A suplementação com 0,75% de levedura hidrolisada obteve melhor resultado de peso relativo para o baço, sendo que os demais tratamentos não diferiram entre si, apenas o controle que observa-se pior resultado.

Tabela 9 - Pesos médios relativos dos órgãos linfóides: bursa, timo e baço de frangos de corte, aos 42 dias de idade, suplementados ou não com levedura hidrolisada em diferentes níveis

Níveis de suplementação	Bursa	Timo	Baço
0,00%	0,202	0,399 c	0,087 c
0,25%	0,208	0,536 a	0,102 b
0,50%	0,199	0,499 ab	0,095 bc
0,75%	0,200	0,556 a	0,112 a
1,00%	0,221	0,458 b	0,103 b
Antibiótico	0,192	0,440 b	0,103 b
P	0,903	0,021	0,027

*médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna, dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Durante a primeira semana de desenvolvimento do embrião, os linfócitos multiplicam-se e diferenciam-se dentro do timo e da bursa e tornam-se seletivos para gerar respostas imunes aos diferentes tipos de antígenos, aos quais as aves são expostas durante sua vida (TAMEHIRO, 2006). Talvez, para este estudo, as aves tenham enfrentado, quando jovens, antígenos que estimularam maior produção de células T, produzidas pelo timo, uma vez que o reconhecimento dos antígenos pelas células B e T é diferente, fazendo com que o peso deste órgão tenha se diferenciado entre os tratamentos, aos 42 dias de idade. Similarmente, o peso relativo do baço pode ter aumentado, pois este órgão, anatômica e histologicamente, é

dividido em polpa vermelha e polpa branca, sendo que a polpa branca é composta de tecido linfoide periarterial (TLPA), cuja predominância é de células T (MONTASSIER, 2000).

Os efeitos significativos encontrados neste estudo, para peso relativo do timo e baço, podem ser associados ao possível estímulo à imunidade das aves quando alimentadas com uma fonte de nucleotídeos. De forma similar, Carver (1994), estudando a adição de nucleotídeos em dietas de ratos recém-desmamados, observou, nas células do baço, maior ativação dos macrófagos e maior produção de interleucina-2, proteína que induz a maturação de linfócitos B e T, que auxiliam no sistema imune do animal.

Em estudo realizado por Andrade (2009), com levedura hidrolisada para dieta de leitões observou-se um aumento linear do peso relativo do baço em função dos níveis de levedura adicionados à dieta, dados que diferem daqueles obtidos por Garcia (2007), cujo peso relativo do baço não foi afetado pela inclusão de nucleotídeos na dieta de leitões. Sakamoto (2009), também não observou efeitos significativos no peso relativo do baço quando suplementou a dieta de frangos de corte com nucleotídeos, glutamina e ácido glutâmico, assim como não observou efeitos significativos nos pesos relativos do timo e bursa de Fabricius, corroborando em parte, com o presente estudo.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste experimento, foi possível constatar que a inclusão de levedura hidrolisada, como fonte de nucleotídeos, na ração de frangos de corte, durante o período de 1 a 14 dias de idade, promove efeitos significativos ($P < 0,05$) no desempenho das aves aos 14 e 42 dias de idade, proporcionando maior ganho de peso e melhor conversão alimentar, principalmente com o nível 0,75% de suplementação.

A suplementação com levedura hidrolisada nas primeiras duas semanas de vida da ave influencia nas respostas imunológicas, tais como resposta a vacinação contra doença de Newcastle, produção de água oxigenada, produção de óxido nítrico e no peso relativo dos órgãos linfóides, mantendo a ave com sistema imune fortalecido caso entrem em contato com algum antígeno.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 283 p.
- ANDRADE, C. **Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados**. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- BAPTISTA, A. S. ***Saccharomyces cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução da aflatoxicose**. 2001. 96 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- BARANYIOVA, E.; HOLMAN, J. Morphological changes in the intestinal wall in fed and fasted chickens in the first week after hatching. **Acta Veterinaria Brno**, Palackého, v. 45, p. 151-158, 1976.
- BARBALHO, R. L. C. **Suplementação de levedura hidrolisada (Hilyses®) nas dietas de frangos de corte**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.
- BARNESS, L. Dietary source of nucleotides – from breast milk to weaning. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 1, p. 128-130, 1994.
- BIOIBERICA. **Well-balanced free nucleotide supplements in the diet of animals**. 2010 Disponível em: <<http://www.bioiberica.com>>. Acesso em: 2 jun. 2010.
- BOHORQUEZ, D. V.; SANTOS JR., A. A.; NANNEY, E. L.; FERKET, P. R. Nutritional assessment of yeast extract NuPro® in male turkey poults. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 23., 2007, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2007. p. 20.
- BRONK, J. R.; HASTEWELL, J. G. The transport of pyrimidines into tissue rings cut from rat small intestine. **Journal of Physiology**, Paris, v. 382, n. 1, p. 475-488, 1987.
- BRUNO, J. B. C. **Efeito dos diferentes níveis de nucleotídeos em frangos de corte alimentados com probióticos**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.
- BURRELS, C.; WILLIAMS, P. D.; FORNO, P. F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 199, p. 159-169, 2001.
- BUTCHER, G. D.; MILES, R. D. The avian immune system. 2011 Disponível em: <<http://www.edis.ifas.edu>> Acesso em: 8 março 2011.

BUTOLO, J. E. Uso da levedura desidratada na alimentação de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1997. p. 51-83.

CARVER, J. D. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 144-148, 1994.

CARVER, J. D.; WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **Nutritional Biochemistry**, Amsterdam, v. 6, p. 58-72, 1995.

CHANDRA, R. K.; KUMARI, S. Nutrition and immunity: an overview. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 1433S-1435S, 1994.

CHIN, M. P.; SCHAUER, D. B.; DEEN, W. M. Prediction of nitric oxide concentrations in colonic crypts during inflammation. **Nitric Oxide**, Amsterdam, v. 19, p. 266-275, 2008.

CLIFFORD, A.J.; STORY, D.L. Levels of purines on foods and their metabolic effects in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 106, n. 3, p.435-442, 1976.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004.

COSGROVE, M. Perinatal and infant nutrition. Nucleotides. **Nutrition**, New York, v. 14, n. 10, p. 748-751, 1998.

COSTA, L. F. Leveduras na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, p. 01-06, jul/ago. 2004. Disponível em: <<http://www.nutritime.com.br>> Acesso em: 04 jan. 2010.

CROOM, W. J.; BRAKE, J.; COLES, B. A.; HAVENSTEIN, G. B.; CHRISTENSEN, V. L.; McBRIDE, B. W.; PEEBLES, E. D.; TAYLOR, I. L. Is intestinal absorption capacity rate-limiting for performance in poultry?. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 8, p. 242-252, 1999.

DAVIS, M. E.; MAXWELL, C. V.; ERF, G. F.; BROWN, D. C.; WISTUBA, T. J. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 1882-1891, 2004.

DAWSON, K. A.; PIRVULESCU, M. Mananoligossacarídeos derivados de leveduras como moduladores da resposta imunológica e alternativas aos promotores de crescimento antimicrobianos. In: RONDA LATINO AMERICANA DA ALLTECH, 9, 1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Alltech, 1999. p. 33-41.

DIBNER, J. J.; KNIGHT, C. D.; KITCHELL, M. L.; ATWELL, C. A.; DOWNS, A. C.; IVEY, F. J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 7, p. 425-436, 1998.

ERICKSON, K. L.; HUBBARD, N. E. Probiotic immunomodulation in health and diseases. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 403-409, 2000.

ESPÍDOLA, G. B.; FUENTES, M. F. F.; GUERREIRO, M. E. F.; PINHEIRO, M. P. J. Avaliação da energia digestível em dietas para coelhos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995. p. 396-398.

ESTEVE-GARCIA, E.; MARTÍNEZ-PUIG, D. Efficacy of a nucleotide preparation in broiler chickens. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 2007, Strasbourg. **Proceedings...** Strasbourg: World's Poultry Science Association, 2007.

FAIRBROTHER, A.; SMITS, J.; GRASMAN, K. A. Avian immunotoxicology. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part R**, Cambridge, v. 7, p. 105-137, 2004.

FAIRCHILD, A. S.; GRIMES, J. L.; JONES, F. T.; WINELAND, M. J.; EDENS, F. W.; SEFTON, A. E. Effects of hen age, Bio-Mos®, and flavomycin on poult susceptibility to oral *Escherichia coli* challenge. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 562-571, 2001.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade, metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FRANCO, S. G.; CURVELLO, F. A.; CAMPOS, E. J. Programas alimentares para frangos de corte: I – Efeitos sobre o desempenho. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 3, p. 405-415, 1983.

FURUYA, W. M.; SERON, S.; VARGAS, L.; HAYASHI, C.; FURUYA, V. R. B.; SOARES, C. M. Níveis de levedura desidratada “spray dried” na dieta de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 699-704, 2000.

GAIOTTO, J. R. **Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*).** 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

GAMBOA, B. S. P. **Digestibilidade dos macronutrientes e disponibilidade dos minerais, pela tilápia do Nilo, das leveduras íntegras e autolisada.** 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

GARCIA, A. **Nucleotídeos como potenciais promotores de crescimento de leitões recém-desmamados.** 2007. 40 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

GARTHWAITEA, J.; GARTHWAITEA, G.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 413-416, 1989.

GENTILINI, F. P.; GONÇALVES, F. M.; SILVA, R. A. G.; NUNES, P. M.; ANCIUTI, M. A.; RUTZ, F. Desempenho produtivo e qualidade de ovos de poedeiras semipesadas com

adição de extrato de leveduras na dieta. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 4, p. 1110-1114, out/dez., 2009.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosa development in the post-hatch chick. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 776-782, 2001.

GRIGOLETTI, C.; FRANCO, S. G.; FLEMMING, J. S.; FEDALTO, L. M.; BACILA, M. *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 151-157, 2002.

GROSS, C. J.; SAVIANO, D. A. The effect of nutritional state and allopurinol on nucleotide formation in enterocytes from guinea pig small intestine. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1073, n. 1, p. 260-267, 1991.

GUO, F. C.; WILLIAMS, B. A.; KWAKKEL, R. P.; LI, H. S.; LI, X. P.; LUO, J. Y.; LI, W. K.; VERSTEGEN, M. W. A. Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on the cecal microbial ecosystem in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 175-182, 2004.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. In: _____. **Free radical biology & medicine**, Amsterdam: Elsevier, 1999. p. 544-616.

HOFFMANN, K. The use of nucleotides in animal feed. Part 2., 2007. Disponível em: <<http://www.allaboutfeed.net>> Acesso em: 3 mar. 2009.

HOLDSWORTH, G.; COLEMAN, R. Enzyme profiles of mammalian bile. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 389, p. 47-50, 1975.

HORII, J. Tecnologia da produção de levedura desidratada visando a qualidade do produto final. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas:CBNA, 1997. p. 7-25.

ICC. INDUSTRIAL COMÉRCIO EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO. HILYSES. **Material promocional**. São Paulo: ICC 2010.

IBARGUENGOYTIA, J. A. C. La influencia de la levadura en la dieta, respuesta microbiologica antagonista. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 77-86.

INGLEDEW, W. M. Yeast – could you base a business on this bug?. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 9., 1999, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Nottingham University Press, 1999. v. 1. p. 27-47.

INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR. **Manual de los derivados de la caña de azúcar**. México: GEPLACEA/PNUD, 1988. 252 p.

KOBOTA, A. Nutritional study of nucleotides components in the milk. **Acta Pediatric Japanese**, Tokyo, v. 73, n. 2, p. 197-209, 1969.

- KOJIMA, K. Safety evaluation of disodium 5'-inosinate, disodium 5'-guanylate and disodium 5'-ribonucleate. **Toxicology**, Limerick, v. 2, p. 185-206, 1974.
- KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.
- KULKARNI, A. D.; FANSLOW, W. C.; RUDOLPH, F. B.; VAN BUREN, C. T. Modulation of delayed hypersensitivity in mice by dietary nucleotide restriction. **Transplantation**, New York, v. 44, p. 847-849, 1988.
- KULKARNI, A. D.; RUDOLPH, F. B.; VAN BUREN, C. T. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: a review. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 1442-1446, 1994.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Nucleotídeos e ácidos nucleicos. In: _____. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. cap. 12. p. 242-268.
- LERNER, A.; SHAMIR, R. Nucleotides in infant nutrition: a must or an option. **Israel Medical Association Journal**, Haifa, v. 2, n. 10, p. 772-774, 2000.
- LI, P.; GATLIN III, D. M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid Striped bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, p. 681-692, 2003.
- LILBURN, M. S. Pratica aspects of early nutrition for poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 7, p. 420-424, 1998.
- LUDEEN, T. Yeast extract aids growth. **Feedstuffs**, Minnetonka, n. 3, p. 11, jul. 2006.
- MAIA, G. A. R.; FONSECA, J. B.; SOARES, R. T. R. N.; SILVA, M. A.; SOUZA, C. L. M. Qualidade dos ovos de poedeiras comerciais alimentadas com levedura seca de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1295-1300, 2002.
- MALE, D.; ROITT, I. Introdução ao sistema imune. In: ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. (Ed.). **Imunologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1993.
- MARKIEWICZ, A.; KAMINSKI, M.; CHOCILOWSKI, W.; GOMOLUCH, T.; BOLDYS, H.; SKRZYPEK, B. Circadian rhythms of four marker enzymes activity of the jejunal villi in man. **Acta Histochemical**, Amsterdam, v. 72, p. 91-99, 1983.
- MARIBO, H. Weaning pig without antibiotic growth promoters: strategies to improve health and performance. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 19., 2003, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Nottingham University Press, 2003. v. 1. p. 179-184.
- MATEO, C. D.; PETERS, D. N.; STEIN, H. H. Nucleotides in sow colostrum and milk at different stages of lactation. **Journal of Animal Science**, Champaign v. 82, p. 1339-1342, 2004.

MATEO, C. D.; PETERS, D. N.; DAVE, R. I.; STEIN, H. H. Effects of dietary nucleosides on intestinal microbial activity and performance of newly weaned pigs. In: **NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES**, 20., 2004, Lexington. **Abstracts...** Lexington, KY, USA, 2004, p. 55. Posters presented. Supplement. 1.

MEDRI, V.; MEDRI W.; CAETANO FILHO, M. Desempenho de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus* L.) alimentadas com diferentes níveis de proteínas de levedura de destilaria em tanques-rede. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 221-227, 2005.

MENTEN, J. F. M.; LODDI, M. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: **SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS**, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003. p. 107-138.

MENTEN, J. F.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. In: **CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA**, 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2005. v. 1. p. 41-52.

MIYADA, V. C.; LAVORENTI, A.; PACKER, I. U.; MENTEN, J. F. M. A levedura seca como fonte de proteína para leitões em recria (10 aos 28 kg PV). **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 316-326, 1997.

MONTASSIER, H. J. Enfermidades do Sistema Imune. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 133-150.

MORAN JR., E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through prenatal development. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, p. 665-674, 1985.

MOREIRA, I.; MARCOS JR., M.; FURLAN, A. C.; PATRÍCIO, V. M. I.; OLIVEIRA, G. C. Uso da levedura seca por “spray-dry” como fonte de proteína para suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 962-969, 2002. Suplemento.

MORLEY, D. J.; HAWLEY, T. M. ULBRIGHT, L.G.; BUTLER, J. S. C.; HODES, M. E. Distribution of phosphodiesterase I in normal human tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 35, p. 75-82, jan., 1987. Disponível em: <http://jhc.sagepub.com>> Acesso em: 9 ago. 2009.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 231-245.

MOZDZIAK, P. E.; SCHULZ, E.; CASSENS, R. G. Myonuclear accretion is a major determinant access to feed and water on the poult at 2 weeks of age. **Poultry Science**, Champaign, v. 272, p. C565-C571, 1997.

MURAKAMI, H.; AKIBA, Y.; HORIGUCHI, M. Growth and utilization of nutrients in newly-hatched chick with or without removal of residual yolk. **Growth, Development and Aging**, New Jersey, v. 56, p. 75-84, 1992.

MURAROLLI, V. D. A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte.** 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

NAKAGE, E. S. **Histologia e morfometria do trato digestório de frangos de corte submetidos à restrição alimentar quantitativa precoce e tardia.** Trabalho de Iniciação Científica. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2000. p. 58.

NOY, Y.; SKLAN, D. Routes of yolk utilization in the newly hatched chick. **British Poultry Science**, Champaign, v. 37, n. 5, p. 987-995, 1996.

NOY, Y., SKLAN, D. Posthatch development of poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 6, p. 344-354, 1997.

NOY, Y.; SKLAN, D. Energy utilization in newly hatched chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, p. 1750-1756, 1999.

NUNES, A. D. **Influência do uso de aditivos alternativos a antimicrobianos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte.** 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; BUCHI, D. F. Effects of Canova on mouse peritoneal macrophages oxidative metabolism. In: CONGRESS OF BRAZILIAN SOCIETY OF MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 19, 2003, Caxambu. **Proceedings...** Caxambu: [s.n.], 2003. p. 34-35.

OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, p. 43-52, 1999.

PADUA, E. A.; OLIVEIRA, A. C.; SGARBIERI, V. C. Importância da parede celular de levedura (*Saccharomyces* sp) como fonte de fibra na alimentação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre, v. 20, n. 2, p. 233-239, 2000.

PAULILLO, A. C.; DORETTO JR., L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JR., A.; MACARIA, M. **Doença das aves.** Campinas: FACTA, 2000. p. 267-281.

PELICIA, V. C.; SARTORI, J. R.; ZAVARIZE, K. E.; MITUO, M. A. O.; PEZZATO, A. C.; MARTINS, B. A. B. Níveis de nucleotídeos na ração de frangos de corte como alternativa ao uso de antibióticos promotores de crescimento. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2007, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2007.

PELICIA, V. C. **Nucleotídeos na dieta de frangos de corte criados no sistema alternativo.** 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

PENZ JR., M.; VIEIRA, S. L. Nutrição na primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE PINTOS DE CORTE NA PRIMEIRA SEMANA, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998. p. 121-139.

PICK, E.; KLEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 39, p. 161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay for measurement of superoxide and hydrogen peroxide produced by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 46, p. 211-226, 1981.

PICKERING, L. K.; GRANOFF, D. M.; ERICKSON, J. R.; MASOR, M. L.; CORDLE, C. T.; SCHALLER, J. P.; WINSHIP, T. R.; PAULE, C. L.; HILTY, M. D. Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 101, p. 242-249, 1998.

POLINUTRI. **Dieta pós-eclosão e pré-inicial na nutrição de frangos de corte**. 2011. Disponível em: <<http://www.polinutri.com.br>> Acesso em: 20 jan. 2011.

QURESHI, M. A. Differential expression of inducible nitric oxide synthase is associated with differential Toll-like receptor – 4 expression in chickens macrophages from different genetic backgrounds. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 191-207, 2002.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 454 p.

RIEGEL, R. E. Mecanismo da síntese das proteínas. In: _____. **Bioquímica**. São Leopoldo: Unisinos, 2002. cap. 10. p. 321-350.

ROSS 308. **Nutritional Specification**. 2007. Disponível em: <<http://www.aviagen.com>> Acesso em: 15 maio 2010.

ROSSI, P.; XAVIER, E. G.; RUTZ, F. Nucleotídeos na nutrição animal. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 05-12, jan/mar, 2007.

RUDOLPH, F. B. The biochemistry and physiology of nucleotides. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 1, p. 124S-127S, 1994.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 22, p. 1271-1273, 1989.

RUTZ, F. Pintinhos desafiados na fase inicial: Os nucleotídeos são a resposta?, 2007. Disponível em: <<http://www.aveworld.com.br>> Acesso em: 19 ago. 2010.

RUTZ, F.; COLLET, S. R. Alternativas para o desenvolvimento e função intestinal, visando a digestão e a absorção na ausência de aditivos químicos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE

CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2006. p. 139-160.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; RECH, J. L.; GONÇALVES, F. M.; DELGADO, A. D.; ROSA, E. R.; ZAUKE, N.; RIBEIRO, C. L. G.; SILVA, R. R.; DALLMANN, P. R. Desempenho e características de carcaças de frangos de corte recebendo extrato de leveduras na dieta. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 349-355, out/dez., 2006.

RUTZ, F.; XAVIER, E. G.; ANCIUTI, M. A.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. In: ANNUAL SYMPOSIUM, 23., 2007, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 2007. p. 175-181.

SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; OGAWA, H.; TABATA, M. Immunostimulant effects of nucleotides isolated from yeast RNA on carp *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, Hoboken, v. 24, n. 8, p. 433-438, 2001.

SAKAMOTO, M. I. **Desempenho, desenvolvimento e atividade enzimática da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com glutamina e nucleotídeos**. 2009. 95 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

SAS Institute, 2002. **SAS®User's Guide: Statistics**, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SANTOS, G. D. Perspectivas brasileiras e mundial da produção de leveduras. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2009. p. 1-4.

SANTOS JR., A. A.; BOHORQUEZ, D. V.; NANNEY, R. L.; FERKET, P. R. Nutrient digestibility value of yeast extract Nupro®. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN FEED AND FOOD INDUSTRIES, 23., 2007, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Nottingham University Press, 2007. p. 19.

SAVIANO, D. A.; CLIFFORD, A. J. Absorption, tissue incorporation and excretion of free purine bases in the rat. **Nutrition Reports International**, Italy, v. 17, p. 551-556, 1978.

SCHLIMME, I. R.; MARTIN, D.; MEISEL, H. Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p. 59-68, 2000. Supplement, 1.

SHARMA, J. M. Avian Immunology. In: PASTORE, P.P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOOVAERTS, A. (Ed.). **Avian immunology**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 673-679.

SHIROMA, N. N.; ZANETTI, M. A.; FARIA, D. E.; ALBUQUERQUE, R.; ANZAI, N. H. Efeito de programas alimentares sobre o desempenho de frangos de corte durante o inverno. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1996. p. 51.

SILVA, C. C. **Avaliação do uso de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativas e hidrolisadas nas dietas iniciais de leitões**. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)

– Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA, J. R. L.; RABELLO, C. B. V.; DUTRA JR., W. M.; LUDKE, M. C. M. M.; BARROSO, J. F.; FREITAS, C. R. G.; CAMPELO FILHO, E. V. B.; AQUINO, L. M. Efeito da forma física e do programa alimentar na fase pré-inicial sobre o desempenho e características de carcaça de frangos de corte. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, p. 543-551, 2004.

SILVA, V. K. **Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas**. 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SIMON, V. A. Imunodepressão: conceito e implicações na criação de frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 65-76.

SOUZA, A. V. C.; ROSTAGNO, H. S.; DIONIZIO, M. A. Fundamentos técnicos para utilização de dietas pré-iniciais para frangos de corte. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: AveWorld, 2005. p. 207-228.

SPRING, P. **Effect of Nupro® on commercial pig performance in Switzerland**. Zurich: [s.n.], 2001.

SPRING, P.; MARIBO, H. Yeast extract as a protein source for weanling piglets. In: SYMPOSIUM ON VITAMINS AND ADDITIVES IN NUTRITION OF MAN AND ANIMALS, 9., 2003, Jena. **Proceedings...** Jena: [s.n.], 2003.

STRINGHINI, J. H.; FORTES, B. D. A.; SANTOS, J. S.; FERREIRA, L. L.; GONZALES, E.; CAFÉ, M. B. Nutrição inicial e desenvolvimento intestinal em frangos de corte. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 4., 2010. São Pedro. **Anais...** São Pedro: CBNA, 2010.

SULAIMAN, A.; PEEBLES, E. D.; PANSKY, T.; KELLOGG, T. F.; MASLIN, W. R.; KEIRS, R. W. Histological evidence for a role of the yolk stalk in gut absorption of yolk in the post-hatch broiler chick. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, p. S48, 1996. Abstracts.

TAMEHIRO, C. Y. **Efeito da vitamina E na resposta imune humoral e celular de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*)**. 2006. 72 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

TARACHAI, P.; YAMAUCHI, K. Effects of luminal nutrient absorption, intraluminal physical stimulation, and intravenous parenteral alimentation on the recovery responses of duodenal villus morphology following feed withdrawal in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 1578-1585, 2000.

THORELL, L.; SJOBERG, L. B.; HERNELL, O. Nucleotides in human milk: sources and metabolism by newborn infant. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 40, n. 6, p. 845-852, 1996.

TIBBETTS, G. W. Nucleotides from yeast extract: potential to replace animal protein sources in food animal diets. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 18., 2002, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Nottingham University Press, 2002. v. 1. p. 435-443.

TIBBETTS, G. W. Nucleotídeos presentes no extrato de levedura de cepa específica: alternativa para substituição de fontes protéicas de origem animal. **Pork World**, p. 36-39, 2004. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br>> Acesso em: 2 set. 2010.

UAUY, R. Dietary nucleotides and requirements in early life. In: LEBETHAL, E. **Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy**. New York: Raven Press Ltda, 1989. p. 265-280.

UAUY, R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 157S-159S, 1994. Supplement, 1.

UAUY, R.; QUAN, R.; GIL, A. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 8, p. 1436-1441, 1994.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 75-82, 1998.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Human physiology**. 5th ed. New York: McGraw Hill Publishing, 1990.

VIEIRA, S. L. Nutrição neonatal de aves: aspectos práticos, respostas metabólicas e desenvolvimento do sistema imune. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 51-64.

VILELA, E. S.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000.

XAVIER, E.G.; RUTZ, F.; ROLL, V. F. B. Imunonutrientes na produção de suínos. In: SIMPÓSIO UFRGS SOBRE PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 1., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: [s.n.], 2006. p. 174-195.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. 325 p.

WANG, Z.; CERRATE, S.; COTO, C.; SACAKLI, P.; YAN, F.; COSTA, F. G. P.; WALDROUP, P. W. Evaluation of Nupro® yeast product in diets for broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 8, n. 6, p. 515-520, 2009.

WEICKMAN, J. L.; ELSON, M.; GLITZ, D. G. Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. **Biochemistry**, Washington, v. 20, p. 1272-1278, 1981.

WESTWOOD, O. M. R. **The scientific basis for health care**. London: Times Mirror International Publishers, 1999. 616 p.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 89, p. 300-306, 1966.

YAMAUCHI, K.; KAMISOYAMA, H.; ISSHIKI, Y. Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in white leghorn hens. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 37, p. 909-921, 1996.

ZÚNIGA, I. O.; CAMPOS, E. J.; FERRERIA, J. M. Efeito de programas de alimentação sobre o desempenho de frangos de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 46, p. 675-683, 1994.