

**Resposta anti-inflamatória de frangos de corte desafiados com LPS de *Escherichia coli***

**Anti-inflammatory response of poultry challenged with LPS of *Escherichia coli***

**Respuesta antiinflamatoria de pollos de corte difíciles com *Escherichia coli* LPS**

Recebido: 22/08/2020 | Revisado: 02/09/2020 | Aceito: 03/09/2020 | Publicado: 05/09/2020

**Samuel Oliveira Borges**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7695-7760>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [samuelborges1001@gmail.com](mailto:samuelborges1001@gmail.com)

**Rayanne Andrade Nunes**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8809-5996>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [rayane.andrade9@gmail.com](mailto:rayane.andrade9@gmail.com)

**Beatriz Garcia do Vale**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6235-0274>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [beatriz.vale@ufv.br](mailto:beatriz.vale@ufv.br)

**Bruno Figueiredo de Almeida**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1894-0562>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [brunofa.zoo@gmail.com](mailto:brunofa.zoo@gmail.com)

**Thiago Ferreira Diana**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2386-8307>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [thiagofnet@hotmail.com](mailto:thiagofnet@hotmail.com)

**Romário Duarte Bernardes**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7013-0650>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [duarteromario040@gmail.com](mailto:duarteromario040@gmail.com)

**Arele Arlindo Calderano**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2282-3580>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [calderano@ufv.br](mailto:calderano@ufv.br)

## Resumo

Para avaliar a resposta anti-inflamatória de frangos de corte foram calculados peso final (PF), perda de peso (PP), temperatura retal (TR) e expressão de interleucina-10 (IL-10) após a aplicação de LPS. Foram utilizados 12 frangos de corte machos com 19 dias de idade. Aos 17 dias, as aves foram pesadas e distribuídas em 12 gaiolas de metal com 1 animal por unidade experimental. Foi realizada a aplicação intraperitoneal do LPS na dose de 1 ml/kg de peso vivo das aves aos 19 dias de idade no tempo zero. Para cada tratamento, ou seja, cada tempo após a aplicação do LPS, foi mensurada a temperatura das aves. Após, essa ave foi pesada para determinação de Peso Final e Perda de Peso. Finalmente, a ave foi abatida e realizada a coleta de seu baço para análise de expressão de RNAm de IL-10. A análise dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho conclui que a aplicação de LPS de *Escherichia coli* interfere diretamente na perda de peso dos animais ( $Y = - 0,09617 - 1,54780 x + 0,19107 x^2$ ) até em 3,2307% após 4,05 horas da aplicação, e que interfere diretamente a Expressão Gênica da citocina anti-inflamatória Interleucina-10 ( $Y = 1,33367 + 3,23013 x - 0,31733 x^2$ ), tendo seu pico de expressão após 5,0895 horas da aplicação com a concentração de 9,53361 U.A..

**Palavras-chave:** LPS de *Escherichia coli*; Interleucina-10; IL-10.

## Abstract

To evaluate the anti-inflammatory response of poultry, body weight (BW), body weight loss (BWL), cloacal temperature (CT) and expression of interleukin-10 (IL-10) after LPS application were calculated. A total of 19-day-old male broilers were used. At 17 days, the broilers were weighed and distributed in 12 metal cages with 1 animal per experimental unit. Intraperitoneal application of LPS was realized through 1 ml/kg of body weight at 19 days of age at time zero. For each treatment, that is, each time after the application of the LPS, the temperature of the poultry was measured. Afterwards, this chicken was weighed to determine body weight and body weight loss. Finally, the broiler was euthanized by cervical dislocation and collected their spleens for analysis of IL-10 mRNA expression. The analysis of the results obtained during the performance of this work concludes that the application of LPS of *Escherichia coli* directly interferes in the body weight loss of the animals ( $Y = - 0.09617 - 1.54780 x + 0.19107 x^2$ ) in 3.2307 % after 4.05 hours of application, and which directly interferes with the Gene Expression of the Interleukin-10 ( $Y = 1.33367 + 3.23013 x - 0.31733 x^2$ ), having its peak of expression after 5,0895 hours of application with a concentration of 9,53364 A.U..

**Keywords:** *Escherichia coli* LPS; Interleukin-10; IL-10.

## Resumen

Para evaluar la respuesta antiinflamatoria de los pollos de engorde, se calcularon el peso final (PF), la pérdida de peso (PP), la temperatura rectal (TR) y la expresión de interleucina-10 (IL-10) después de la aplicación de LPS. Se utilizaron doce pollos de engorde de 19 días. A los 17 días, las aves fueron pesadas y distribuidas en 12 jaulas metálicas con 1 animal por unidad experimental. La aplicación intraperitoneal de LPS se realizó a una dosis de 1 ml / kg de peso vivo de aves a los 19 días de edad en el momento cero. Para cada tratamiento, es decir, cada vez después de aplicar el LPS, se midió la temperatura de las aves. Posteriormente, se pesó esta ave para determinar el peso final y la pérdida de peso. Finalmente, se sacrificó el ave y se recogió su bazo para el análisis de la expresión de ARNm de IL-10. El análisis de los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo concluye que la aplicación de LPS de *Escherichia coli* interfiere directamente en la pérdida de peso de los animales ( $Y = -0.09617 - 1.54780x + 0.19107x^2$ ) hasta 3.2307 % después de 4.05 horas de aplicación, y que interfiere directamente con la expresión génica de la citocina antiinflamatoria Interleucina-10 ( $Y = 1.33367 + 3.23013x - 0.31733x^2$ ), que tiene su pico de expresión después de 5,0895 horas de aplicación con una concentración de 9,53361 A.U..

**Palabras clave:** *Escherichia coli* LPS; Interleucina-10; IL-10.

## 1. Introdução

Os antibióticos têm sido utilizados a décadas na produção de frangos de corte. Além do uso terapêutico, com o objetivo de recuperar a saúde das aves, são utilizados também de forma profilática, visando a melhoria da taxa de crescimento e conversão alimentar (antibióticos promotores de crescimento - APC). Entretanto, as restrições ao uso dos APC na avicultura tem crescido. Como exemplo, a Instrução Normativa Nº 1, de 13 de janeiro de 2020 do MAPA proibiu em todo território nacional, a importação, fabricação, comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina.

Entretanto, visto que os APC possuem papel importante no controle funcional da inflamação entérica (Niewold, 2007), o desempenho produtivo dos frangos submetidos as dietas sem APC tem sido prejudicado. A remoção completa destes produtos das dietas para aves de produção, resulta em uma queda de 3 a 7% de desempenho produtivo, com influência na saúde animal e resultando em maiores taxas de mortalidade no plantel (Silva, 2000).

Vários aditivos nutricionais com potencial para substituição aos APC na dieta de frangos de corte têm sido estudados. No entanto, para realização desses estudos é importante entender o comportamento da resposta anti-inflamatória das aves. Uma forma de causar inflamação nos animais experimentalmente, sem submetê-los a agentes potencialmente patogênicos, simulando uma condição mais próxima àquela encontrada em granjas é por meio da inoculação de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (Zhang et al., 2019; Chen et al., 2020). O LPS é uma endotoxina localizada na membrana de bactérias gram-negativas que provoca uma forte resposta em sistemas imunes de animais sadios, bem como mudanças fisiológicas significativas (Beutler & Rietschel, 2003).

Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina com potente ação anti-inflamatória (Arendt et al., 2019) e a identificação do pico de sua expressão em frangos de corte desafiados com LPS pode permitir a avaliação mais precisa de possíveis aditivos nutricionais com ação anti-inflamatória. Alguns trabalhos já tentaram caracterizar a resposta inflamatória em frangos de corte pela produção de citocinas (Linker-Israeli *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2008; Alvares *et al.*, 2018), no entanto não há definição precisa do melhor momento para coleta para avaliação da expressão de IL-10.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta anti-inflamatória de frangos de corte pela expressão IL-10 após a aplicação de LPS de *Escherichia coli*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Protocolos éticos**

O experimento foi realizado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Brasil, 2008), sendo previamente aprovado pelo Comitê de Ética de Animais de Produção (CEUAP – UFV; protocolo nº 30/2019).

### **2.2 Aves, dieta e modelo experimental**

O presente estudo foi realizado por meio de experimentação de campo de natureza quantitativa e qualitativa conforme descrito por Pereira et al. (2018). Foram utilizados 12 frangos de corte machos da linhagem Ross obtidos de um incubatório comercial. As aves foram vacinadas contra a doença da Bursa de Fabricius e Marek (Serotipo 3, Live Marek's Disease Vector, Merial Inc., Athens, GA). Os animais foram mantidos em círculos de proteção de 1 a

17 dias de idade, onde receberam uma dieta basal livre de qualquer tipo de promotor de crescimento. Aos 17 dias de idade, as aves foram pesadas e distribuídas em 12 gaiolas de metal de 0,2 m<sup>2</sup> com 1 animal por unidade experimental. Cada gaiola foi equipada com 1 bebedouro do tipo *nipple* e um comedouro do tipo calha, posicionado imediatamente em frente a gaiola. A ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. Durante esse período, a temperatura ambiental e fotoperíodo foram controlados em 22° C e 18 horas de luz.

A ração utilizada foi a base de milho e farelo de soja, formulada para atender as recomendações nutricionais mínimas preconizadas pelo NRC (1994). Não foi utilizado promotor de crescimento ou anticoccidiano nas rações (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição e valores nutricionais da dieta.

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>
Milho	53,17
Farelo de soja	38,09
Óleo de Soja	4,19
Fosfato Bicálcico	1,87
Calcário	1,07
Sal Comum	0,47
DL-Metionina	0,35
L-Lisina HCl	0,23
Premix Mineral <sup>1</sup>	0,13
Premix Vitamínico <sup>2</sup>	0,13
Cloreto de Colina	0,10
L-Treonina	0,09
L-Valina	0,05
Inerte	0,05
BHT	0,01
Total	100

1 Suplemento mineral (quantidade por kg de ração): Manganês – 88 mg; Ferro – 62,5 mg; Zinco – 81,3 mg; Cobre – 12,5 mg; Iodo – 1,25 mg.

2 Suplemento vitamínico (quantidade por kg de ração): vitamina A – 9375 UI; vitamina D3 – 2375 UI; Vitamina E – 35 UI; Vitamina B1 - 2,5 mg ; vitamina B6 – 3,5 mg; Ácido Pantotênico - 12,5 mg; Biotina - 0,088 mg; Vitamina K3 – 1,88 mg; Ácido fólico – 0,875 mg; Ácido nicotínico – 37,5 mg ; Vitamina B12 – 0,015 mg; Selênio – 0,375 mg. Fonte: Autores.

---

### Atendimento das Exigências

---

Proteína bruta, %	22,00
EM, kcal/kg	3050,00
Cálcio, %	1,00
Fósforo disponível, %	0,45
Sódio %	0,20
Lisina digestível, %	1,25
Treonina digestível, %	0,83
Met. + Cis. digestível, %	0,93
Valina digestível, %	0,96
Gli + Ser digestível, %	1,75

---

Fonte: Autores.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos (Tabela 2) e 3 repetições por tratamento.

**Tabela 2.** Tratamentos Experimentais.

---

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo</b>
T1	Antes da aplicação de LPS
T2	2,5 horas após aplicação de LPS
T3	5,0 horas após aplicação de LPS
T4	7,5 horas após aplicação de LPS

---

Fonte: Autores.

### 2.3 Processos: aplicação de LPS, coleta de dados e expressão gênica

Foi realizada a aplicação intraperitoneal de LPS na dose de 1 ml/kg de peso vivo das aves aos 19 dias de idade no tempo zero. Para cada tratamento, ou seja, cada tempo após a aplicação do LPS, foi mensurada a temperatura retal (TR) das aves por meio de um termômetro clínico veterinário (Incoterm 6200.03) com precisão de 0,1°C, através da inserção do mesmo na cloaca das aves (5 centímetros). Após, essa ave foi pesada para determinação de peso final

(PF) e perda de peso (PP). Finalmente, a ave foi abatida e realizada a coleta de seu baço para análise de expressão de RNAm de IL-10.

Na tabela a seguir, são apresentados os dados relacionados com as variáveis iniciais de peso corporal e temperatura. Esses dados foram utilizados para calcular PP (%) e analisar mudanças de temperatura (°C) após a aplicação de LPS.

**Tabela 3.** Variáveis Iniciais.

	Tratamentos			
	1	2	3	4
Peso Inicial (g)	726,00	740,00	720,33	739,67
Temperatura Inicial (°C)	40,63	41,20	41,13	41,03

Fonte: Autores.

Para a análise de expressão gênica, os baços foram armazenados em tubos criogênicos e mantidos no nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad CA, 279 USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 80 mg de tecido. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizada o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (SYBR<sup>®</sup> GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, EUA). A reação de amplificação continha 2 µL de cDNA diluído a 40 ng, 0,225 µL de cada primer a 10 µM (a concentração final da reação foi de 200 µM), 5 µL de SYBR<sup>®</sup> GREEN PCR Master Mix e 2,55 µL de água, com um volume final de 10 µ. A programação do termociclador para o gene foi: 95°C durante 10 minutos, em seguida 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. As curvas de melting foram realizadas para garantir a especificidade das análises. Os primers utilizados para as reações de amplificação dos genes foram IL-10 F: 5'-CATGCTGCTGGGCCTGAA-3' R:5'-CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG-3'; e para o controle endógeno β-Actin F: 5'-ATTGTCCACCGCAAATGCTTC-3' R: 5'-AAATAAAGCCATGCCAATCTCGTC-3. Todas as análises foram realizadas em um volume de 10 µL e em duplicatas. As eficiências de amplificação foram semelhantes para o gene de interesse, entre 90-110%.

## 2.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a ANOVA e análise de regressão, considerando efeito significativo quando  $P < 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

Houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre a PP das aves ( $Y = - 0,09617 - 1,54780X + 0,19107X^2$ ; (Tabela 4).

**Tabela 4.** Variáveis Finais.

	Tempo após aplicação (h)				P-valor		CV (%)
	0	2,5	5,0	7,5	L	Q	
Peso final (g)	726,00	717,33	700,33	731,67	0,2289	0,4760	11,0655
Perda de peso (%)	-	-3,0631	-2,7765	-1,0816	0,5185	0,0105	62,6715
Temperatura retal (°C)	40,63	40,67	41,70	41,83	0,2785	0,1800	0,8657

Fonte: Autores.

Ao concluir a interação indicada na tabela 4 para os elementos estudados (peso final, perda de peso e temperatura retal), pode-se afirmar que a perda de peso é maior no momento mais próximo a aplicação de LPS ( $X = 4,05$  h,  $Y = -3,23$  %) devido ao pico inflamatório acontecer nesse momento, influenciando o desvio de nutrientes (Gao et al., 2008). De Boever et al. (2008), observaram que o pico de concentração de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, ocorre 3 horas após a administração de LPS em frangos. Entretanto, não houve efeito dos tratamentos sobre o PF e a TR ( $P > 0,05$ ). A falta de efeito sobre a TR pode ser atribuída ao momento em que foi mensurada. De Boever *et al.* (2009) afirma que o aumento significativo da temperatura do animal ocorre 1 hora após a aplicação de LPS, depois desse tempo o animal vai se auto regulando fisiologicamente objetivando normalizar sua temperatura e perder o mínimo de peso.

Wu et al (2013) afirmaram que a aplicação de LPS não está relacionada com mudanças significativas de desempenho. Diferentemente deste estudo, os autores aplicaram uma dose de 0,5 mg/kg de LPS, portanto este resultado pode ser atribuído ao desafio imunológico através desta dose não ter sido suficiente para mudanças significativas do desempenho.

Houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre a expressão relativa de mRNA para IL-10 no baço ( $Y = 1,33367 + 3,23013X - 0,31733X^2$ ), (Tabela 5).

**Tabela 5.** Expressão gênica de IL-10.

	Tempo após aplicação (h)				P-valor		CV (%)
	0	2,5	5,0	7,5	Linear	Quadrático	
IL-10 (U.A.)	1,000	8,427	9,011	7,099	0,0100	0,0002	23,1062

U.A: Unidade arbitrária.

Fonte: Autores.

Através dos dados indicados na tabela 5, a expressão relativa atingiu o pico em 5,09 h após a aplicação de LPS ( $Y = 9,53$  U.A.).

Li et al (2015) e Wu et al (2016) submeteram os animais a desafio contínuo com o uso de LPS, e no último dia do desafio coletaram amostras para análise de RNAm de IL-10 duas horas após a administração do LPS e ambos concluíram que há aumento de secreção de IL-10 em desafio contínuo. Portanto, pode-se afirmar através do presente estudo e de vários outros autores, que se as aves forem submetidas a desafio contínuo ou a um único desafio, haverá aumentos significativos de RNAm de IL-10, no entanto o momento de coleta deve ser diferente do que os autores usam em suas metodologias devido ao pico de expressão ocorrer diferentemente do momento habitual usado.

Tan et al. (2014) submeteram os animais a desafio contínuo com o uso de LPS. Após 24 horas da última aplicação coletou amostras de baço para análise de RNAm de IL-10 e concluíram que não houve aumento significativo dessa citocina. Este resultado não foi o mesmo do presente estudo pois o momento de aplicação foi totalmente diferente, fazendo com que o animal ocultasse sua resposta anti-inflamatória através da secreção de IL-10. No entanto, esta resposta foi identificada no desempenho mais baixo apresentado ao final do experimento.

Chen et al. (2018) coletaram amostras imediatamente após a última aplicação de LPS e concluíram que há aumento de secreção de IL-10 neste momento. No entanto a concentração foi baixa comparado com o presente estudo. Este resultado afirma ao que foi apresentado no presente projeto em que a concentração de IL-10 terá seu pico após 5 horas de aplicação e não imediatamente após.

#### 4. Conclusão

O pico de expressão de IL-10 em frangos de corte desafiado com LPS ocorre 5,09 horas após a aplicação.

#### Agradecimento

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

#### Conflitos de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

#### Referências

Albino, L. F. T., et al. (2006). Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frango de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. Viçosa 35(3), 742-749. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000300015>.

Arendt, M., Elissa, J., Schmidt, N., Michael, E., Potter, N., Cook, M., Knoll, L., Arendt, D.M. (2019). Investigating the role of interleukin 10 on Eimeria intestinal pathogenesis in broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunop.*, 218. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109934>.

Beterchini, A.G. (2012). Nutrição de monogástricos. *Editora UFLA*. Lavras, MG. Acesso em 03 de Setembro 2020. Disponível em <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22BERTECHINI,%20A.%20G.%22>.

Beutler, B. & Rietschiel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature reviews Immunology*, 3(2), 169-176. Doi: <https://doi.org/10.1038/nri1004>.

Chen, Y., Cheng, Y., Wang, W., Wang, A, Zhou, Y. (2020). Protective effects of dietary supplementation with a silicate clay mineral (palygorskite) in lipopolysaccharide-challenged

broiler chickens at an early age. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 263, 114459. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114459>.

Chen, Y., Zhang, H., Cheng, Y., Li, Y., Wen, C., & Zhou, Y. (2018). Dietary l-threonine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and intestinal barrier damage of broiler chickens at an early age. *British Journal of Nutrition*, 119(11), 1254–1262. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114518000740>.

Cromwell, G. L. (1991). Antimicrobial agents. In: Miller, E. R. et al. *Swine nutrition*. Boston: Butterworth-Heinemann, 297-314.

Cromwell, G. L. (2012). Feed supplements: Antibiotics. In: Pond, W.G; Bell, A.W. *Encyclopedia of animal Science*.

De Boever, S., Beyaert, R., Vandemaele, F., Baert, K., Duchateau, L., Goddeeris, B., De Backer, P. & Croubels, S. (2008). The influence of age and repeated lipopolysaccharide administration on body temperature and the concentration of interleukin-6 and IgM antibodies against lipopolysaccharide in broiler chickens. *Avian Pathology*, 37(1), 39-44. Doi: <https://doi.org/10.1080/03079450701784875>.

De Boever, S., Croubels, S., Meyer, E., Sys, S., Beyaert, R., Ducatelle, R. & De Backer, P. (2009). Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in broiler chickens. *Avian Pathology*, 38(5), 403-411. Doi: <https://doi.org/10.1080/03079450903190871>.

Gao, J., Zhang, H. J., Yu, S. H., Wu, S. G., Yoon, I., Quigley, J., Qi, G. H., et al. (2008). Effects of Yeast Culture in Broiler Diets on Performance and Immunomodulatory Functions. *Poultry Science*, 87(7), 1377–1384. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00418>.

Li, Y., Zhang, H., Chen, Y. P., Yang, M. X., Zhang, L. L., Lu, Z. X., et al. (2015). *Bacillus amylo liquefaciens* supplementation alleviates immunological stress in lipopolysaccharide-challenged broilers at early age. *Poultry Science*, 94(7), 1504–1511. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps/pev124>.

Linker-Israeli, M., Elstner, E., Klinenberg, J. R., Wallace, D. J., & Koeffler, H. P. (2001). Vitamin D3 and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clinical immunology*, 99(1), 82-93. Doi: <https://doi.org/10.1006/clim.2000.4998>.

Linker-Israeli, M., Honda, M., Nand, R., Mandyan, R., Mengesha, E., Wallace, D. J., Metzger, A., Behavir, B., & Klinenberg, J. R. (1999). Exogenous IL-10 and IL-4 down-regulate IL-6 production by SLE-derived PBMC. *Clin. Immunol.*, 91(1), 6-16. Doi: <https://doi.org/10.1006/clim.1998.4680>.

Lorençon, L., Nunes, R. V., Pozza, P. C., Pozza, M. S. dos S., Appelt, M. D. & Silva, W. T. M. D. (2007). Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 29(2). Doi: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v29i2.219>.

Niewold, T. A., et al. (2007). The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult. Sci.*, 86, 605-609. Doi: <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.605>.

NRC - National Research Council, Nutrient requirements of poultry, Washington. *National Academy Press*, 9th revised ed., 1994.

Paz, A. S., Abrey, R. D., Costa, M. C. M. (2010). Aditivos promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Revista brasileira de saúde e produção animal*, 11(2), 395-402.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Acesso em: 03 de Setembro 2020. Disponível em: [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1).

Tan, J., Liu, S., Guo, Y., Applegate, T. J., & Eicher, S. D. (2013). Dietary l-arginine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in broiler

chickens. *British Journal of Nutrition*, 111(08), 1394–1404. Doi: <https://doi.org/10.1017/s0007114513003863>.

Wu, Q. J., Wang, Y. Q., & Qi, Y. X. (2016). Influence of procyanidin supplementation on the immune responses of broilers challenged with lipopolysaccharide. *Animal Science Journal*, 88(7), 983–990. Doi: <https://doi.org/10.1111/asj.12729>.

Wu, Q. J., Zhou, Y. M., Wu, Y. N., Zhang, L. L., & Wang, T. (2013). The effects of natural and modified clinoptilolite on intestinal barrier function and immune response to LPS in broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 153(1-2), 70–76. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.02.006>.

Yang, X., Guo, Y., He, X., Yuan J., Yang, Y., Wang, Z. (2008). Growth performance and immune responses in chickens after challenge with lipopolysaccharide and modulation by dietary different oils. *Animal*, 2, 216-223. Doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731107001188>.

Zhang, H.; Chen, Y., Chen, Y., Li, Y., Jia, P., Ji, S., Zhou, Y., Wang, T. (2019). Dietary pterostilbene supplementation attenuates intestinal damage and immunological stress of broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.*, 98. Doi: <https://doi.org/10.1093/jas/skz373>.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Samuel Oliveira Borges – 30%

Rayanne Andrade Nunes – 20%

Beatriz Garcia do Vale – 5%

Bruno Figueiredo de Almeida – 5%

Thiago Ferreira Diana – 15%

Romário Duarte Bernardes – 5%

Arele Arlindo Calderano – 20%