Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Efeitos da suplementação de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desempenho e a imunidade intestinal de frangos de corte

José Guilherme Morschel Barbosa

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

José Guilherme Morschel Barbosa
Médico Veterinário

Efeitos da suplementação de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desempenho e a imunidade intestinal de frangos de corte

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Morschel Barbosa, José Guilherme

Efeitos da suplementação de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desempenho e a imunidade intestinal de frangos de corte / José Guilherme Morschel Barbosa. - - Piracicaba, 2016.

77 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Imunidade intestinal. 3. Prebiótico. I. Título

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo pelo dom da vida e por guiar e iluminar-me incessantemente, dando-me ainda mais força para continuar e seguir sempre em frente nos momentos de mais dificuldade.

À minha querida família que é base forte e essencial na minha trajetória. Em especial aos meus pais Júlio Telesca Barbosa, Edymara Inez Morschel Barbosa, minha irmã Juliana Morschel Barbosa e meu cunhado Pedro Mattos de Matos.

À Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade inigualável de realizar o curso de Mestrado ao fazer parte do programa Ciência Animal e Pastagens, referência e excelência no ensino da pós graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao prof. Dr. e orientador José Fernando Machado Menten por acreditar no meu potencial e depositar confiança para a realização das pesquisas e principalmente, pelos ensinamentos e conselhos concedidos a todo momento. Com toda a certeza, é a grande inspiração de profssional e de caráter que todo aluno deve almejar para a sua vida.

Ao prof. Dr. Valdomiro Shigueru Miyada, com todo seu exemplo de luta e coragem, muito grato pelos ensinamentos e apoio.

À empresa ALERIS por acreditar neste projeto de pesquisa ao conceder o aditivo à base de levedura autolisada e pela importante contribuição financeira para a realização do experimento e das análises de laboratório.

À Sandra Vicente Augusto funcionária e secretária do nosso Programa que nunca mediu esforços pois seu incentivo, apoio e amizade fizeram nossa trajetória como alunos tornar-se mais agradável e proveitosa.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Pastagens: Diana, Gláucia, Jaqueline, Kelen, Maria, Naiara, Natália, Natália Yumi, Rafaela, Evandro, João Pedro e muitas outras amizades construídas nessa jornada.

Um agradecimento especial ao amigo Cristiano Bortoluzzi pelas orientações e dicas na pesquisa científica e pelo sinceros conselhos para a vida, e ao amigo André Felipe pelos grandes momentos de risada e companheirismo compartilhados.

Aos funcionários da Avicultura, Alexandre e Filó e demais colaboradores do Departamento de Zootecnia de Não Ruminantes (Paulo, Edenésio, Gilberto e Augusto) pela ajuda na condução das pesquisas.

Ao funcionário Antônio Carlos da fábria de rações pela paciência e apoio na fabricação das rações experimentais.

Ao funcionário Henrique pela total disponibilidade em colaborar e oferecer apoio para a realização dos trabalhos de campo.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

José Guilherme Morschel Barbosa, filho de Júlio Telesca Barbosa e Edymara Inez Morschel Barbosa, nasceu em Curitiba – PR em 13 de Dezembro de 1989.

Realizou grande parte da educação primária no Colégio Bom Jesus, e posteriormente ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – RS. Conclui seu estágio final de graduação na Universidade da Carolina do Norte junto do Prestage Department of Poultry Science (EUA), atuando em pesquisas e projetos de extensão ligados principalmente, à incubação e nutrição de frangos de corte e perus.

Formou-se Médico Veterinário e foi contratado para a vaga de Extensionista Rural na Tyson Foods do Brasil (JBS), unidade de São José - SC, onde prestou assistência técnica e veterinária a produtores de frangos de corte por um período de um ano e meio.

Em Agosto de 2014 foi aprovado no processo seletivo do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) / Universidade de São Paulo (USP) e iniciou o curso de Mestrado na área de Avicultura.

Atualmente é Gerente de Contas de Avicultura da empresa americana Agri Stats, líder e referência do segmento de *benchmarking* comparativo de indicadores de desempenho e custeio das agroindústrias mundiais de frangos de corte, suinocultura, perus e postura comercial.

SUMÁRIO

RESUMO 7
ABSTRACT 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABELAS 10
1. INTRODUÇÃO 11
2. OBJETIVOS 15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
3.1. ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO (AMDS) 17
3.2. ADITIVO ALTERNATIVO AOS AMDS – PREBIÓTICOS: LEVEDURA AUTOLISADA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 19
3.3. IMUNIDADE INTESTINAL 24
3.4. IMUNIDADE INTESTINAL INATA – CITOCINAS: COMUNICAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE 28
3.5. PROTEÇÃO DA MUCOSA INTESTINAL: MUCO PROTETOR E JUNÇÕES EPITELIAIS ESPESSAS 31
4. MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1. EXPERIMENTO DE CAMPO 33
4.2. PROCEDIMENTOS GERAIS DA COLETA EXPERIMENTAL 36
4.3. ENUMERAÇÃO BACTERIANA DO CONTEÚDO INTESTINAL ILEAL E CECAL 36
4.3.1. Enumeração de Enterococus sp. *37*
4.3.2. Enumeração de Echerichia coli *37*
4.3.3. Enumeração de Lactobacillus sp. *37*
4.3.4. Análise dos dados da enumeração bacteriana *38*
4.4. CITOMETRIA DE FLUXO 38
4.4.1. Análise dos dados de citometria de fluxo *39*
4.5. EXPRESSÃO DE GENES LIGADOS À RESPOSTA IMUNE INTESTINAL 40
4.5.1. Análise dos dados de expressão gênica *41*
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA GERAL DOS DADOS E MODELO ESTATÍSTICO 42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
5.1. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO 43
5.2. ENUMERAÇÃO BACTERIANA 47
5.3. CITOMETRIA DE FLUXO 50
5.4. EXPRESSÃO GÊNICA INTESTINAL 55
6. CONCLUSÃO 65
REFERÊNCIAS 67

RESUMO

Efeitos da suplementação de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desempenho e a imunidade intestinal de frangos de corte

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* fornecida em duas diferentes inclusões em dietas para frangos de corte como alternativa a um antimicrobiano sobre desempenho zootécnico e avaliação do sistema imune intestinal pela realização da enumeração bacteriana, citometria de fluxo e expressão intestinal de genes ligados à resposta imune intestinal. Neste estudo foram utilizados 1260 pintos de corte machos de um dia de idade da linhagem ROSS AP95® em um experimento de 1 a 35 dias de idade alojados em galpão climatizado com cama de casa de arroz nova. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente aleatorizado, com 4 tratamentos e 7 repetições, com 45 aves por boxe. Os tratamentos utilizados foram: T1: ração basal e sem aditivo – controle negativo; T2: ração basal suplementada com 55 ppm de bacitracina de zinco – controle positivo; T3: controle negativo + 2 kg/t de levedura autolisada; T4: controle negativo + 4 kg/t de levedura autolisada. As dietas foram à base de milho e farelo de soja, sendo adicionados às rações 5% de farelo de trigo e 5% de farinha de penas e vísceras (sem tratamento prévio) com objetivo de impor um desafio nutricional aos animais. Ainda visando estimular imunologicamente os animais, aos 7 dias de idade, todas as aves foram desafiadas via ocular com uma vacina viva contendo oocistos de *Eimeria sp*. na dose recomendada pelo fabricante. Aos 8 dias de idade e 21 dias de idade, uma ave de cada unidade experimental, sem jejum prévio, teve sangue coletado e foi sacrificada para coleta de conteúdo intestinal ileal e cecal para realização da emumeração bacteriana de *Enterococus sp*., *Escherichia coli* e *Lactobacillus sp*., e para a coleta do segmento ileal para avaliar a expressão gênica intestinal de Claudin-1, IL-1β, IL-4, TLR4 e MUC-2 através da PCR em tempo real. Em relação ao desempenho das aves, o tratamento T3 propiciou melhor conversão alimentar em relação a T1 até os 21 dias de idade. Para o período cumulativo, o tratamento T4 propiciou conversão alimentar semelhante ao T2, sendo esta variável melhor para estes tratamentos em relação ao controle negativo. Na enumeração de bactérias no íleo, aos 8 dias de idade, os tratamentos T3 e T4 modularam de forma distinta a contagem de *Enterococus sp*., e para o gênero *Lactobacillus sp*., ambos os grupos de levedura apresentaram menor contagem em contraste com o controle positivo. No conteúdo do ceco foi encontrado um menor número de *E. coli* para os animais grupo T3, diferentemente para o T2 que propiciou maior contagem. Aos 21 dias de idade, foi encontrado diferença na enumeração do gênero *Enterococus sp*. ileal, cuja contagem foi menor para o T2 em relação ao T1. Na na análise de citometria de fluxo, tendências foram observadas aos 8 dias de idade para o percentual de linfócitos T auxiliares (P=0,16) e para o percentual de linfócitos B (P=0,12) havendo redução com a suplementação de levedura autolisada. A mesma tendência (P=0,19) foi observada aos 21 dias de idade para a contagem de células T citóxicos. Sobre a PCR em tempo real, não foram detectadas diferenças para a expressão de Claudin-1. T2 e T4 propiciaram aumento da expressão gênica de IL-1β aos 21 dias de idade em relação ao controle negativo, sendo que T2 também promoveu aumento de TLR-4 aos 8 dias de idade. Tendências foram observadas com a maior expressão de IL-4 (P=0,06) aos 21 dias de idade pelo T2 e aumento na expressão de MUC-2 (P=0,09) pelo T4 aos 8 dias de idade. Os diferentes padrões de ativação ou não de citocinas revela uma estimulação da via Th2 pelo controle positivo (aumento de IL-1β e IL-4) e da via Th17 pelo tratamento suplementado com 4 kg/t de levedura autolisada (aumento de IL-1β).

Palavras-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*; Imunidade intestinal; Prebiótico

ABSTRACT

Effects of an autolyzed yeast from *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on broiler performance and intestinal immunity

The objective of this study was to evaluate the effects of a *Saccharomyces cerevisiae* autolyzed yeast supplementation in substitution of AGP in broiler diets on performance and immune system (on two different feed inclusions for broilers diets in replacing AGP on broiler performance and evaluation of immune system trough bacterial enumeration, flux citometry and intestinal gene expression. For that, 1260 one-day-old male Ross AP95 chicks were raised from 1 to 35 days of age in a poultry house with new rice husk as litter. The experiment was arranged in a completely randomized design with 4 treatments and 7 replications, with 45 birds per pen. The treatments were: T1: basal diet and no additive – negative control; T2: basal diet supplemented with 55 ppm of zinc bacitracin – positive control; T3: negative control + 2 kg/t of autolyzed yeast; T4: negative control + 4 kg/t of autolyzed yeast. The corn-soybean meal based diets contained 5% wheat bran and 5% poultry by-product meal (with no previous treatment) in order to impose a nutritional challenge to the animals. To impose a further immunological challenge, at 7 days of age, all the birds were eye drop-vaccinated with live vaccine containing *Eimeira sp*. oocysts at the manufacturer recommended dosis. At 8 and 21 days of age, one chick per experimental unit, with no fasting, had the blood collected and was sacrificed for sampling the ileal and cecal intestinal contents for enumeration of *Enterococus sp*., *Escherichia coli* and *Lactobacillus sp.* Also, the ileal segment was sampled for intestinal gene expression of Claudin-1, IL-1β, IL-4, TLR4 e MUC-2 by RNA extraction through real time PCR. For the performance results at 21 days of age, T3 had the same feed conversion rate of T1. For the cumulative grow-out, T4 had the same feed conversion rate as T2, being this variable better for the aforementioned tretaments in comparison to negative control. For ileal bacterial enumeration, at 8 days of age, T3 and T4 modulated distinctly the enumeration of *Enterococus sp*., and reduced the counts of *Lactobacillus sp.* in comparison to the positive control. In the cecal contents, the enumeration for *E. coli* was the lowest for T3, differing from the positive control. At 21 days of age, there was a difference in ileal *Enterococus sp*., with higher counts for T2 relative to T1. In the flux citometry, tendencies were observed at 8 days of age for T helper cells (P=0,16) and for B cells (P=0,12), which were reduced in the autolyzed yeast treatments. The same tendency (p=0.19) was seen at 21 days of age for T activated cytotoxic cells. For the real time PCR, there was no difference in the expression of Claudin-1 (P<0,05). T2 and T4 promoted upregulation of IL-1β at 21 days of age (P<0,05) in comparison to the negative control; additionally, the antibiotic tretatment also upregulated the expression of TLR-4 at 8 days of age (P<0,05). Tendencies were observed as upregulation of IL-4 (P=0,06) at 21 days of age by positive control and upregulation of MUC-2 (P=0,09) by the treatment with 4 kg/t of autolyzed yeast at 8 days of age. The different profiles in activating or not cytokines reveals a stimulation of Th2 pathway for the positive control (upregulation of IL-1β and IL-4) and Th17 pathway for the treatment supplemented with 4 kg/t of autolyzed yeast (upregulation of IL-1β).

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Intestinal immunity; Prebiotic

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FLUXOGRAMA: PRODUÇÃO DE LEVEDURA AUTOLISADA (CRÉDITOS ALERIS®) 20

FIGURA 2. PROCESSAMENTO DAS LEVEDURAS: OBTENÇÃO DA CÉLULA LISADA, EXTRATO E PAREDE CELULAR. 21

FIGURA 3. PORCENTAGEM CIRCULANTE DE LINFÓCITOS B. O EIXO VERTICAL APRESENTA PORCENTAGEM EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS MONONUCLEARES NO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC, DA SIGLA EM INGLÊS) E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 51

FIGURA 4. PORCENTAGEM CIRCULANTE DE LINFÓCITOS T AUXILIARES. O EIXO VERTICAL APRESENTA PORCENTAGEM EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS MONONUCLEARES NO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC, DA SIGLA EM INGLÊS) E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 52

FIGURA 5. PORCENTAGEM CIRCULANTE DE LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS ATIVADOS. O EIXO VERTICAL APRESENTA PORCENTAGEM EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS MONONUCLEARES NO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC, DA SIGLA EM INGLÊS) E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 54

FIGURA 6. RAZÃO DE EXPRESSÃO DE TLR4 EM REFERÊNCIA AO GRUPO CONTROLE NEGATIVO NAS DUAS COLETAS EXPERIMENTAIS. O EIXO VERTICAL REPRESENTA O INCREMENTO DA EXPRESSÃO RELATIVO À MÉDIA DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 56

FIGURA 7. RAZÃO DE EXPRESSÃO DE MUC-2 EM REFERÊNCIA AO GRUPO CONTROLE NEGATIVO NAS DUAS COLETAS EXPERIMENTAIS. O EIXO VERTICAL REPRESENTA O INCREMENTO DA EXPRESSÃO RELATIVO À MÉDIA DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 58

FIGURA 8. RAZÃO DE EXPRESSÃO DE CLAUDIN-1 EM REFERÊNCIA AO GRUPO CONTROLE NEGATIVO NAS DUAS COLETAS EXPERIMENTAIS. O EIXO VERTICAL REPRESENTA O INCREMENTO DA EXPRESSÃO RELATIVO À MÉDIA DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 59

FIGURA 9. RAZÃO DE EXPRESSÃO DE IL-1B EM REFERÊNCIA AO GRUPO CONTROLE NEGATIVO NAS DUAS COLETAS EXPERIMENTAIS. O EIXO VERTICAL REPRESENTA O INCREMENTO DA EXPRESSÃO RELATIVO À MÉDIA DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 61

FIGURA 10. RAZÃO DE EXPRESSÃO DE IL-4 EM REFERÊNCIA AO GRUPO CONTROLE NEGATIVO NAS DUAS COLETAS EXPERIMENTAIS. O EIXO VERTICAL REPRESENTA O INCREMENTO DA EXPRESSÃO RELATIVO À MÉDIA DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO E O EIXO HORIZONTAL, O MOMENTO DAS COLETAS 62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS 35

TABELA 2. ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS. ANTICORPOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO COM A REESPECTIVA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS RECONHECIDAS, E A MARCAÇÃO/CONJUGAÇÃO ESPECÍFICA DE CADA TIPO CELULAR 39

TABELA 3. PRIMERS E SEQUÊNCIA UTLIZADOS NO PCR EM TEMPO REAL ... 41

TABELA 4. DESEMPENHO SEMANAL CUMULATIVO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM ANTIMICROBIANO OU DUAS INCLUSÕES DE LEVEDURA AUTOLISADA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 44

TABELA 5. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE FRANGOS DE CORTE NA 4ª E 5ª SEMANAS, SUPLEMENTADOS COM ANTIMICROBIANO E DUAS INCLUSÕES DE LEVEDURA AUTOLISADA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 46

TABELA 6. ENUMERAÇÃO BACTERIANA (LOG_{10} UFC/G) DO CONTEÚDO DO ÍLEO E CECO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM ANTIMICROBIANO E DUAS DOSAGENS DE LEVEDURA AUTOLISADA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AOS 8 DIAS DE IDADE 48

TABELA 7. ENUMERAÇÃO BACTERIANA (LOG_{10} UFC/G) DO CONTEÚDO DO ÍLEO E CECO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM ANTIMICROBIANO E DUAS DOSAGENS DE LEVEDURA AUTOLISADA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AOS 21 DIAS DE IDADE 50

TABELA 8. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ADITIVO ANTIMICROBIANO MELHORADOR DE DESEMEPENHO E DUAS INCLUSÕES DE LEVEDURA AUTOLISADA PARA FRANGOS DE CORTE, AOS 8 DIAS DE IDADE, SOBRE O PERFIL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO SANGUE 51

TABELA 9. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ADITIVO ANTIMICROBIANO MELHORADOR DE DESEMEPENHO E DUAS INCLUSÕES DE LEVEDURA AUTOLISADA PARA FRANGOS DE CORTE, AOS 21 DIAS DE IDADE, SOBRE O PERFIL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO SANGUE 54

TABELA 10. CLASSIFICAÇÃO DAS CITOCINAS, VIA DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T AUXLIARES (T *HELPER*) E CARACTERÍSTICA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO 60

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos, a produção de frangos de corte no Brasil ocupa destaque considerável como atividade agropecuária de alta produtividade e apresenta indicadores econômicos muito satisfatórios para o setor produtivo e econômico brasileiro. Avanços como o desenvolvimento de linhagens mais precoces e produtivas, a sanidade do processo produtivo, a nutrição, a ambiência e o manejo dos animais têm contribuído significativamente para melhorar os índices zootécnicos dos planteis avícolas, e consequentemente, agregando melhores resultados para o processo como um todo.

No contexto da produção da produção e oferta mundial das proteínas de origem animal, de acordo com os dados da ONU (2015), estima-se que a população mundial atingiu aproximadamente o número de 7,3 bilhões de pessoas. Ao considerar apenas as regiões mais populosas do mundo com no mínimo 100 milhões de habitantes, projeta-se que em regiões como Sul da Ásia e África Sub-sariana, o percentual de habitantes com renda média diária inferior a 1,90 doláres, é de 13,5% e 35,2% respectivamente (WORLD BANK, 2015). Esses dados de censo populacional e de renda *per capita* demonstram a oportunidade e a importância que o setor de produção de frangos de corte representa, por meio de seu baixos custos de produção, o acesso facilitado dos consumidores à proteína animal de excelente valor biológico.

Em termos de custos, ou valores de mercado, dentre todas as proteínas animais disponíveis para consumo, a de frango é a proteína com o menor valor de aquisição quando comparado a outras fontes animais. Em Março de 2016, o custo para o consumidor americano adquirir diferentes fontes de proteína foi de 13,73 doláres para a carne bovina, 8,30 dólares para a carne suína e 4,16 dólares para a carne de frangos por kg (USDA, 2016). Ainda que os preços das *commodities* milho e farelo de soja tenham atingido valores recordes no ano de 2015 no Brasil e seus preços cotados nos EUA sendo o dobro em relação à década de 90, já se encontram estabilizados nas principais bolsas de negociação do mundo. Desta maneira, é evidente que mesmo com o aumento dos preços dos insumos e ingredientes das rações, a carne de frango, dentre as proteínas animais, é a que representa o maior potencial de competitividade de nicho mercadológico e facilidade de aquisição.

É muito importante destacar os avanços conquistados na área de sanidade avícola. Amplamente e por muito tempo utilizados, os antimicrobianos são incluídos às dietas com a função de aditivos melhoradores de desempenho. Os antimicrobianos, quando fornecidos aos animais em doses subterapêuticas, provocam importantes alterações intestinais, ligadas

principalmente à exclusão de bactérias patogênicas associadas a desordens entéricas, que podem ocasionar diminuição do desempenho produtivo e/ou morte dos animais.

Entretanto, existe a possibilidade de os micro-organismos patogênicos adquirirem resistência ao antibiótico, devido à adição contínua nas dietas. Também é possível a transferência dessa resistência à população humana, chamada resistência cruzada (LORENÇON et al., 2007). Diante disso, a União Européia baniu, a partir de janeiro de 2006, a utilização de qualquer antimicrobiano promotor de crescimento na produção animal (KIM et al., 2011), sendo permitido o uso de antibióticos apenas para fins terapêuticos. De acordo com o National Chicken Council (2014) ações serão realizadas com a finalidade de restringir ou proibir o uso de antimicrobianos com fins de melhoradores de desempenho na produção animal cujo uso também é compartilhado em seres humanos. Sendo assim, antimicrobianos de uso em seres humanos e com indicações de doses subterapêuticas em animais de produção, passarão a ser utilizados em animais, única e exclusivamente para fins terapêuticos desde que a necessidade de uso, mediante a prescrição profissional, seja realmente comprovada.

A Organização Mundial de Saúde concluiu que o uso de agentes antimicrobianos como aditivos melhoradores de desempenho na produção animal trata-se de um grave problema de saúde pública e que um plano global coordenado de ações deve ser implantado a fim de diminuir o uso destes aditivos, visto que grande parte dos princípios ativos que compõem os antimicrobianos de utilização em animais também são utilizados em seres humanos (OMS, 2014).

Diversas substâncias têm sido pesquisadas com o objetivo de substituir ou reduzir os antimicrobianos nas dietas dos frangos de corte. Nesse contexto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, produto derivado da indústria sucroalcooleira, tem sido foco de intensos estudos. Dentre os importantes compostos presentes na levedura, os componentes da parede celular, tais como os mananoligossacarídeos (MOS), destacam-se pela capacidade de modular e estimular a resposta imune intestinal, favorecendo também a proliferação de uma microbiota benéfica ao hospedeiro. Além disso, os nucleotídeos presentes no citosol da levedura também podem contribuir para a manutenção da integridade intestinal frente a um desafio imposto.

Por ser um aditivo dotado de muitos componentes celulares capazes de promover respostas multifuncionais no hospedeiro, a levedura de *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada em formulações de rações para animais, cujas composições são distintas, podendo ser o proprio organimo de levedura viva, atuando como probiótico, ou os diversos componentes celulares purificados e fornecidos de forma individual ou conjunta.

Neste trabalho, utilizou-se a levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* obtida do processo de fermentação da cana-de-açucar, sendo portanto, um aditivo composto pela célula da levedura cuja composição é formada de todas as estruturas celulares juntamente com a presença da parede celular.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da suple mentação de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* em substituição aos antimicrobianos melhoradores de desempenho em dietas para frangos de corte, sobre o desempenho produtivo e sua capacidade de modular a resposta imune intestinal.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de levedura autolisada em substituição aos antimicrobianos melhoradores de desempenho em dietas para frangos de corte, sobre o desempenho produtivo e sua capacidade de de modular a resposta imune intestinal através avaliação da microbiota intestinal, das células imunológicas e da expressão de genes relacionados à saúde intestinal

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Antimicrobianos melhoradores de desempenho (AMDs)

De acordo com o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2013), aditivo é a substância, micro-organismo, ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que não é utilizado normalmente como ingrediente nas formulações, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios, atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano. De acordo a classificação dos aditivos, esses podem ser classificados categoricamente em seis diferentes classificações que incluem produtos como palatabilizantes, antioxidantes, corantes, vitaminas, aminoácidos, coccidiostáticos e, os aditivos zootécnicos que incluem produtos digestivos (enzimas), equilibradores da flora intestinal (probióticos, prebióticos) e os melhoradores de desempenho, representados pelos antibióticos (antimicrobianos) de diversas classes, incluso alguns ionóforos.

Muito antimicrobianos já foram utilizados para promover melhoras no desempenho dos animais e grande parte foi proibida para este fim, pois seu uso, mesmo em baixas dosagens, ou tendem a selecionar bactérias resistentes, ou são tóxicos para os animais, ou podem gerar resíduos nos tecidos animais tornando o produto animal um risco para o consumo humano (CASTANON, 2007).

Postula-se que o uso de AMDs em baixas concentrações nas dietas para aves atua diminuindo a inflamação intestinal, que por consequência direciona a energia para o crescimento e produção dos animais (NIEWOLD, 2007). A ativação prolongada do sistema imune inato dos animais pode acarretar alterações no metabolismo de nutrientes e, por atuarem impedindo o gasto energético com a reparação do tecido intestinal cronicamente agredido, os AMDs, especialmente a bacitracina metileno disalicilato (BMD) podem promover a melhora do desempenho dos animais (WOLOWCZUK et al., 2008). Ao comparar o mapeamento da expressão gênica do jejuno de frangos de corte alimentados com parede celular de levedura e com antimicrobiano melhorador de desempenho, Brennan et al. (2013) verificaram que frangos suplementados com BMD apresentaram aumento da expressão de genes ligados à ativação inflamatória intestinal, bem como a genes responsáveis pelas respostas de combate aos micro-organismos, mas sem alterar o padrão de expressão gênica de interleucinas ou citocinas. Os autores sugerem que os AMDs adicionados às dietas dos

animais promovem a ativação de genes ligados à resposta inata (inespecífica) do hospedeiro, sem ativar as respostas mediadas por citocinas pró-inflamatórias.

Os estudos do mecanismo de ação dos AMDs concentram-se nas interações entre antimicrobiano e a microbiota do intestino dos animais. Entre os efeitos diretos dos AMDs, pode-se citar a diminuição na concorrência por nutrientes e redução dos metabólitos tóxicos liberados pelos micro-organismos, responsáveis pela inibição do crescimento animal (ENGBERG et al., 2000). Um dos efeitos observados na adição dos AMDs é a redução na epesura da parede intestinal (VISEK, 1978), fato observado também em animais livres de germes. Frankel (1994 citado por DIBNER; RICHARDS, 2005) sugere que a ausência ou diminuição de ácidos graxos de cadeia curta derivados da fermentação bacteriana pode levar a menor produção de muco pelas células intestinais, acarretando na diminuição da espessura da parede intestinal. De acordo com Engberg et al. (2000), os AMDs podem reduzir também a produção de ácidos graxos voláteis e ácido láticos, que são associados aos metabólitos da fermentação no microbioma intestinal, e representam um custo energético que nem sempre é aproveitado pelo animal.

Apesar dos benefícios que a microbiota pode trazer ao hospedeiro, deve-se destacar que estes micro-organismos são consumidores de nutrientes e podem ser custosos ao animal (YANG; IJI; CHOCT, 2009). Os custos associados com estes benefícios podem incluir: competição com o hospedeiro por nutrientes, estímulo ao rápido turnover das células epiteliais absortivas, secreção de componentes tóxicos e indução de resposta inflamatória no trato gastrointestinal (YEGANI; KORVER, 2008). Assim, sabe-se que o adequado balanço microbiano intestinal é essencial não apenas para garantir a saúde do animal, mas também para evitar que os nutrientes dietéticos sejam utilizados de forma inapropriada.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que, na maioria das vezes, o aumento no número de *Lactobacillus* está associado com melhor saúde intestinal. Entretanto, Torok et al. (2011) verificaram que a presença de três espécies de *Lactobacillus* (*L. salivarius, L. aviarius e L. crispatus*) no íleo de frangos está potencialmente interligado com pior desempenho, o que pode elucidar os resultados obtidos por Peinado et al. (2013), em que com a diminuição do gênero *Lactobacillus*, houve melhor desempenho de frangos.

3.2. Aditivo alternativo aos AMDs – Prebióticos: Levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae*

Sobre as definições funcionais para a classe dos prebióticos, Gibson e Roberfroid (1995) os definiram como compostos que são "ingredientes indigestíveis que afetam positivamente o hospedeiro ao estimularem seletivamente o crescimento de um número limitado de bactérias no intestino e assim, promovem a melhora da saúde do indivíduo''. Posteriormente, com o desenvolvimento apurado desse ramo de aditivos, Roberfroid (2007) redefiniu os critérios para a classificação desses mesmos compostos no grupo dos prebióticos, afirmando que esses aditivos além de promoverem a fermentação microbiológica no ambiente intestinal e seleção de micro-organismos benéficos, devem resistir à acidez gástrica, hidrólise de enzimas nos animais e à absorção ao longo do trato gastrointestinal.

Para exemplificar a utilização de aditivos prebióticos na alimentação animal, a levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) íntegra (GAO et al., 2008; GAO et al., 2009; ALIZADEH et al., 2016) ou extratos de carboidratos constituintes de parede celular (mananoligossarídeos, fosfoligossacarídeos e β–glucanos) têm sido objeto de estudo na nutrição de frangos de corte (COX et al., 2010 a; COX et al., 2010 b; RAJAPAKSE et al., 2010; MUNYAKA et al., 2012; SHANMUGASUNDARAM; SELVARAJ, 2012; YITBAREK et al., 2012; YITBAREK et al., 2013; SHAO; GUO; WANG, 2013). Outro componente de levedura amplamente testado em frangos de corte são os nucleotídeos que representam excelentes fontes de ácidos nucleicos (UAUY, 1994; CARVER; WALKER, 1995; HOLEN; JHONSSON, 2004; MATEO; DAVE; STEIN, 2004). A levedura é obtida a partir da fermentação anaeróbica do caldo da cana ou do melaço, no processo de produção do álcool, coletada via centrifugação do vinho ou via fundo das dornas de fermentação e, posteriormente, submetida à secagem (ZANUTTO et al., 1999) (Figura 1).

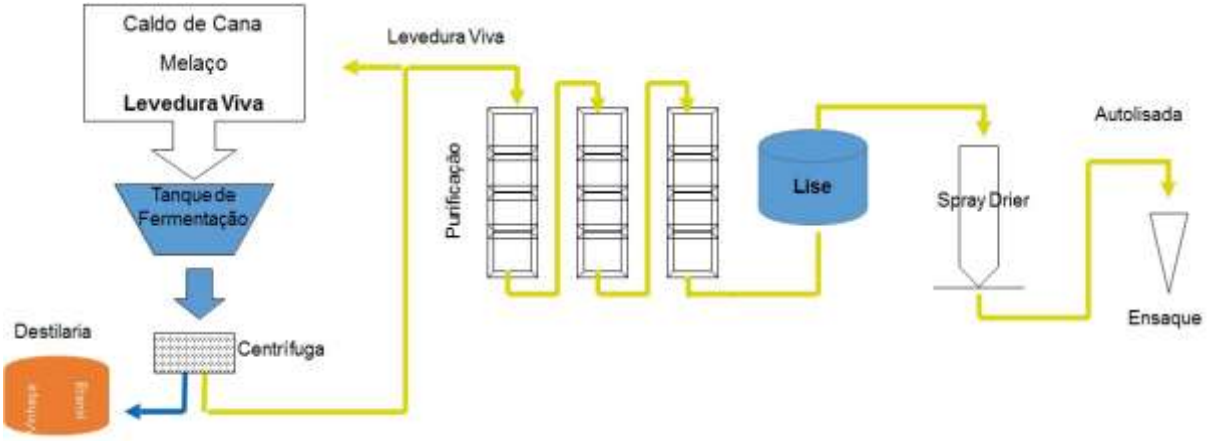

Figura 1. Fluxograma: produção de levedura autolisada (Créditos ALERIS®)

Derivada do cultivo das leveduras nas dornas de fermentação, as leveduras autolisadas consistem de células fragmentadas as quais contêm todos os componentes intracelulares e a fração da parede celular. As leveduras autolisadas são resultado do processo de degradação celular, ativado pelas próprias enzimas da levedura que solubilizam os diversos elementos celulares nela presentes (REED; NAGODAWITHANA, 1991; SOMMER, 1996). A utilização da levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* aporta ao animal seus constiuintes celulares solúveis (autolisados) e metabólitos, para utilização direta tais como nucleotídeos, vitaminas, minerais, proteínas, e organelas celulares utilizadas indiretamente pelo hospedeiro, dentre os quais se incluem, principalmente os carboidratos estruturais da parede celular da levedura (mananoligossacarídeos e β-1,3/1,6 glucanos) (Figura 2).

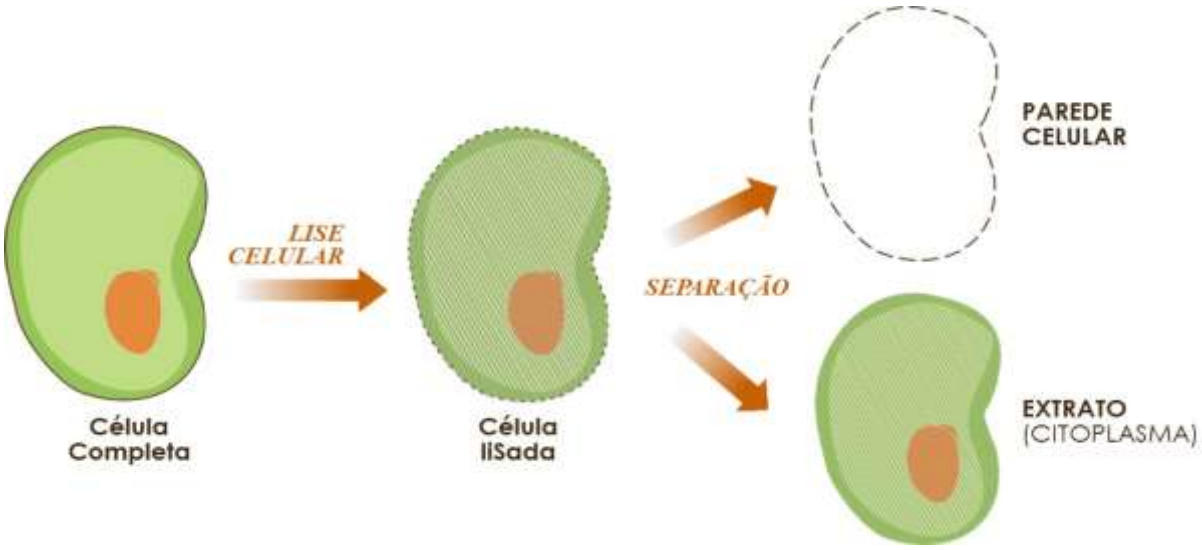

Figura 2. Processamento das leveduras: obtenção da célula lisada, extrato e parede celular.

A composição dos produtos à base de levedura é muito dependente do processo de extração e autólise a que os mesmos são submetidos, e, portanto, é comum encontrar na literatura muita variação na caracterização desses compostos, que resultam em divergência ou ausência das respostas zootécnicas ou imunológicas avaliadas pelos diferentes autores. Geralmente, a levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* contém 29 – 64% de β-glucanos, 31% de mananoligassacarídeos, 13% de proteína, 9% de lipídeos e 1 – 2% de quitina, sendo sua composição dependente fortemente das condições de cultivo e obtenção do levedo (JAEHRING et al., 2008).

Os produtos comerciais à base de levedura específicos para alimentação são utilizados mundialmente na produção animal, particularmente, na nutrição de bovinos. Os benefícios da suplementação de levedura para bovinos estão relacionados com o aumento da concentração de bactérias ruminais totais e celulolíticas, promovendo o aumento da energia metabolizável das dietas e, desta maneira, contribuindo para a melhora do desempenho animal (WALLACE, 1994; NEWBOLD et al., 1995). Entretanto, os mecanismos ou modos de ação para suplementação em aves parece não completamente elucidado, haja visto que o efeito do aumento da colonização do intestino do hospedeiro por bactérias benéficas ou a supressão de bactérias patogênicas não foram completamente elucidados em trabalhos que avaliaram a microbiota intestinal (STANLEY et al., 2004; MATHEW et al., 1998).

A imunonutrição pode ser definida pela suplementação dietética de nutrientes específicos ou aditivos que afetam positivamente as diversas funções do sistema imune com o propósito de, por exemplo, deteterminar a eficiência de resposta do sistema imune e a resistência do hospedeiro à infecção de vírus, bactérias ou protozoários. Mecanismos de

resposta pertencentes ao sistema imunológico do animal podem reconhecer estruturas químicas similares às encontradas em potentes antígenos e, assim, desempenham um importante papel como sinalizadores emergenciais para desencadeamento de uma série de respostas imunes em cascata as quais protegem o hospedeiro do efeito dos agentes agressores. Sendo assim, potentes agentes imunomodulares devem conter estruturas químicas capazes de ativar as respostas do sistema imune (ŚWIĄTKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JÓZEFIAK, 2014).

As leveduras autolisadas foram utilizadas por muito tempo na produção animal como ingredientes proteicos dada a alta concentração e alto valor biológico desse nutriente, sendo um substitutivo parcial ao farelo de soja e, por muito tempo, foram utilizadas como fonte de vitaminas do complexo B. Apesar da constituição nutricional variável dos compostos de levedura, a levedura autolisada contém compostos com importantes propriedades imunomodulatórias: mananoligossacarídeos (MOS), β-1,3/1,6 glucanos, nucleotídeos, inositol e glutamina, sendo os três primeiros compostos os mais referenciados nos estudos de imunonutrição em frangos de corte (ŚWIĄTKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JÓZEFIAK, 2014).

Na literatura de referência, encontram-se publicações cujos estudos estão demonstrados o efeito individual dos compostos de leveduras com propriedades imunomodulatórias, através da suplementação nas dietas de MOS ou nucleotídeos, por exemplo, ou também a suplementação de leveduras autolisadas que contém na sua formulação todos os componentes celulares imunoestimulantes, citados anteriormente, assim como componentes celulares com diverentes funções dentre os quais aminoácidos e vitaminas, e entre outros.

Para melhor compreender os efeitos imunomodulatórios da levedura autolisada *Saccharomyces cerevisiae*, cada componente celular será brevemente abordado indivualmente com suas devidas características e propriedades de estímulo do sistema imune, bem como abordar-se-ão os efeitos conjuntos dos compontes celulares da levedura diante dos estudos que demonstram o uso da levedura autolisada.

As estruturas β-1,3/1,6 glucanos das leveduras são longas cadeias de polissacarídeos compostas por numerosas unidades de D-glicose (monômeros) ligadas por ligações β-glicosídicas 1,3 que representam cerca de 85% da estrutura da parede celular de β-glucanos, juntamente com cadeias laterais de monômeros de de D-glicose ligadas na posição 1,6 (KOLLAR et al., 1997). A estrutura de β-1,3/1,6 glucanos das leveduras difere da estrutura de

β-glucanos de cereais (1,3/1,4), sendo a primeira caracterizada pela alta atividade biológica das quais as propriedades imunológicas remontam à presença das ligações β-1,3 na estrutura dos glucanos. Os β-glucanos das leveduras são capazes de se ligarem aos recepectores CR3 específicos de macrófagos através do reconhecimento de carboidratos estruturais celulares (glicoproteínas), presentes, por exemplo, em antígenos bacterianos. O resultado é o desencadeamento de uma série de reações que ativam a fagocitose por macrófagos e a produção de citocinas e eicosanoides como a IL-1 (interleucina 1), TNF-α (fator de necrose tumoral) e PGE2 (prostaglandina 2) o que acaba por ativar a proliferação de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ que resultam no aumento da estimulação da imunidade inata e adquirida (imunidade celula e humoral) do indivíduo (DOITA et al., 1991; ABEL; CZOP, 1992).

Os oligossacarídeos são carboidratos compostos de pequenas cadeias de mossacarídeos. Alguns desses oligossacarídeos têm a o potencial de promover o crescimento benéfico de micro-organismos no trato gastrointestinal e outros atuam através da competição com bactérias patogênicas através dos sítios específicos de ligação no lúmen intestinal. A manose é o componente principal dos mananoligossacarídeos (MOS) e diferentemente dos fosfoligossacarídeos (FOS), encontrados comumente em cereais e cebolas, sua atuação mais comumente citada, se deve principalmente através da competição com os sítios ligantes das bactérias patogênicas. Os MOS também são referenciados na litetura como aditivos que promovem a melhora da saúde intestinal indicada pelo aumento do comprimento das vilosidades intestinais, aumento de células caliciformes (produtoras de muco) e aumento das populações de gêneros bacterianos benéficos tais como *Lactobacillus* e Bifidobactérias e redução das populações de bactérias como a *Samonella* e *Escherichia coli* (SIMS et al., 2004; BRÜMMER; JANSEN VAN RENSBURG; MORAN, 2010). Outro mecanismo sugerido para atuação do MOS é através da modulação da atividade do sistema imune, pela estimulação da imunidade intestinal de mucosa que é ativada pelos MOS que atuam como antígenos microbianos não patogênicos (DAVIS et al., 2004).

A propriedade mais reconhecida dos mananoligossacarídeos derivados das leveduras refere-se a propriedade destes aglutinarem bactérias Gram-Negativas que contêm estruturas fímbrias do tipo 1 (lectinas aglutinadas por manoses) pertencentes, por exemplo, à *Salmonella* sp. e à *Escherichia coli*. Esses potentes patógenos são adsorvidos ou ligados ao MOS ao invés de se aderirem ao epitélio das células intestinais, movendo-se ao longo do intestino sem colonização celular. Entretanto, há evidência que o MOS pode atuar como um antígeno não patogênico intestinal que possui atividade semelhante aos adjuvantes, atuando de forma benéfica na função imunológica. Essa propriedade imunomodulatória é atribuída à presença

de estruturas de superfície de defesa que possuem receptores de manose e portanto, envolvidas no reconhecimento antigênico (ENGERING et al., 1997; FERKET; PARKS; GRIMES, 2002).

As leveduras autolisadas também representam importantes fontes de nucleotídeos derivados do RNA celular da levedura, e estão envolvidos em diversos processos biológicos, principalmente como precursores de ácidos nucleicos. Os efeitos imunomodulatórios dos nucleotídeos em diferentes fases do sistema imune foram corroborados em vários modelos de estudos *in vitro* e *in vivo* em animais de laboratório. A suplementação de nucleotídeos para ratos imunosuprimidos e infectados com *Cryptosporidium parvum* promoveu um aumento da reposta a antígeno específico na proliferação celular do baço, acarretou no aumento da produção de IL-2 (interleucina 2), IFN-gamma (interferon gamma) e melhorou a taxa de sobrevivência dos animais, reduzindo a excreção de oocistos. O modo de ação dos nucleotídeos sobre a imunidade não é completamente elucidado, mas está fortemente ligado com o fato de a rápida proliferação das células imunológicas não serem atendidas completamente com nucleotídeos pela síntese *de novo* e salvamento, e preferencialmente os nucleotídeos da dieta e sanguíneos são utilizados para essa grande demanda celular (CARVER, 1994; ADJEI et al., 1999; GIL, 2002).

3.3. Imunidade intestinal

A caracterização da composição dos produtos à base de leveduras deve ser bem esclarecida, pois os elementos celulares que constituem esses micro-organismos são bastante variáveis e complexos. Ao utilizar levedura *Saccharomyces cerevisiae* autolisada em uma dieta para frangos de corte, deve-se considerar, sob o ponto de vista imunológico, a atuação de diversos componentes celulares tais como beta-glucanos e MOS, presentes na parede celular, e os nucleotídeos intracelulares, por exemplo, na modulação da resposta imune intestinal do hospedeiro.

A resposta imune pode ser dividida em resposta inata e resposta adaptativa. Esta diferença está relacionada aos processos envolvidos na eliminação de um agente agressor após sua entrada no organismo. A resposta imune inata duraria no máximo 96 horas e, se após este tempo o agente agressor ainda persistir, o organismo lança mão da resposta adaptativa. Além da distinta atuação das respostas em relação ao tempo de exposição, o que as diferencia fudamentalmente uma da outra é a especificidade

A resposta inata, como primeira linha de defesa, age por meio das células e sinalizadores (citocinas), que não apresentam especificidade, onde o aparato recrutado para eliminação do antígeno “A” também pode agir sobre um antígeno “B”. Esta resposta pode ser mais “cara” metabolicamente para o organismo pela não especificidade, mas sem ela a resposta adaptativa, que é sinônimo de especificidade, não se inicia. O custo metabólico poderia ser justificado porque na resposta inata um grande número de células e citocinas são mobilizadas, e a falta de especificidade acarretaria um dispêndio maior de energia comparado à resposta específica, que poderia ser entendida como uma ação “cirúrgica” (CARON, 2015).

O desenvolvimento do sistema imunológico é iniciado durante o período embrionário e continua na primeira semana após a eclosão. Durante esta semana, ocorre rápido aumento na população de leucócitos, através dos órgãos linfóides, e este aumento irá mediar a imunidade celular (RUTZ et al., 2005). O sistema imunológico é dividido em imunidade celular e imunidade humoral, sendo importante que os dois sistemas funcionem de forma integrada para proteger o organismo contra ação de agentes patogênicos (TIZZARD, 2009). O intestino possui um sistema imunológico especializado e representa um dos maiores órgãos relacionados ao sistema imune do animal, sendo considerado a primeira linha de defesa contra a maioria dos patógenos (GAO et al., 2012).

As aves possuem uma série de particularidades em seu sistema imunológico, as quais as diferenciam dos mamíferos, sob o ponto de vista anatômico e funcional. Os órgãos do sistema imunológico das aves podem ser classificados em primários, os quais são encarregados pela diferenciação das células deste sistema: timo e bolsa cloacal. Já os órgãos secundários são aqueles responsáveis pela migração ou agrupamento de células, formando sítios de amadurecimento / diferenciação e atuação: glândula de Harder, baço, tonsilas cecais, placas de Peyer. Órgãos imunes secundários começam a desenvolver sua capacidade imunológica na eclosão e serão capazes de responder efetivamente a um desafio apenas aos 10 dias após a eclosão (YUN et al., 2000).

O timo é um órgão localizado na região cervical, próximo do nervo vago e da veia jugular. É considerado o local de desenvolvimento e amadurecimento dos linfócitos T (auxiliares, citotóxicos, reguladores e supressores), porém também pode apresentar uma população de linfócitos B que varia de 5 a 10%, dependendo da idade da ave (MAST; GODDEERIS, 1999).

A bolsa cloacal, ou Bursa de Fabricius, é um órgão exclusivo das aves, com características anatômicas e estruturais marcantes. Esta estrutura desempenha papel fundamental no processo de amadurecimento e diferenciação dos linfócitos B (papel

desempenhado pela medula óssea em mamíferos). A bursa de Fabricius é o principal órgão para a síntese e maturação de linfócitos B, onde a diversidade de produção de anticorpos é gerada.

Em aves maduras o baço é um órgão de defesa com grande acumulação de linfócitos e macrófagos, importantes para a resposta contra antígenos (POPE, 1999). As aves não possuem linfonodos, assim o tecido linfóide associado à mucosa (MALT) é encontrado em diversos locais, como no trato gastrointestinal, trato respiratório e na cabeça. Ao longo do desenvolvimento do animal, ondas de colonização da mucosa por populações linfocitárias oriundas do timo e bolsa cloacal ocorrem a partir do 4º dia de vida e intermitentemente a partir dessa idade (BAR-SHIRA; FRIEDMAN, 2005). O MALT é um componente bem desenvolvido nas aves. O componente intestinal deste tecido mucoso chama-se GALT (tecido linfóide associado ao intestino) e responde por aproximadamente 80% de todo o potencial imune do MALT. No trato digestório, o sistema MALT inclui nódulos de agregados linfóides, como tonsilas cecais, divertículo de Meckel, placas de Peyer, e a recentemente descrita, tonsila esofágica (OLAH, 2003). Muitos linfócitos podem ser encontrados na porção intraepitelial e na lâmina própria no TGI. São, em grande maioria, linfócitos T, que possuem um importante papel de reconhecimento e processamento antigênico (LILLEHOJ; TROUT, 1996).

O intestino, como grande área mucosa, está sujeito ao contato inicial com a maioria dos principais desafios sanitários na exploração avícola. Este primeiro contato encontra um intestino que pela sua própria constituição já representa um compartimento e um momento da resposta imune. Esta resposta é chamada inata pela sua inespecificidade, e particularmente inata constitutiva. A barreira epitelial mucosa representa este compartimento imune, se traduzindo em qualidade pela própria viabilidade das células epiteliais e das células produtoras de muco (CARON, 2015).

Faber e Bäumler (2014) descrevem que para manter a integridade da mucosa intestinal, qualquer desafio presente na barreira epitelial precisa desencadear uma resposta inflamatória a fim de combater micro-organismos, proteger a superfície da mucosa e reparar lesões no epitélio. Isto não acontece apenas contra os agentes patogênicos, mas também contra micro-organismos comensais. Para todos os micro-organismos é necessária uma resposta imune primária, com consequente estabelecimento de tolerância imunológica. Por outro lado, a resposta imunológica também estabelece um custo metabólico para o hospedeiro.

O equilíbrio entre a defesa dos animais e desafio é imprescindível na manutenção da integridade do intestino. Em situação de campo, há diversos desafios infecciosos, nutricionais e de manejo que podem afetar esse equilíbrio e resultar em problemas sanitários (disbacterioses) e redução no desempenho (SANTIN; DE MORAES, 2015).

Em todos os segmentos do intestino, existe uma relação muito próxima entre o hospedeiro e sua microbiota, população de microrganismos que habitam o lúmen intestinal. A colonização microbiana inicia-se antes mesmo da eclosão, quando a microbiota das matrizes é passada à progênie através da casca do ovo logo após a postura (GANTOIS et al., 2009). Durante os primeiros dias de vida, a colonização da microbiota ainda é instável, ficando susceptível a diversos fatores nutricionais e ambientais.

A intensidade da reação imunológica vai depender do tipo de interação que o micro-organismo terá com o hospedeiro. Normalmente, o micro-organismo patogênico tenta atacar ou invadir as células epiteliais (produção de moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas), enquanto bactérias comensais são inofensivas. A presença constante de micro-organismos comensais nos mesmos níveis de pressão infectiva induz ao que chamamos de tolerância imunológica, um estado de não reatividade do hospedeiro a um determinado antígeno. Essa tolerância é essencial para reduzir o processo inflamatório na mucosa intestinal e afeta diretamente o desempenho dos animais (SANTIN; DE MORAES, 2015).

A imunidade intestinal inata ou inespecífica, visto que é influenciada pela microbiota comensal, é até certo ponto, necessária para a manutenção do equilíbrio ou homeostase celular, caracterizada pelo estado de tolerância imunológica. A estimulação da resposta imune intestinal inata é pré-requisito, portanto, para o surgimento de respostas mais específicas e duradouras, caracterizadas pela resposta imune adaptativa (adquirida) ou específicas. As respostas imunes específicas são caracterizadas pela presença ou atução das células de mémoria, na sua maioria linfócitos, capazes de reconhecimento de antígenos e montagem de respostas imunológicas rápidas e muito eficientes. Resumidamente, a resposta imune intestinal inata tem a partcipição de agentes sinalizadores (citocinas), células imunológicas fagocíticas inespecíficas, barreira física (epitélio intestinal íntegro) e barreira química (muco intestinal) (SANTIN; DE MORAES, 2015).

3.4. Imunidade intestinal inata – Citocinas: comunicação celular das células do sistema imune

A análise da produção de citocinas (interleucinas-IL e interferon-INF) pelas células do sistema imunológico é um componente essencial para compreender o funcionamento das respostas imunológicas, sendo que são usualmente divididas em dois grupos: citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18 e INF-γ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF-β). A modulação da produção destas citocinas deve propiciar um balanço das respostas pró e anti-inflamatórias para evitar a super estimulação do sistema imune (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005).

No sistema imune, as citocinas são consideradas os principais fatores de comunicação entre as células do sistema imune e atuam como agentes imunomodulatórios, regulando as repostas inatas e adaptativas em resposta a antígenos e agentes infecciosos (STENGER; RÖLLINGHOFF, 2001).

Produtos à base de leveduras são considerados como potenciais alternativos à utilização de antimicrobianos melhoradores de desempenho, devido a sua capacidade de ativar o sistema imune e promover a competição com bactérias patogênicas por sítios de ligação no epitélio intestinal (FERKET; PARKS; GRIMES, 2002; GAO et al., 2008). Os mecanismos de imunomodulação desses aditivos ainda permanecem pouco esclarecidos. Entretanto, tem-se sugerido que os polissacarídeos de parede celular das células das leveduras, incluindo os mananoligasacarídeos e β-1,3/1,6 glucanos, podem atuar como intermediadores da resposta imune, pois são estruturas que expressam superficialmente o padrão molecular associado a patógenos (PAMP), presente também em moléculas microbianas, tais como lipopolissacarídeos e peptidioglicanos, e assim são reconhecidos por células específicas do sistema imune do animal. Essas células que reconhecem esse padrão de superfície celular são dotadas de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e pertencem à rede celular envolvida com a reposta inata do animal (FERKET; PARKS; GRIMES, 2002; SHASHIDHARA; DEVEGOWDA, 2003; MOGENSEN, 2009).

A inflamação tecidual ocorre quando macrófagos residentes são ativados ao reconhecerem o antígeno de superfície PAMP presentes na parede celular de leveduras ou de agentes patogênicos através dos PRRs. Os macrófagos estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-6) que ativam as células do endotélio vascular a expressarem moléculas de adesão (selectinas) que iniciam o processo de inflamação tecidual caracterizado

pelo recrutamento maior e adesão de leucócitos ao endotélio por meio de quimiocinas e integrinas, reespectivamente. Além de ser crucial no recrutamento e na amplificação dos mecanismos efetores da imunidade inata, a inflamação também é importante em outras funções como remoção de células e tecidos lesados, inativação de toxinas e reparo tecidual.

A modulação dos PRRs pelas células do sistema imune inato (incluindo receptores do tipo *Toll*, e lectinas tipo C) através dos PAMP presentes nos carboidratos estruturais das leveduras é seguida pela apresentação antigênica aos linfócitos T e B e produção de citocinas cuja função é mediar respostas imunes futuras (STENGER; ROLLINGHOFF, 2001). Alguns estudos já realizados confirmam que os produtos à base de levedura são capazes de estimular o sistema imune de frangos de corte através da modulação da expressão gênica de PRRs e citocinas (YITBAREK et al., 2013).

A interleucina 1β (IL-1β) tem demonstrado seu comportamento tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, ser uma citocina de fator de crescimento para proliferação de linfócitos B, devido a indução da citocina IL-6, cuja atividade também é regulada pela IL- 1β (DINARELLO, 2009). As IL-1β e IL-6 são citocinas pleiotrópicas que regulam as respostas imunes, sendo caracterizadas como citocinas pró-inflamatórias secretadas mediante a indução da resposta imune inata (KAISER et al., 2004). Ao estudarem a suplementação de extrato de leveduras à base de nucleotídeos, Yitbarek et al. (2013) não encontraram diferenças significativas na expressão gênica de IL-1β no íleo, bursa e baço de frangos de corte suplementados com nucleotídeos mais antibióticos e entre animais do grupo controle positivo (somente antibióticos).

Ao estudarem os efeitos imunológicos da levedura íntegra *Saccharomyces cerevisiae*, Gao et al. (2009) mostraram o efeito modulador da suplementação de levedura na modulação da reposta de frangos de corte desafiados com *Eimeria tenella*. A inclusão da levedura *Saccharomyces cerevisiae* propiciou um aumento na contagem dos linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ tanto nos animais desafiados quanto no grupo controle. Os resultados sugerem que a suplementação da levedura pode aumentar o potencial de resposta imune do hospedeiro. As aves desafiadas são muito dependentes da imunidade celular para combater a infecção, mediada principalmente pela presença de linfócitos T $CD8^+$ (linfócitos T citotóxicos) pelo seu potencial citotóxico. A suplementação de levedura também ativou linfócitos T $CD4^+$ (linfócitos T auxiliares). Os linfócitos T $CD4^+$ secretam citocinas, como o IFN-γ e IL-22, que ativam macrófagos e modulam a resposta imune (ARSTILA; VAINIO; LASSILA, 1994).

Em frangos de corte, as células T auxiliares efetivas (linfócito T $CD4^+$) desempenham um importate papel na regulação da resposta imune. Após a ativação, os

linfócitos T $CD4^+$ diferenciam-se em linfócitos T auxilares 1 e/ou 2 e/ou 17. Essas três subpopulações de células T são caracterizadas pelos tipos diferentes de citocinas por elas estimuladas (PAUL; SEDER, 1994; VAN DER VEERDONK; NETEA, 2010). Os linfócitos auxiliares 1 efetores estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1β, IL-12 e IFN-γ que estão envolvidos na imunidade celular mediada; linfócitos auxiliares 2 efetores produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, que estimulam a proliferação de linfócitos B e diferenciação em células secretoras de anticorpos no plasma (HAGHIGHI, 2005). A linhagem de linfócitos Th17 é responsavel por prover ao indivíduo um mecanismo único de proteção contra bactérias e patógenos fúngicos pela indução da produção de citocinas inflamatórias e outras proteínas. Na presença, por exemplo, de IL-1β e IL-17, esses linfócitos auxiliares T também são responsáveis por induzirem a granulopoiese, ou o recrutamento de neutrófilos (heterófilos nas aves), sendo esses mecanismos importantes na resposta inata do hospedeiro (SCHWARZENBERGER et al., 1998).

Ao mensurarem a resposta das células T efetoras 1 e 2, por meio da produção específica de citocinas, Alizadeh et al. (2016) demonstraram que a suplementação de virginamicina e de dietas com distintos produtos à base de leveduras (parede celular, nucleotídeos e parede celular mais nucleotídeos) promoveram diminuição da expressão gênica do IFN-γ e IL-12 no baço de frangos de corte não desafiados experimentalmente. Além da supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias, essas mesmas dietas suplementadas aos animais promoveram a diminuição da expressão gênica de IL-4 e IL-10.

Entretanto, Yitbarek et al. (2013) ao suplementarem monensina (controle), bacitracina metileno disalicilato (BMD) ou BMD combinado com nucleotídeos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para frangos de corte, ausentes de desafios imunológico, verificaram aumento da expressão gênica de TLR-4 no baço e aumento de IL-10 no íleo dos frangos alimentados com antibiótico e nucleotídeos de levedura em contraste com o tratamento BMD. Nas tonsilas cecais de frangos de corte, os mesmos autores verificaram que os tratamentos BMD e BMD associado com nucleotídeos promoveram aumento da expressão de IL-1β em comparação com o tratamento controle à base de monensina, sendo que o tratamento com a associção de antibiótico mais levedura promoveu também o aumento da expressão gênica de IFN-γ no baço dos frangos de corte. A suplementação de nucleotídeos de levedura juntamente com antibiótico promoveu a ativação conjunta de citocinas pró e anti-inflamatórias mediadas por células T auxiliares 1 e T auxiliares 2, reespectivamente, em nível local (intestino) e sistêmico (bursa e baço).

3.5. Proteção da mucosa intestinal: muco protetor e junções epiteliais espessas

Outro aspecto importante que merece destaque com referência à imunidade inata é a produção de mucina pelas células caliciformes intestinais. Uni e Smirov (2006) investigaram a possibilidade de adição de mananoligossacarídeos na dieta de frangos sobre a biossíntese de mucina e sua secreção no intestino delgado. Os resultados indicaram que os MOS apresentaram um efeito estimulador da mucina, propiciando um aumento no desenvolvimento das células caliciformes, resultando em maior camada de muco. Além disso, a inclusão de MOS na dieta aumentou a produção de RNAm do gene Muc-2.

A mucina 1 (Muc-1) e mucina 2 (Muc-2) são os genes responsáveis pela encodificação da produção de mucina. A mucina é feita de glicoproteínas, secretada pelas células caliciformes e tem como função protetiva de neutralizar patógenos, impedindo-os de adesão junto do epitélio intestinal. Os linfócitos T e as citocinas ativadas pelos linfócitos T auxiliares 2 são mediadores da produção de mucina através do aumento da expressão dos genes que regulam a sua produção (BEUN et al., 2005).

Outro importante mecanismo protetor da mucosa intestinal são as *tight junctions* ou junções espessas (TJ), estruturas proteicas que formam uma barreira entre os enterócitos e mantém equilibrada a permeabilidade do intestino, restringindo, assim, a penetração e difusão de patógenos na corrente sanguínea (KINUGASA et al., 2000). Essas estruturas são compostas de três tipos de proteínas transmembranais: ocludina, claudina e moléculas de adesão juncionais (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). Ocludina e claudina são os componenents mais importantes na regulação e funcionamento da barreira epitelial dos enterócitos (FANNING et al., 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento de campo

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela CEUA. O experimento foi realizado no biotério experimental do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de 23 de fevereiro a 06 de abril de 2015. As aves foram alojadas em um aviário experimental, que possui 25 metros de comprimento por 10 metros de largura. O aviário é dividido em duas fileiras de 18 boxes cada, totalizando 36 boxes, sendo que as fileiras são separadas por um corredor de 2,0 m de largura. Cada boxe possui área de 4,5 m^2 e uma porta de acesso ao corredor. O aviário é equipado com 6 ventiladores e com nebulizador (linhas de bicos aspersores distribuídos em todo galpão).

Os boxes, contendo 10 cm de cama nova de casca de arroz, foram forrados com papel durante os três primeiros dias de alojamento, sendo que cada boxe era equipado de lâmpada infravermelha para aquecimento, bebedouro e comedouro infantil. O bebedouro infantil foi substituído por bebedouro pendular no quarto dia de alojamento e o comedouro infantil substituído pelo adulto ao sétimo dia da criação.

Os sistemas de aquecimento e resfriamento do galpão são ligados a um painel controlador automático de ambiente.

O período experimental foi de 1 a 35 dias, utilizando pintinhos machos de peso médio 47,85 gramas, da linhagem Ross 308 AP95, oriundos de matrizes com idade de 54 semanas de idade. Os pintinhos de um dia de idade foram vacinados no incubatório para as doenças de Marek, Gumboro e bronquite infecciosa e receberam o antibiótico de amplo espectro de ação ceftiofur (1 mL para cada 625 pintos de um dia, administrado junto com o veículo das vacinas). O antibiótico e a aplicação das vacinas fazem parte da rotina do programa higiênico e sanitário do incubatório contratado. As aves foram divididas em 4 tratamentos e 7 repetições/tratamento, totalizando 28 parcelas de 45 aves cada, totalizando 1260 aves em um delineamento inteiramente aleatorizado. As aves foram inicialmente separadas for faixa de peso, em seguida distribuídas nos boxes, de forma que o peso das unidades experimentais fosse o mais homogêneo possível.

O programa nutricional foi composto por três rações experimentais, destinadas às diferentes fases de criação das aves: pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (7 a 21 dias de idade) e crescimento (21 a 35 dias de idade) (Tabela 1). As rações foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental, na forma farelada. Com o objetivo de impor desafio

sanitário às aves, foi incluída na formulação farinha de penas e vísceras de aves (possivelmente contaminadas, isto é, sem tratamento prévio), ao nível de 5% como ingrediente nas rações experimentais de todas as fases. Além disso, também foi utilizado farelo de trigo com inclusão de 5% nas dietas experimentais para acentuar o desafio experimental, uma vez que o ingrediente pode provocar aumento da viscosidade do conteúdo intestinal das aves pelo maior conteúdo de fibra. As rações foram formuladas para atender as exigências nutricionais de frangos de corte (desempenho regular) nas diferentes fases de criação, de acordo com as Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (ROSTAGNO et al., 2011).

Os tratamentos propostos foram constituídos pela substituição de um inerte (caulim) pelos aditivos (antibiótico ou levedura autolisada) na ração durante todo o período experimental:

T1: Controle negativo – Ração basal, sem inclusão de aditivos

T2: Controle positivo – Ração basal suplementada com antimicrobiano (55 mg/kg de bacitracina de zinco);

T3: Ração basal suplementada com levedura autolisada – 2kg/t

T4: Ração basal suplementada com levedura autolisada – 4kg/t

Tabela 1. Composição das rações experimentais

Ingredientes, %	Pré-inicial	Inicial	Crescimento
Milho	48,97	57,76	62,10
Farelo de soja	34,47	26,78	23,27
Farelo de trigo	5,0	5,0	5,0
Farinha de penas e vísceras	5,0	5,0	5,0
Óleo de soja	2,40	1,64	1,69
Fosfato bicálcico	1,51	1,11	0,873
Calcário calcítico	0,84	0,98	0,868
Sal comum	0,46	0,44	0,41
DL-Metionina	0,313	0,258	0,226
L-Lisina HCl	0,272	0,296	0,279
L-Treonina	0,061	0,055	0,036
Suplemento vitamínico[1]	0,150	0,150	0,120
Suplemento mineral[2]	0,05	0,05	0,05
Cloreto de Colina (60%)	0,08	0,06	0,05
Inerte	0,4	0,4	0,4
Total (kg)	100	100	100
EMAn (kcal/kg)	2925	2980	3050
Poteína Bruta (%)	23,19	20,32	19,15
Lisina digestível. (%)	1,304	1,141	1,045
Met.+cistina digestível (%)	0,939	0,822	0,763
Metionina digestível (%)	0,613	0,529	0,496
Treonina digestível (%)	0,848	0,742	0,679
Cálcio (%)	0,920	0,860	0,750
Fósforo disponível (%)	0,470	0,384	0,335
Potássio (%)	0,841	0,726	0,764
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200

[1]DSM Nutritonal products, Composição por kg de produto: Vit. A – 9.000000 UI; Vit. D3 – 2500000 UI; Vit. E - 20000 UI; Vit. K3 – 2500 mg; Vit. B1 – 2000 mg; Vit. B2 – 6000 mg; Vit. B6 – 3000 mg; Vit. B12 – 15000 µg; Ácido Nicotínico - 35 g; Ácido Pantotênico – 12 g; Biotina – 100 mg; Ácido Fólico –1500 mg; Selênio– 250 mg

[2] DSM Nutritional Products, Composição por kg de produto: Manganês - 160000 mg; Ferro – 100000 mg; Zinco - 100000 mg; Cobre - 20000 mg; Cobalto - 2000 mg; Iodo - 2000 mg

Com o objetivo de impor maior desafio imunológico aos animais, todas as aves foram vacinadas, aos 7 dias de idade, por via ocular com uma vacina contra coccidiose (Bio-Coccivet R/Biovet), usada na indústria na produção de matrizes, contendo oocistos esporulados vivos atenuados das seguintes espécies de *Eimeria*: *E. acervulina; E. brunetti; E. maxima; E. necatrix; E. praecox; E. tenella e E. mitis*, na dosagem recomendada pelo laboratório.

As aves e a sobra das rações fornecidas foram pesadas semanalmente (7, 14, 21, 28, 35 dias) para determinação das variáveis de desempenho, peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA). A conversão alimentar foi corrigida para mortalidade e calculada conforme Sakomura e Rostagno (2007).

4.2. Procedimentos gerais da coleta experimental

Aos 8 e 21 dias de idade, uma ave por parcela (sendo sete repetições por tratamento) foi selecionada sem jejum prévio para coleta de sangue. Em seguida, essa ave foi sacrificada por deslocamento cervical para coleta de conteúdo e tecido intestinal. Foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue da veia braquial (ulnar) ou pela punção cardíaca (somente para os animais de oito dias de idade nos quais a coleta pela veia braquial era impraticável), utilizando seringas heparinizadas com o acondicionamento em tubos de ensaio heparinizados dentro de isopor refrigerado com gelo. Após a coleta de sangue, um segmento de íleo (2 cm), localizado na porção medial, próximo à junção ileoceal, foi coletado e transferido para tubos *eppendorfs* acondicionados em gelo seco. Foram coletados também cerca de 5 g de conteúdo intestinal do íleo (2 cm após o divertículo de Meckel) e 5 g de conteúdo cecal de ambos cecos e cada amostra individualizada foi homegeinizada e acondicionada em tubos *falcon* mantidos refrigerados até análise.

4.3. Enumeração bacteriana do conteúdo intestinal ileal e cecal

Amostras do conteúdo intestinal do íleo (2 cm após o divertículo de Meckel) e de ambos os cecos foram coletadas. Cada amostra, de aproximadamente 5 g, foi coletada com o máximo de assepsia e armazenada em tubos f*alcon* de 15 mL estéreis e mantidas em refrigeração por até 24 horas até o seu processamento.

Para a realização das culturas microbiológicas, foi necessário pesar 1 g desse material coletado e homogeinizá-lo. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma diluição 10^{-1}, sendo 1 g da amostra diluído em 9 mL de solução salina 0,85% e homogeneizadas em vórtex por 30 s, sendo que essa constituiu a amostra diluidora para as subsquentes diluições. Assim, procederam-se diluições seriadas até 10^{-7}, pipetando-se 100 μL da diluição anterior em *eppendorf* com 900 μL de solução salina 0,85%, e homogeneizando em vórtex por 10 s. Logo após, uma alíquota de 100 μL das diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram semeadas por espalhamento em superfície em cada meio de cultura específico. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, o número de colônias de cada placa foi contado com o auxílio de uma mesa de luz, utilizando como referência a descrição de coloração das colônias para cada meio de cultura. As colônias com crescimento indesejado de fungos, por exemplo,

foram descartadas da contagem. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba – SP, com auxílio da Profa. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi e do técnico do laboratório, José Antônio da Silva.

4.3.1. Enumeração de *Enterococus* sp.

Utilizou-se ágar Mueller-Hinton para crescimento e determinação da grande maioria dos isolados clínicos como *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*. Este ágar possui uma substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse, sendo utilizado comumente na medicina humana para teste de sensibilidade em antibiogramas. As colônias de *Enterococcus* sp. nesse meio apresentaram a coloração branca.

4.3.2. Enumeração de *Echerichia coli*

Utilizou-se ágar Eosina Azul de Metileno (E.M.B. Levine - BD) para isolamento de bactérias entéricas Gram-negativas. A eosina Y e o azul de metileno são indicadores de coloração e desempenham um papel na diferenciação entre fermentadores e não fermentadores de lactose devido a presença ou ausência da absorção do corante nas colônias de bactérias. O azul de metileno também funciona como um agente seletivo inibindo as bactérias Gram-positivas para um grau limitado. As colônias de *Escherichia coli* nesse meio apresentaram coloração verde metálico brilhante devido a fermentação rápida da lactose.

4.3.3. Enumeração de *Lactobacillus* sp.

Utilizou-se o ágar MRS criado por Man, Rogosa e Shaper para cultivo e isolamento de *Lactobacillus* sp. O citrato de amônia, magnésio, manganês e os aminoácidos e vitaminas oriundas de leveduras são propícios para o crescimento de lactobacilos. O polisorbato 80 (tween 80) atua como surfactante do meio de cultura que favorece a utilização dos nutrientes pelos lactobacilos. O acetato de sódio presente no meio de cultura inibe o crescimento de outros gêneros bacterianos. As colônias de *Lactobacillus* sp. nesse meio apresentaram a coloração branca.

4.3.4. Análise dos dados da enumeração bacteriana

Os dados para UFC (unidades formadoras de colônias) obtidos foram transformados em log_{10} e convertidos de UFC/μLpara UFC/mL. Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA), submetidos a ANOVA e em caso de significância, as médias dos tratamentos foram comparadas entre si em dois momentos de coleta (idades) pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

4.4. Citometria de fluxo

Cerca de 2 mL de sangue foram coletados das aves por punção cardíaca aos 8 dias de idade e pela veia ulnar aos 21 dias de idade utilizando seringas contendo heparina (Heparina sódica – Hepamax, Blausiegel, São Paulo, Brasil), acondiconado em tubos heparinizados Vacuteiner® (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). As amostras coletadas foram acondicionadas em isopor com temperatura de 4ºC até o seu processamento laboratorial. Todos os anticorpos foram adquiridos da Southern Biotechnology Associates (USA). O anticorpo camundongo anti-galinha CD45 (conjugado a SPRD – lido no canal FL3) clone LT40, foi usado para separar os leucócitos do sangue total. Para identificar as moléculas em superfície dos leucócitos os seguintes anticorpos foram utilizados: camundongo anti-galinha CD4 (clone CT-4, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha CD8α (clone CT-8, IG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha CD28 (clone AV7, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha MHC tipo II (clone 2G11, IgG1κ, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha receptor de célula T (TCR) αβ (Vβ1) (clone TCR2, IgG1κ, conjugado a PE); camundongo anti-galinha Bu-1a (clone 21-1A4, de linfócitos B, conjugado a PE).

As amostras de sangue total foram tratadas segundo Stabel et al. (2000) (modificado). Basicamente, 50 μL de sangue total foram incubados por 30 minutos (37°C) com os anticorpos específicos e fixados com paraformaldeído por 30 minutos a 4°C, posteriormente acondicionados em tubos de citometria em volume final de 2 mL de PBS + BSA 1% + Azida 0,02%. Os marcadores descritos foram utilizados para analisar as seguintes populações linfocitárias descritas na Tabela 2: linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 (não ativados, ativados, de mucosa), monócitos, monócitos supressores, células apresentadoras de antígeno e linfócitos B.

A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson) e as fluorescências dos anticorpos foram detectadas no canal verde FL1 (filtro 530/30 nm) para FITC, canal amarelo FL2 (585/42 nm) para PE e canal vermelho FL3 (695/40 nm) para SPRD. As células são selecionadas em gate de $CD45^+$, e a expressão relativa de CD4/TCRVβ1, CD8/CD28, Kul/MHCII e Bu1 é avaliada. Ao menos 10^4 células são contadas no gate de $CD45^+$. Os dados computadorizados foram analisados com o *software* Cell Quest (Becton, Dickison).

Tabela 2. Anticorpos monoclonais específicos. Anticorpos utilizados neste trabalho com a reespectiva subpopulação de células reconhecidas, e a marcação/conjugação específica de cada tipo celular

Células	Anticorpos
Linfócitos T auxiliares ($CD4^+TCRv\beta1^-$)	CD4/TCRvβ1/CD45
Linfócitos T auxilares de mucosas ($CD4^+TCRv\beta1^+$)	CD4/TCRvβ1/CD45
Linfócitos T citotóxicos de mucosas ($CD4^-TCRv\beta1^+$)	CD4/TCRvβ1/CD45
Linfócitos T auxiliares não ativados ($CD8^-CD28^+$)	CD8α/CD28/CD45
Linfócitos T citotóxicos ($CD8^+CD28^+$)	CD8α/CD28/CD45
Linfócitos T citóxicos ativados ($CD8^+CD28^-$)	CD8α/CD28/CD45
Monócitos (Kul^+MHCII^+)	Kul-1/MHCII/CD45
Células apresentadoras de antígenos (APCs) (Kul^-MHCII^+)	Kul-1/MHCII/CD45
Monócitos supressores (Kul^+MHCII^+)	Kul-1/MHCII/CD45
Linfócitos B (Bu^+)	Bu-1/CD45

4.4.1. Análise dos dados de citometria de fluxo

Todos os quatro tratamentos testados foram comparados entre si em dois momentos de coletas (idades). Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Para a formulação das figuras foi utilizado o *software* GraphPad Prism® 5. Quando necessário, os dados foram transformados em

transformação inversa e logarítimica para normalizá-los e permitir análise por ANOVA e em caso de significância, submetidos ao teste de Tukey (P<0,05).

4.5. Expressão de genes ligados à resposta imune intestinal

O segmento ileal foi coletado e armazenado em tubos *eppendorfs* em isopor com gelo seco nos momentos da coleta. Posteriormente, foi armazenado em freezer de temperatura de – 80°C até a subsequente extração do RNA, síntese de cDNA e análise da expressão gênica intestinal das citocinas: IL-1β (interleucina-1β), IL–4 (interleucina-4), TLR4 (receptores do tipo *Toll)*, Claudin-1 (claudina) e MUC–2 (mucina) utilizando PCR em tempo real (qPCR).

A preparação das amostras para qPCR foi desenvolvida de acordo com Horn et al. (2014). Cada amostra ileal teve o seu RNA isolado mediante a utilização de reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com a recomendação do fabricante. O precipitado de RNA foi suspendido em 20 µL de água livre de RNAse e armazenado a - 80 ^{o}C. A quantidade de RNA foi verificada por espectofotometria ultravioleta (UV) e posteriormente tratada com DNAse (Invitrogen, China). A fita complementar de DNA (cDNA) foi sintetizada a partir de 5 µL do RNA total, utilizando oligodT primers e transcriptase reversa (Superscript II), de acordo com o manual de instruções do fabricante (Invitrogen, China). A fita sintetizada de cDNA foi diluída 5 vezes com água destilada e armazenada - 20 ^{o}C antes de ser utilizada.

Os primers que foram utilizados para a PCR em tempo real estão descritos na literatura, e já foram utilizados em experimentos prévios (Tabela 3). A amplificação da PCR em tempo real foi realizada com 25 µL de mistura de reação, contendo 5 µL da diluição de cDNA, 12,5 µL (duas vezes) SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Suiça), 2,5 µL de cada primer, e 3 µL de água pura (livre de DNAse e RNAse). O procedimento de PCR para os genes (IL-1β, IL-4, TLR4, Claudin-1 e MUC-2) consistiu em realizar um aquecimento da mistura da reação até 95 ^{o}C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 ^{o}C por 15 segundos e 55 ^{o}C, 48 ^{o}C, 50 ^{o}C, 51 ^{o}C e 52 ^{o}C por minuto, para cada primer analisado.

Tabela 3. Primers e sequência utlizados no PCR em tempo real

IL-1β	*Forward*	AGAAGAAGCCTCGCCTGGAT
	Reverse	CCGCAGCAGTTTGGTCAT
IL-4	*Forward*	GAGAGGTTTCCTGCGTCAAG
	Reverse	TGACGCATGTTGAGGAAGAG
TLR4	*Forward*	AGTCTGAAATTGCTGAGCTCAAAT
	Reverse	GCGACGTTAAGCCATGGAAG
Claudin-1	*Forward*	TGGAGGATGACCAGGTGAAGA
	Reverse	CGAGCCACTCTGTTGCCATA
MUC-2	*Forward*	TTCATGATGCCTGCTCTTGTG
	Reverse	CCTGAGCCTTGGTACATTCTTGT
β-Actin	*Forward*	CAACACAGTGCTGTCTGGTGGTA
	Reverse	TCGTACTCCTGCTTGCTGATCC
28-S	*Forward*	GGCGAAGCCAGAGGAAACT
	Reverse	GACGACCGATTTGCACGTC

Sequência de primers obtida de Alizadeh et al. (2016), Shao et al. (2013) e Cox et al. (2010).

A eletroforese em gel foi executada para verificar a especificidade e pureza de cada primer. A curva de dissociação foi analisada em cada placa para confirmar a produção de somente um produto. Os dados da PCR foram obtidos da ABI 7500 *real time* PCR *System* e analisados pelo *Applied Bio Systems Software*. A expressão de mRNA do gene alvo foi mensurada relativamente a expressão gênica dos reguladores endógenos β-actina (ACTB) e 28-S. A concentração relativa de mRNA foi calculada conforme metodologia de Pfaffl (PFAFFL, 2001). Todas as amostras foram analisadas em quadruplicata.

A razão de expressão foi determinada através da seguinte fórmula (onde Ct é o ciclo onde a amplificação da reação de PCR tornou-se linear):

$$\text{Razão de expressão} = \frac{\text{Eficiência gene normalizador}^{\text{Ct gene normalizador}}}{\text{Eficiência do gene de interesse}^{\text{Ct gene de interesse}}}$$

4.5.1. Análise dos dados de expressão gênica

Todos os quatro tratamentos testados foram comparados entre si em dois momentos de coletas (idades). Para análise dos gráficos de barra foi feito teste de ANOVA e, em caso de significância, seguido pela comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05). Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Para a formulação das figuras foi utilizado o *software* GraphPad Prism® 5.

4.6. Análise estatística geral dos dados e modelo estatístico

Para todos os dados coletados nas diferentes análises, inclusive o desempenho dos animais, foi verificada a normalidade, independência dos resíduos dos dados e a homogeneidade de suas variâncias. Todos os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade e em caso de significância as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, utilizando o PROC GLM do SAS (9.3). O modelo estatístico adotado foi:

$Y(ij) = \mu + t(i) + \varepsilon(ij)$, onde:

$Y(ij)$ = variável resposta; μ = média geral; $t(i)$ = efeito fixo do i-ésimo tratamento ($i = 1,...6$); $\varepsilon(ij)$ = erro experimental, NID $(0, \sigma^2)$.

Valores de probabilidade foram considerados significativos quando $P<0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desempenho zootécnico

A pesquisa constante por aditivos zootécnicos em substituição aos antimicrobianos melhoradores de desempenho, em função dos relatos do uso de antimicrobianos em alimentação animal estar relacionado diretamente com a resistência bacteriana em humanos (resistência cruzada), revela cada vez mais à sociedade, por meio das publicações científicas, aditivos alternativos naturais ou que são encontrados facilmente no ambiente em contraste com as tradicionais moléculas químicas dos antimicrobianos. Em um recente documento publicado e intitulado de Estratégia de Resistência a Antimicrobianos 5 anos 2013-2018, Reino Unido (*UK Five Year Antimicrobial Resistance Strategy 2013 to 2018*), relata-se que cada vez mais evidências científicas sugerem que os problemas clínicos relacionados às superbactérias e resistência aos antimicrobianos em humanos são resultados primordialmente do uso de antimicrobianos em humanos, e não em animais.

Além da pressão exercida pela sociedade médica que clama pelo banimento imediato dos antimicrobianos em animais, a sociedade consumidora de produtos de origem animal tem adquirido produtos certificados com a classificação de orgânicos que não contêm nenhuma substância ou molécula química envolvida no seu processo de produção, como exemplo, os antimicrobianos. De acordo com a U.S. Organic Trade Association 2015, a venda de produtos livre de antibióticos nos EUA cresce 20% por ano desde 2011 indicando uma demanda maior por esse nicho de mercado específico no segmento de carnes avícolas.

No presente estudo, verificou-se o potencial de melhora zootécnica de frangos de corte suplementados com diferentes aditivos no período de 1 a 35 dias: antimicrobiano e aditivo alternativo à base de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* suplementada em duas diferentes concentrações, 2 kg/t e 4 kg/t (Tabela 4). Nas duas primeiras semanas, não houve efeito significativo dos diferentes tratamentos avaliados para as variáveis zootécnicas ($P>0,05$).

Tabela 4. Desempenho semanal cumulativo de frangos de corte suplementados com antimicrobiano ou duas inclusões de levedura autolisada *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamentos	PV (g)	GP (g)	CR (g)	CA
		1-7 dias		
Controle Negativo	196	148	152	1,026
Controle Positivo	201	154	157	1,021
CN + 2 kg/t	202	155	155	1,001
CN + 4 kg/t	201	153	154	1,011
CV (%)	3,55	4,43	2,82	2,28
Valor de P	NS	NS	0,10	NS
		1-14 dias		
Controle Negativo	508	460	566	1,230
Controle Positivo	510	463	568	1,226
CN + 2 kg/t	512	464	567	1,220
CN + 4 kg/t	520	472	575	1,218
CV (%)	3,01	3,43	2,64	1,37
Valor de P	NS	NS	NS	NS
		1-21 dias		
Controle Negativo	997	949	1303	1,373 a
Controle Positivo	994	949	1289	1,359 ab
CN + 2 kg/t	1008	960	1291	1,344 b
CN + 4 kg/t	998	950	1300	1,368 ab
CV (%)	3,01	3,43	2,64	1,37
Valor de P	NS	NS	NS	0,02
		1-28 dias		
Controle Negativo	1695	1623	2406	1,482
Controle Positivo	1710	1641	2398	1,461
CN + 2 kg/t	1722	1650	2412	1,461
CN + 4 kg/t	1720	1649	2426	1,471
CV (%)	2,38	2,50	2,13	1,22
Valor de P	NS	NS	NS	0,10
		1-35 dias		
Controle Negativo	2471	2399	3828	1,595 a
Controle Positivo	2492	2417	3789	1,568 b
CN + 2 kg/t	2465	2394	3790	1,583 ab
CN + 4 kg/t	2519	2447	3841	1,569 b
CV (%)	2,20	2,24	1,87	1,11
Valor de P	NS	NS	NS	0,02

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CN: Controle negativo; CV: coeficiente de variação

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de médias (P< 0,05)

O perfil de respostas apresentadas pelos animais tratados com antimicrobiano e levedura autolisada em duas dosagens de inclusão diferiu ao longo das 5 semanas de avaliação das respostas zootécnicas. Aos 21 dias de idade, houve diferença significativa para a conversão alimentar (P<0,05), sendo essa variável melhor para os animais do tratamento suplementado com levedura autolisada na sua menor inclusão (2 kg/t) em relação aos animais

do grupo controle negativo. Esta melhor conversão alimentar resultou do destaque deste tratamento (2 kg/t) quanto ao ganho de peso dos frangos sem aumento no consumo de ração. Essa melhora no ganho de peso das aves, sem comprometer o consumo de ração também já foi verificada no trabalho realizado por Gao et al. (2008). Entretanto, Zhang et al. (2005), ao suplementarem levedura autolisada na inclusão de 5 kg/t para frangos de corte não verificaram nenhuma melhora no desempenho zootécnico dos animais tratatos com levedura em contraste com o controle negativo no período de 1 a 21 dias.

Mais recentemente, Alizadeh et al. (2016), ao suplementarem diferentes formulações de produtos à base de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura autolisada mais uma fonte de nucleotídeos *versus* o controle negativo (sem aditivo) e *versus* controle positivo (11 mg/kg de virginamicina) para frangos de corte no período entre 1 a 21 dias de idade, concluiram que não houve diferenças significativas para ganho de peso entre a levedura autolisada, o controle negativo e o controle positivo.

Ao estudarem o efeito da suplementação de uma fonte comercial de levedura autolisada para frangos de corte, Gao et al. (2008) produziram um desafio vacinal contra a doença de Newcastle aos 7 e 28 dias de idade e verificaram que não houve diferenças significativas para ganho de peso e conversão alimentar no período de 1 a 21 dias, entre as aves do controle negativo (sem antibiótico) e aves suplementadas com 2,5 kg/t de levedura autolisada. Os mesmos autores demonstraram que no período de crescimento (22 a 42 dias) e período acumulado de experimento (1 a 42 dias) houve diferenças significativas, com maior ganho de peso e melhor conversão alimentar verificados nas aves do tratamento à base de levedura autolisada.

A mudança no perfil das respostas zootécnicas promovidas pelos diferentes tratamentos é melhor visualizada na Tabela 5, cujos números remontam às avaliações realizadas nas duas últimas semanas de experimento. Pela visualização das duas últimas semanas, nota-se que, mesmo que o ganho de peso dos animais que receberam 4 kg/t tenha sido estatisticamente semelhante ao controle negativo ($P>0,05$), esta variável ainda assim foi melhorada em 47 g pela suplementação da levedura. A suplementação da levedura com uma maior inclusão também promoveu melhora de 29 g no ganho de peso dos animais ($P>0,05$) em relação ao controle positivo

Em relação à conversão alimentar dos animais, o tratamento com 4 kg/t teve um resultado 2,7% melhor do que o tratamento com 2 kg/t ($P<0,05$) e em relação ao controle negativo a melhora foi de 2,5% ($P<0,05$). A conversão alimentar do tratamento 4 kg/t foi ainda semelhante ao controle positivo ($P>0,05$).

Os aditivos à base de levedura, por serem consituídos de estruturas celulares moduladoras do sistema imune (MOS e β-glucanos) têm seus efeitos no desempenho animal mais pronunciados em situações de intensa ativação imunológica ou de desafios experimentais de prolongada exposição. No contexto deste estudo, as diferenças observadas em relação aos tratamentos à base de levedura entre o período inicial (1-21 dias) e período final (21-35 dias) parecem estar ligadas a uma quantidade disponível e variável de levedura na dieta, que provavelmente para o tratamento 2 kg/t foi insuficiente para promover mudanças nas respostas zootécnicas no período final do estudo. As diferentes respostas zootécnicas nas duas dosagens de levedura autolisada (melhor resposta com 2 kg/t até os 21 dias de idade e melhor resposta no período 21-35 dias com 4 kg/t) justificam a realização de outros estudos para melhor compreender os mecanismos e respostas zootécnicas dos animais ao uso de leveduras autolisadas na alimentação de frangos de corte.

Tabela 5. Desempenho zootécnico de frangos de corte na 4ª e 5ª semanas, suplementados com antimicrobiano e duas inclusões de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamentos	**PV (g)**	**GP (g)**	**CR (g)**	**CA**
	21-35 dias			
Controle Negativo	2470	1450 ab	2525	1,741 ab
Controle Positivo	2492	1468 ab	2500	1,703 bc
CN + 2 kg/t	2465	1433 b	2499	1,744 a
CN + 4 kg/t	2519	1497 a	2541	1,697 c
CV (%)	2,21	2,66	2,09	1,60
Valor de P	NS	0,03	NS	0,04

PV: peso vivo; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar; CN: Controle negativo; CV: coeficiente de variação
Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de médias (P< 0,05)

No período total (1 a 35 dias, Tabela 4) as aves dos tratamentos controle positivo e 4 kg/t de levedura autolisada tiveram melhor conversão alimentar (P <0,05) que as do controle negativo (1,568 e 1,569 vs. 1,595), mesmo considerando que as aves não suplementadas tiveram uma excelente conversão alimentar para frangos machos com cerca de 2,5 kg de peso. Ao final do experimento, a diferença no ganho de peso se aproximou de 50 g/ave a favor do tratamento 4 kg/t em relação ao controle.

Este resultado de semelhança estatística entre o controle positivo e um tratamento à base de levedura também foi verificado por Alizadeh et al. (2016) que estudaram a suplementação de aditivos à base de levedura entre 1 a 21 dias de idade. Apesar de não detectado diferenças significativas para ganho de peso das aves, o tratamento com 4 kg/t de

levedura autolisada proporcionou o maior valor para este componente zootécnico, sendo 2% superior ao controle negativo (48 g), 1,24% superior ao controle positivo (30 g) e 2,21% melhor em relação ao tratamento suplementado com 2 kg/t de levedura autolisada (53 g).

Entretanto, no trabalho de Zhang et al. (2005), não foi encontrada diferença significativa para conversão alimentar entre as aves do tratamento suplementado com 5 kg/t de levedura autolisada e do controle negativo (sem aditivos), porém esses mesmos autores encontram efeito significativo para ganho de peso das aves no período de 1 a 35 dias ($P<0,05$).

5.2. Enumeração bacteriana

Os mecanismos de ação dos aditivos à base de leveduras suplementados aos frangos de corte referem-se principalmente, a alteração e seleção favorável a uma microbiota benéfica do hospedeiro. Os mananoligossacarídeos e β-1,3/1,6 glucanos, presentes na parede celular das leveduras autolisadas, expressam em sua superfície celular o padrão molecular associado à patógeno (PAMP), que quando em contato com o epitélio intestinal, ligam-se as células intestinais pois são reconhecidos estrutralmente pelo hospedeiro através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). A estrutura PAMP também é expressa superficialmente nos peptideoglicanos e lipopolissacarídeos bacterianos.

A levedura autolisada suplementada para frangos de corte compete seletivamente com células bacterianas, pois tanto a levedura como as bactérias compartilham de um mesmo meio para ligação ao epitélio intestinal cujo receptor de ligação é o PAMP. O resultado desta competição no lúmen intestinal é a adesão de polissacarídeos estruturais de leveduras a mucosa que levarão a ativação de respostas pró-inflamatórias de grau leve e benéficas ao animal, e exclusão de bactérias patogênicas, como a *Escherichia coli*, que serão eliminadas juntamente com o conteúdo intestinal sem provocar respostas inflamatórias e predudiciais ao animal.

Os resultados da enumeração bacteriana do conteúdo ileal e cecal de frangos de corte, realizada em duas idades de criação, encontram-se nas Tabelas 6 e 7. Aos 8 dias de idade (Tabela 6), a suplementação de 2 kg/t de levedura autolisada proporcionou maior contagem de bactérias do gênero *Enterococus* no conteúdo ileal, diferentemente para o grupo de animais que recebeu a maior inclusão de leveura autolisada (4 kg/t), nos quais houve diminuição de bactérias deste mesmo gênero ($P<0,05$). A suplementação de levedura autolisada para frangos de corte promoveu diminuição da contagem ileal de bactérias do

gênero *Lactobacillus* em contraste com o grupo controle positivo, que demonstrou favorecer a colonização deste gênero bacteriano (P<0,05).

Tabela 6. Enumeração bacteriana (log_{10} UFC/g) do conteúdo do íleo e ceco de frangos de corte suplementados com antimicrobiano e duas dosagens de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* aos 8 dias de idade

Íleo 8 dias			
Tratamentos	***Enterococus* sp.**	***Escherichia coli***	***Lactobacillus* sp.**
Controle Negativo	8,167 ab	7,917	8,076 ab
Controle Positivo	8,094 ab	7,801	8,488 a
CN + 2 kg/t	8,483 a	8,105	7,785 b
CN + 4 kg/t	7,591 b	7,785	7,757 b
CV (%)	5,41	7,00	4,63
Valor de P	0,04	NS	0,03
Ceco 8 dias			
Controle Negativo	8,834	8,509 ab	8,722
Controle Positivo	8,876	8,714 a	8,375
CN + 2 kg/t	8,482	8,032 b	8,357
CN + 4 kg/t	8,323	8,418 ab	8,566
CV (%)	6,30	4,73	4,97
Valor de P	NS	0,05	NS

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de médias (P<0,05)

Ao trabalharem com a suplementação de MOS (0,1%), bacitracina metileno disalicilato (55 mg/kg) e a associação dos dois aditivos para perus, Sims et al. (2004) verificaram que não houve alterações significativas na enumeração bacteriana dos gêneros *Enterococus* e *Lactobacillus* do conteúdo do cólon das aves suplementadas com quaisquer dos aditivos em relação ao controle negativo. Em relação ao gênero *Lactobacillus*, aos 8 dias de idade, os trabalhos de Torok et al. (2011) e Peinado et al. (2013) demonstram a complexidade do ambiente do microbioma intestinal, visto que bactérias comumente relatadas como benéficas aos animais nem sempre estão associadas aos melhores resultados de desempenho zootécnico dos mesmos. Além da complexidade e do dinamismo existente entre as diferentes populações de micro-organismos do intestino, muitas vezes, as mudanças nas respostas zootécnicas relatadas nos diferentes trabalhos estão intimimamente relacionadas com gêneros bacterianos minoritários, pouco elucidados e que assim demandam maior investigação científica.

Na contagem bacteriana de *Escherichia coli* do contéudo cecal aos 8 dias de idade, a suplementação de 2 kg/t de levedura autolisada proporcionou a menor contagem dessa espécie, sendo significativa (P < 0,05) em relação ao controle positivo. Partindo-se da teoria

que os polissacarídeos da parede celular de levedura (MOS) são capazes de competir com os coliformes pelos sitíos de adesão epitelial pelo fato de ambos expressarem os PAMPs, acredita-se que a presença do MOS no lúmen intestinal atuou com um agente adsorvente e ligante das bácterias Gram-negativas, neste caso, *E. coli*, impedindo também a ligação dessas bactérias ao epitélio intestinal pois estariam contidas pelos polissacarídeos da levedura.

A maior concentração de bactérias *E. coli* no conteúdo cecal de animais que receberam suplementação de bacitracina de zinco é explicada pela ação limitada deste grupo de antimicrobianos que atuam através da inibição da formação de proteínas e peptioglicano bacterianos aos gêneros Gram-positivos de bactérias. Contrariando a não sensibilidade de bactérias Gram-negativas à bacitracina de zinco, ao suplementarem bacitracina de zinco (20 mg/kg), salinomicina (60 mg/kg) e a associação de ambos antimicrobianos, Engberg et al. (2000) demonstraram que a inclusão de bacitracina de zinco na dieta de frangos de corte proporcionou diminuição da contagem de *Escherichia coli* do conteúdo ileal e retal de frangos de corte amostrados aos 35 dias de idade. Os autores Sims et al. (2004) não encontram diferenças sinificativas para a enumeração desta espécie. O modo de ação dos antimicrobianos está intimamente relacionado com o percentual de inclusão na dieta para os animais e a existência de fato de um desafio experimental capaz de interfirir com a microbiota comensal, criando assim um ambiente favorável à proliferação de gêneros bacterianos patogênicos passivos de sofrerem ação significativa dos antimicrobianos.

Os resultados da enumeração bacteriana aos 21 dias de idade encontram-se na Tabela 7. A suplementação do antimicrobiano melhorador de desempenho (bacitracina de zinco) proporcionou diminuição da contagem de bactérias do gênero *Enterococus* ($P<0,05$) no conteúdo ileal em relação aos animais do grupo controle negativo. Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo cecal dos animais amostrados aos 21 dias. A microbiota estabelecida em animais mais velhos é mais estável quando comparada à microbiota de animais mais novos e assim, é mais difícil de sofrer ação de diferentes tratamentos (RANTALA; NURMI, 1973).

Tabela 7. Enumeração bacteriana (log_{10} UFC/g) do conteúdo do íleo e ceco de frangos de corte suplementados com antimicrobiano e duas dosagens de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* aos 21 dias de idade

Íleo 21 dias			
Tratamentos	***Enterococus* sp.**	***Escherichia coli***	***Lactobacillus* sp.**
Controle Negativo	8,521a	8,267	8,338
Controle Positivo	8,021b	7,639	7,854
CN + 2 kg/t	8,055 ab	7,946	8,292
CN + 4 kg/t	8,212 ab	7,904	8,159
CV (%)	3,48	5,73	5,07
Valor de P	0,03	NS	0,36
Ceco 21 dias			
Controle Negativo	9,671	9,664	9,641
Controle Positivo	9,666	9,543	9,719
CN + 2 kg/t	9,442	9,441	9,442
CN + 4 kg/t	9,480	9,392	9,470
CV (%)	4,60	5,42	6,22
Valor de P	NS	NS	NS

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de médias ($P<0,05$)

5.3. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo como ferramenta para avaliar as subpopulações de linfócitos de aves é altamente sensível, e os anticorpos disponíveis comercialmente são bastante específicos, tornando a precisão da avaliação da imunocompetência superior a outros métodos (BRIDLE et al., 2006; FAIR et al., 2008). A fenotipagem das subpopulações de leucócitos no sangue é feita através de uma identificação das células usando-se anticorpos ligados a fluorocromos como sondas de proteínas expressas pelas células. Linfócitos expressam diferentes arranjos de moléculas em sua superfície, muitas das quais refletem diferentes estágios em suas diferenciações linhagem-específicas ou diferentes estados de ativação-inativação. Ao utilizar combinações de diferentes anticorpos é possível discriminar as populações de diferentes leucócitos, cada qual com diferentes funções no sistema imunológico (FAIR et al., 2008).

Nas Tabelas 8 e 9 encontram-se os resultados da fenotipagem por citometria de fluxo realizados 24 horas após a vacinação contra coccidiose e aos 21 dias de idade dos frangos de corte submetidos aos quatro distintos tratamentos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas durante os dois períodos da criação. Aos 8 dias de idade, apenas tendências foram observadas ($P>0,05$) no perfil dos linfócitos B (Bu^+) e células T auxiliares ($CD4^+TCRv\beta1^-$) (Figuras 3 e 4, reespectivamente).

Tabela 8. Efeito da suplementação de aditivo antimicrobiano melhorador de desemepenho e duas inclusões de levedura autolisada para frangos de corte, aos 8 dias de idade, sobre o perfil de subpopulações de linfócitos do sangue

Antígeno de superfície[1]	Percentual médio de células positivas ± desvio padrão				
	Controle Negativo	Controle Positivo	CN + 2 kg/t L.A[2]	CN + 4 kg/t L.A	Valor de P
$CD4^{+}TCRv\beta1^{-}$	1,534 ± 0,34	1,408 ± 0,21	1,321 ± 0,26	1,236 ± 0,08	0,16
$CD4^{+}TCRv\beta1^{+}$	0,745 ± 0,20	0,660 ± 0,08	0,598 ± 0,14	0,745 ± 0,12	NS
$CD4^{-}TCRv\beta1^{+}$	2,118 ± 0,87	1,948 ± 0,51	1,670 ± 0,50	2,032 ± 0,46	NS
$CD8^{-}CD28^{+}$	7,833 ± 4,01	5,769 ± 3,65	6,137 ± 2,70	6,764 ± 1,90	NS
$CD8^{+}CD28^{+}$	4,300 ± 2,47	4,282 ± 2,71	2,952 ± 2,56	4,600 ± 1,80	NS
$CD8^{+}CD28^{-}$	-0,380 ± 0,29	-0,216 ± 0,20	-0,496 ± 0,34	-0,349 ± 0,34	NS
$Kul^{+}MHCII^{+}$	2,730 ± 1,19	2,852 ± 0,55	2,048 ± 0,58	2,870 ± 1,09	NS
$Kul^{-}MHCII^{+}$	1,173 ± 0,48	1,194 ± 0,38	1,160 ± 0,51	1,262 ± 0,41	NS
$Kul^{+}MHCII^{+}$	2,730 ± 1,19	2,852 ± 0,55	2,048 ± 0,58	2,870 ± 1,09	NS
Bu^{+}	5,110 ± 1,96	4,028 ± 1,46	3,120 ± 1,10	4,825 ± 1,49	0,12

[1]Especificação dos antígenos de superfície presente na Tabela 2
[2] Levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae*

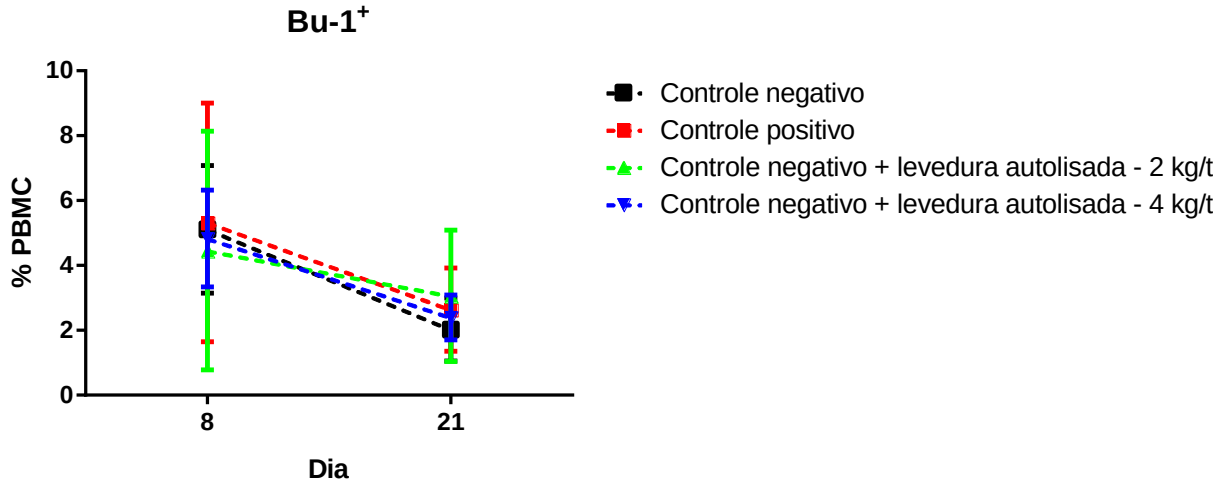

Figura 3. Porcentagem circulante de linfócitos B. O eixo vertical apresenta porcentagem em relação às células mononucleares no sangue periférico (PBMC, da sigla em inglês) e o eixo horizontal, o momento das coletas

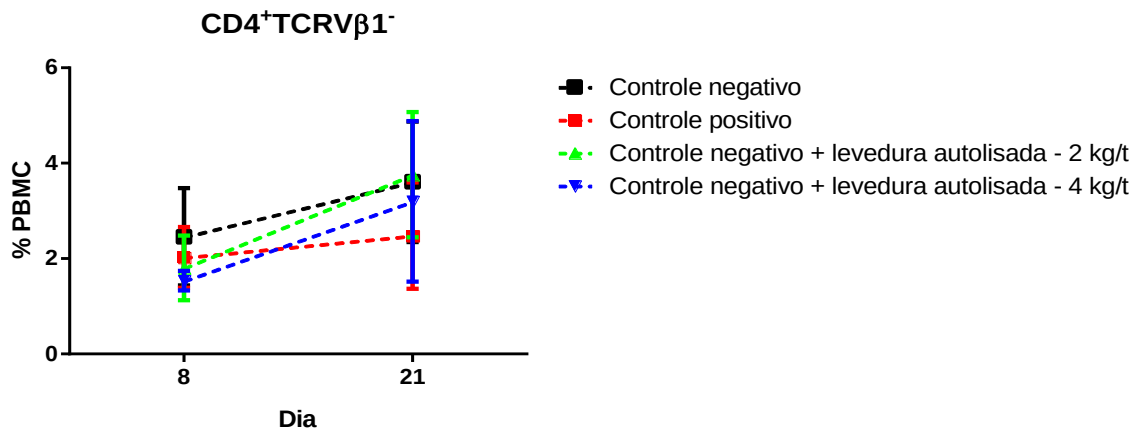

Figura 4. Porcentagem circulante de linfócitos T auxiliares. O eixo vertical apresenta porcentagem em relação às células mononucleares no sangue periférico (PBMC, da sigla em inglês) e o eixo horizontal, o momento das coletas

A suplementação de diferentes aditivos, seja o antimicrobiano melhorador de desempenho (controle positivo), sejam as duas dosagens de levedura autolisada não foram capazes de modificar significativamente a proporção das diferentes subpopulações de linfócitos. A verificação do efeito provocado pela aplicação da vacina contra coccidiose pode ser verificada nos animais do grupo controle negativo que não receberam nenhum tipo de aditivo zootécnico. Na maioria dos grupos de linfócitos analisados, tais como linfócitos T auxiliares ($CD4^{+}TCRv\beta1^{-}$), linfócitos T citotóxicos de mucosas ($CD4^{-}TCRv\beta1^{+}$), linfócitos T auxiliares não ativados ($CD8^{-}CD28^{+}$) e linfócitos B (Bu^{+}), o sangue proveniente dos animais do controle negativo foi o que apresentou maior contagem para esses tipos de células.

Logo após o início da infecção por *Eimeira spp*., os linfócitos B intestinais começam a produzir anticorpos específicos ao parasita, apesar da ação deste grupo celular na defesa do organismo frente à coccidiose ser frequentemente alvo de controvérsias. Entretanto, evidências de experimentos sugerem que a imunidade celular mediada por linfócitos T, predominantemente regulada por linfócitos localizados no epitélio e na lâmina própria intestinal, representa o principal componente de imunidade à coccidiose aviária (LILLEHOJ; MIN; DALLOUL, 2004).

As aves apresentam uma alta proporção de células duplo positivas circulantes ($CD4^{+}$ $CD8^{+}$) que, embora comuns em suínos, são extremamente raras na maioria dos mamíferos (SAALMULLER; WERNER; FACHINGER, 2002). Existem indícios de que estas células sejam um fenótipo ativado de células citotóxicas, e que estariam majoritariamente destinadas a migrar para o tecido intestinal, onde agiriam contra infecções locais (SULLIVAN et al.,

2001; GANGADHARAM; CHEROUTRE, 2004). Neste estudo, o fato de alguns subtipos de linfócitos circulantes estarem em maiores quantidades no sangue periférico dos animais que não receberam aditivos (controle negativo) pode significar que este grupo de indivíduos não mobilizou rapidamente os linfócitos para o epitélio intestinal onde ocorreu inflamação local pela proliferação do oocisto ingerido pela vacina. Em contrapartida, os demais tratamentos proporcionaram uma quantidade menor para esse mesmo grupo de células no sangue, podendo significar maior aporte e direcionamento de linfócitos circulantes do sangue para o tecido epitelial intestinal.

É importante salientar que o ciclo da coccidiose aviária ocorre geralmente em 14 dias no máximo, quando termina com a excreção do oocisto não esporulado no ambiente. Após administrar a vacina viva contendo oocistos de *Eimeria sp*. neste experimento, os oocistos contidos na vacina são absorvidos pela mucosa ocular e posteriomente são absorvidos pela mucosa buco-faríngea onde seguem pelo trato gastrointestinal. Os esporocistos são liberados do oocisto através da estimulação mecânica da moela e a ação enzimática do proventrículo libera os esporozoítos dos esporocistos. Os esporozoítos levam cerca de 2 a 4 horas para iniciar as primeiras multiplicações e penetrações nas células intestinais (PARRY et al., 1992; ALLEN, FETTERER, 2002). Sendo assim, os primeiros sinais de inflamações e respostas locais intestinais devidas à reação vacinal ocorrem com a entrada dos esporozoítos no interior das células intestinais e posteriormente, sucede-se uma série de divisões celulares e migrações dentro do epitélio até a formação do oocisto não esporulado.

Aos 21 dias (Tabela 9) houve tendência ($P>0,05$) nas células linfócitos T citotóxicos ativados ($CD8^{+}CD28^{-}$) (Figura 4), sendo que o sangue do grupo dos animais do controle negativo foi o que apresentou maior contagem dessas células no sangue circulante, em contraste com os animais que foram suplementados com a maior inclusão de levedura de *Saccharomyces cerevisiae*. Acredita-se que os componentes imunoestimulantes da levedura, tais como MOS e β-glucanos, possam ter contribuído para uma maior mobilização de células T citotóxicos ativados para o ambiente intestinal que, transcorridos aproximadamente 14 dias após a inoculação experimental, serão os principais grupos celulares envolvidos na fase final do ciclo da coccidiose caracterizada por sucessivas divisões celulares e formação do oocisto não esporulado (fase gametogênica). Os linfócitos T citotóxicos ativados são terminalmente ativados, sendo estritamente específicas para o antígeno alvo, sendo também incapazes de se replicarem (NABESHIMA et al., 2002; PAWELEC et al., 2004).

Ao realizar a mesma análise feita aos 8 dias no perfil dos leucócitos, as células T auxiliares de mucosa ($CD4^{+}TCRv\beta1^{+}$), células T citotóxicos de mucosa ($CD4^{-}TCRv\beta1^{+}$), T

auxiliares não ativados ($CD8^-CD28^+$) e T citotóxicos ativados ($CD8^+CD28^-$) apresentaram as maiores contagens no sangue periférico dos animais do controle negativo. Em relação à primeira coleta e de forma análoga, o grupo de células efetoras em resposta ao cessamento da reação vacinal apresentou seu perfil de contagem de forma distinta em comparação ao controle negativo e dos demais tratamentos constituidos de aditivos.

Tabela 9. Efeito da suplementação de aditivo antimicrobiano melhorador de desemepenho e duas inclusões de levedura autolisada para frangos de corte, aos 21 dias de idade, sobre o perfil de subpopulações de linfócitos do sangue

Antígeno de superfície[1]	Percentual médio de células positivas ± desvio padrão				
	Controle Negativo	Controle Positivo	CN + 2 kg/t L.A[2]	CN + 4 kg/t L.A	Valor de P
$CD4^+TCRv\beta1^-$	1,873 ± 0,34	1,538 ± 0,37	1,910 ± 0,35	1,717 ± 0,54	NS
$CD4^+TCRv\beta1^+$	0,935 ± 0,16	0,833 ± 0,16	0,881 ± 0,10	0,841 ± 0,14	NS
$CD4^-TCRv\beta1^+$	3,555 ± 1,22	3,020 ± 1,21	3,328 ± 1,18	2,700 ± 0,95	NS
$CD8^-CD28^+$	15,384 ± 2,86	11,846 ± 3,75	13,820 ± 1,83	12,936 ± 4,79	NS
$CD8^+CD28^+$	2,533 ± 1,07	2,325 ± 1,16	2,592 ± 0,81	2,005 ± 0,67	NS
$CD8^+CD28^-$	0,349 ± 0,20	0,280 ± 0,16	0,197 ± 0,24	0,128 ± 0,15	0,19
Kul^+MHCII^+	3,228 ± 0,76	3,757 ± 2,14	3,845 ± 1,69	3,884 ± 1,79	NS
Kul^-MHCII^+	3,716 ± 1,63	3,087 ± 1,78	4,478 ± 2,02	3,105 ± 1,19	NS
Kul^+MHCII^+	3,228 ± 0,76	3,757 ± 2,14	3,845 ± 1,69	3,884 ± 1,79	NS
Bu^+	2,025 ± 0,97	2,634 ± 1,28	2,545 ± 1,63	2,396 ± 0,69	NS

[1]Especificação dos antígenos de superfície presente na Tabela 2
[2] Levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae*

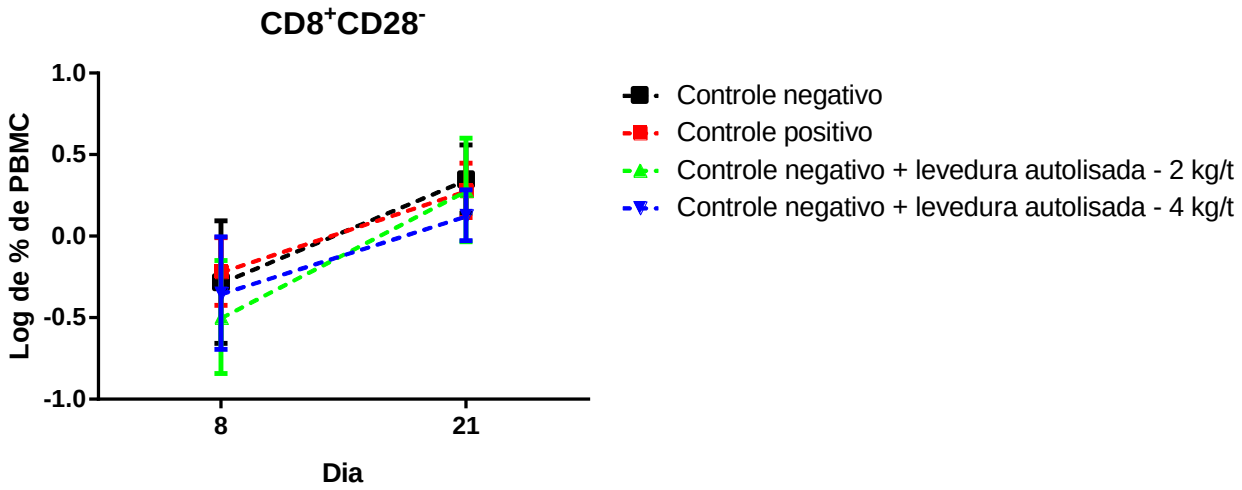

Figura 5. Porcentagem circulante de linfócitos T citotóxicos ativados. O eixo vertical apresenta porcentagem em relação às células mononucleares no sangue periférico (PBMC, da sigla em inglês) e o eixo horizontal, o momento das coletas

Similarmente a este estudo, Shanmugasundaram et al. (2012) ao estudarem o efeito da suplementação de prebiótico à base de parede celular de levedura para frangos de corte, sem induzirem os animais a um desafio experimental ou vacinal, verificaram que não houve diferenças significativas na contagem de linfócitos T $CD4^+$ (auxiliares) e T $CD8^+$ (citotóxicos) nas tonsilas cecais e baço dos animais do controle negativo (sem aditivos) e entre os dois tratamentos que receberam 0,1% e 0,2% de prebiótico de levedura.

Ao suplementarem levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* nas inclusões 0,25% e 0,5% para frangos de corte infectados experimentalmente com *Eimeria tenella*, Gao et al. (2009) observaram efeitos positivos da suplementação de levedura nos parâmetros imunológicos, visto que a suplementação deste aditivo proporcionou uma maior contagem de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ no sangue periférico e no baço, assim como na contagem de linfócitos intraepiteliais e IgA (Imunoglobulina A) na tonsila cecal. Em relação à eimeriose aviária, a imunidade do hospedeiro é espécie específica, ou seja, frangos de corte imunes a uma espécie de *Eimeria* são sensíveis às outras espécies. Além disso, as infecções por *Eimeria* spp. demonstram variar na especificidade do tecido e órgão do hospedeiro alvo (LILLEHOJ; MIN; DALLOUL, 2004), o que pode implicar em padrões e intensidades de respostas imunes distintas cujos grupos celulares ativados estão ligados à sensibilidade e capacidade imune do hospedeiro, e à patogenicidade das *Eimeria* spp.

5.4. Expressão gênica intestinal

Alguns estudos confirmaram que produtos derivados de leveduras são capazes de estimular as respostas imunes inatas de frangos de corte por meio da modulação da expressão gênica intestinal dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e por meio de citocinas (YITBAREK et al., 2013). Entretanto, outros autores relatam que os aditivos à base de leveduras não foram capazes de incitar respostas inatas do hospedeiro associadas à expressão gênica intestinal de frangos de corte submetidos a condição sem desafio experimental (COX et al., 2010; MUNYAKA et al., 2012). No presente estudo, para ilustrar os efeitos dos diferentes aditivos sobre os PRRs cujas moléculas ligantes expressam os padrões moleculares associados à patogenos (PAMP), presentes, por exemplo, na célula da *Escherichia coli*, foram mensurados a expressão gênica de TLR4 no íleo de frangos de corte (Figura 5).

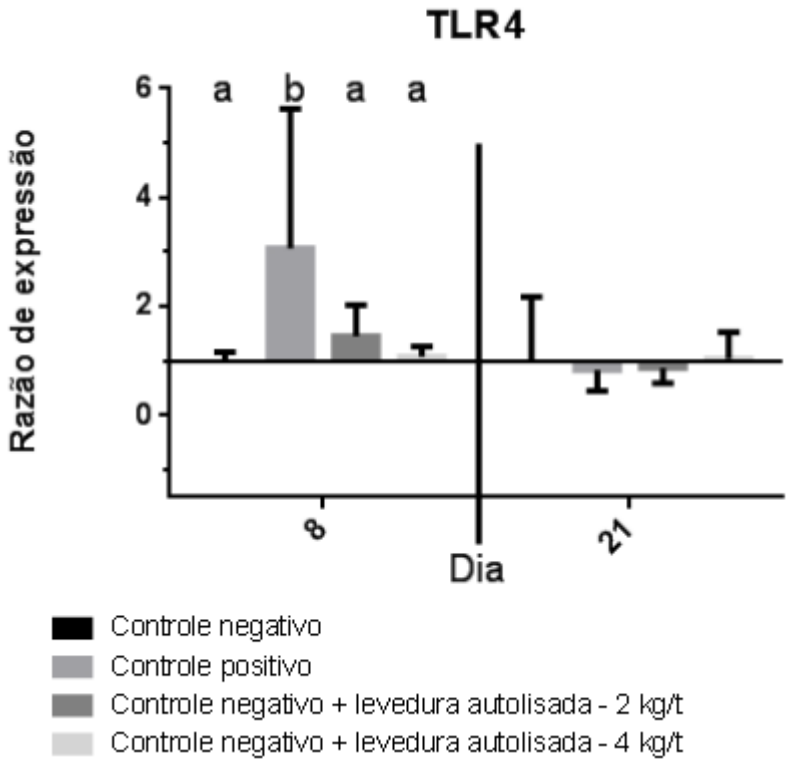

Figura 6. Razão de expressão de TLR4 em referência ao grupo controle negativo nas duas coletas experimentais. O eixo vertical representa o incremento da expressão relativo à média do grupo controle negativo e o eixo horizontal, o momento das coletas

No presente estudo, a suplementação do antimicrombiano melhorador de desempenho (bacitracina de zinco) promoveu aumento significativo (P=0,04) em três vezes da expressão de TLR4 no íleo de frangos de corte analisados aos 8 dias de idade, sem apresentar efeitos significativos aos 21 dias de idade. Os aditivos à base de leveduras promoveram efeito contrário ao antimicrobiano, porém, sem efeito estatístico significativo (P>0,05). Ao compararem a expressão gênica no jejuno de frangos de corte suplementados com bacitracina metileno disalicilato (BMD) *versus* parede de celular de levedura, Brennan et al. (2013) verificaram que ambos os aditivos foram capazes de aumentar a expressão gênica de TLR3 em duas vezes e meia em relação aos frangos de corte alimentados com uma dieta basal de milho e farelo de soja (controle negativo).

Os autores Munyaka et al. (2012) avaliaram a suplementação de três dietas para frangos de corte: monensina (controle), BMD, monensina mais mananoligossacarídeos (MOS) de levedura, e verificaram que aos 42 dias de idade a expressão no íleo de TLR4 foi reduzida nos animais que receberam aditivo à base de levedura (P<0,05) em relação ao controle, não sendo verificado efeito nos animais que receberam BMD na dieta. A diminuição

na expressão gênica de TLR4 no íleo pode ser sugestiva como indicador de redução da contagem de bácterias Gram-negativas, como *Escherichia coli* no íleo, fato que não pôde ser comprovado no trabalhos daqueles autores. Neste estudo, mesmo sem ter apresentado diferenças significativas, a contagem de *E. coli* no íleo de frangos de corte aos 8 dias de idade (Tabela 6), a contagem desta espécie foi numericamente inferior nos animais do tratamento que receberam 4 kg/t de levedura autolisada, os quais também a expressão gênica de TLR4 diminuída no íleo sem apresentar significância estatística em relação ao controle negativo (P>0,05).

Os resultados da expressão gênica de MUC-2 podem ser encontrados na Figura 6. Não foram encontradas diferenças significativas nos diferentes momentos de coleta (P>0,05). Apenas uma tendência foi verificada aos 8 dias de idade (P=0,09) onde o tratamento com a maior inclusão de levedura autolisada proporcionou aumento da expressão de MUC-2 no íleo de frangos de corte em relação ao controle negativo. O efeito positivo da estimulação de produtos à base de leveduras sobre os genes reguladores da produção de mucina foi verificado por Cox et al. (2010), que encontraram efeito significativo dos β-glucanos ao aumentarem a expressão do gene MUC-2 do jejuno de frangos de corte não desafiados experimentalmente, cuja situação experimental é semelhante ao presente estudo.

Por representar uma das primeiras respostas dos sistema imune inato do animal, o aumento da produção de mucina ou pelo fato da expressão de seus genes reguladores estarem aumentados, pode-se dizer que nas situações acima, o organismo apresentaria uma vantagem e maior competência imunológica para combater antígenos presentes do lúmen intestinal pois haveria uma maior quantidade de muco protetor do que atuaria impedindo adesão desses antígenos ao epitélio, preservando a sua integridade.

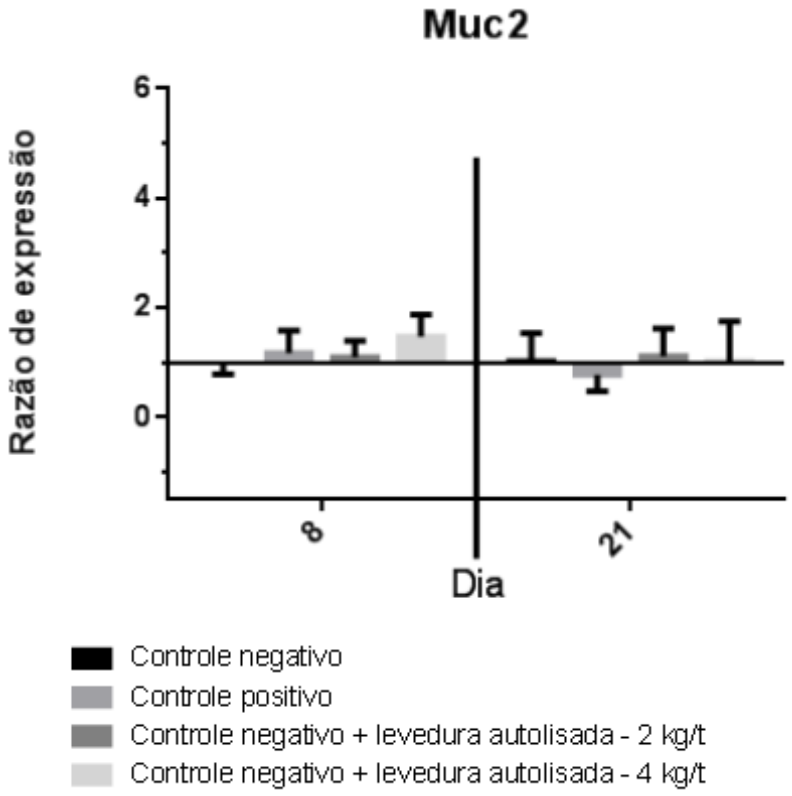

Figura 7. Razão de expressão de MUC-2 em referência ao grupo controle negativo nas duas coletas experimentais. O eixo vertical representa o incremento da expressão relativo à média do grupo controle negativo e o eixo horizontal, o momento das coletas

A expressão gênica ileal de Claudin-1 é apresentada na Figura 8. A claudina é a primeira junção celular vista a partir do lúmen intestinal, e juntamente com o muco, representa uma importante barreira de proteção a infecções e ao próprio extravasamento do conteúdo intestinal. No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas na expressão desse gene regulador da claudina (P>0,05).

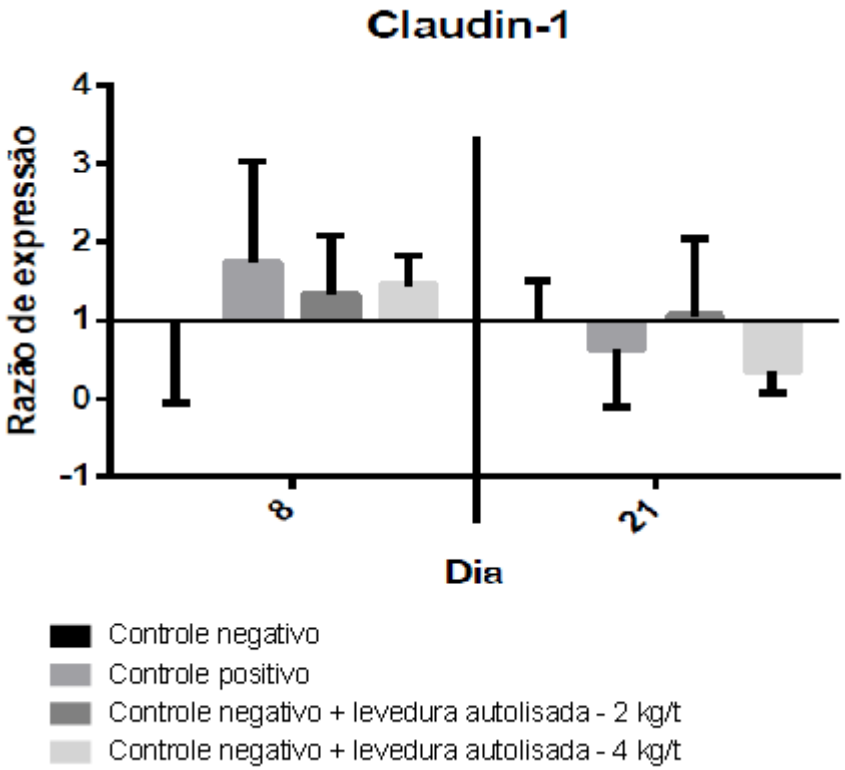

Figura 8. Razão de expressão de Claudin-1 em referência ao grupo controle negativo nas duas coletas experimentais. O eixo vertical representa o incremento da expressão relativo à média do grupo controle negativo e o eixo horizontal, o momento das coletas

Para elucidar os mecanismos moleculares dos β-1,3/1,6 glucanos na prevenção da perda epitelial de células do intestino de frangos de corte infectados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, Shao et al. (2013) observaram alterações na expressão de claudina-1, claudina-4 e ocludina a nível de RNAm. Os autores mostraram que o desafio por S*almonella* Typhimurium promoveu a diminuição da expressão de claudina-1, claudina-4 e ocludina RNAm no jejuno de frangos de corte. Entretanto, a suplementação com β-glucanos promoveu o aumento da expressão de RNAm de claudina-1 e ocludina. Os resultados sugerem que a regulação de claudina-1 e ocludina mediada pelos β-glucanos pode estar envolvida na recuperação da permeabilidade dos enterócitos induzido pelo desafio de *Salmonella* Typhimurium.

As citocinas estão presentes em praticamente todos os processos biológicos dos animais, desde o desenvolvimento embrionário, diferenciação de células-tronco, respostas não específicas a infecção, respostas específicas a antígenos, eficácia de vacinação, rejeição de transplantes, mudanças cognitivas até a progressão de processos degenerativos do envelhecimento. No campo da resposta imune, elas podem ter função pró ou anti-

inflamatórias e diferenciar a resposta de linfócitos em Th1 (resposta citotóxica mediada por células para patógenos intracelulares), Th2 (resposta humoral) ou Th17 (relacionada a autoimunidade e patógenos extracelulares) (STEINMAN, 2007; MCINNES, 2012). As citocinas podem ser classificadas da seguinte maneira (Tabela 10):

Tabela 10. Classificação das citocinas, via de ativação de linfócitos T auxliares (T *helper*) e característica no processo inflamatório

Citocina	Th	Ação
IL-4	Th2	Anti-inflamatória
IL-1β	Th2/Th17	Pró-inflamatória

O tratamento controle positivo, caracterizado pela suplementação do antimicrobiano, além de induzir a transcrição de TLR-4 (Figura 6) aos 8 dias promoveu, aos 21 dias de idade, aumento na expressão gênica de IL-1β ($P<0,05$), (Figura 9), apresentando também tendência de aumento para IL-4 ($P=0,06$) (Figura 10). O tratamento com a maior inclusão de levedura autolisada, por sua vez, propiciou tendência de aumentar a expressão de Mucina-2 ($P=0,09$) (Figura 7) aos 8 dias e aumentou significativamente a expressão de IL-1β ($P<0,05$) (Figura 9) aos 21 dias. Portanto, ambos os tratamentos, controle positivo e tratamento com maior inclusão de levedura, coincidiram em relação à expressão de IL-1β aos 21 dias.

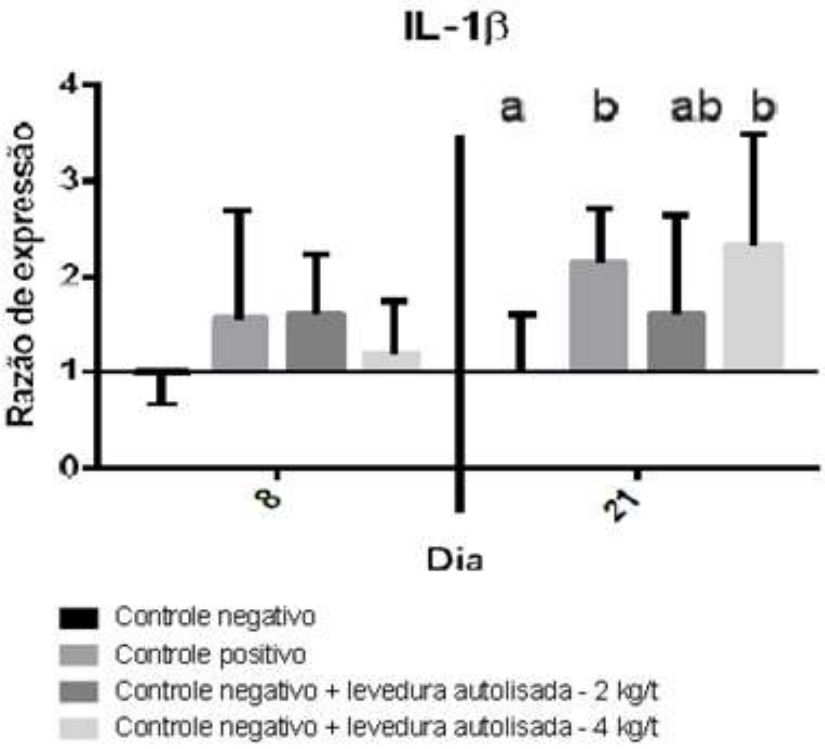

Figura 9. Razão de expressão de IL-1β em referência ao grupo controle negativo nas duas coletas experimentais. O eixo vertical representa o incremento da expressão relativo à média do grupo controle negativo e o eixo horizontal, o momento das coletas

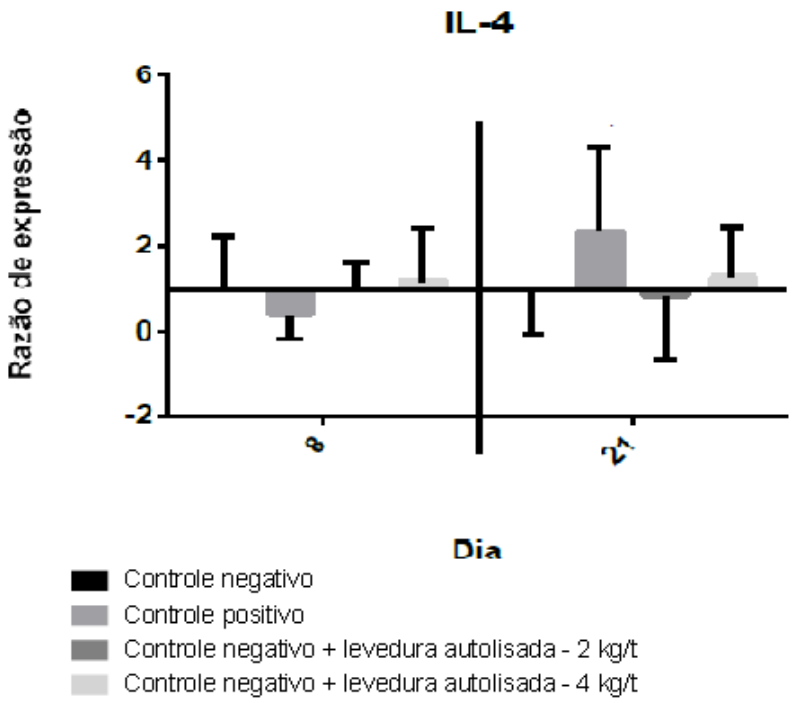

Figura 10. Razão de expressão de IL-4 em referência ao grupo controle negativo nas duas coletas experimentais. O eixo vertical representa o incremento da expressão relativo à média do grupo controle negativo e o eixo horizontal, o momento das coletas

O aumento da expressão de IL-1β em ambos os tratamentos aos 21 dias de idade é um importante sinalizador de que os animais submetidos a esses tratamentos estão mobilizando e recrutando mais células de defesa para o ambiente intestinal, que é alvo de agressão e multiplicação da *Eimeira sp.* A contagem de células de defesa foi realizada no sangue periférico dos animais através da citometria de fluxo que nesse estudo não analisou células de defesas localizadas no intestino. Da mesma forma, aos 21 dias de idade, presume-se pela citometria de fluxo que a IL-1β atuou na mobilização para o intestino de linfócitos T citóxicos de mucosa, importantes para controle da resposta inflamatória intestinal provocada pela vacina, o que justificado pelo menor número dessas células contadas no sangue periférico dos animais que receberam 4 kg/t de levedura autolisada (Figura 5).

Embora TLR-4 possa interagir com resíduos de manoses de glicoproteínas de leveduras, no presente trabalho a transcrição deste receptor não foi regulada pelos tratamentos com levedura autolisada (NETEA et al., 2006). Contudo, o reconhecimento de mananas presentes na da parede celular de levedura leva a estimulação da imunidade via Th17, que é mediada fortemente por heterófilos, algo que ocorreu no presente estudo, quando avaliado através da produção de IL-1β para o tratamento suplementado com 4 kg/t de levedura

autolisada (SAIJO et al., 2010; IKEDA et al., 2014). A adição de antibiótico ao desafio vacinal também modulou a imunidade. Embora o antibiótico tenha aumentado a transcrição de TLR-4 aos 8 dias, aos 21 dias as citocinas produzidas indicam um direcionamento da imunidade para o braço Th2, mais dependente de mastócitos, eosinófilos, IgE e da produção de anticorpos. Mastócitos produzem quantidades elevadas de IL-1β na presença de IL-4, por exemplo (LORENTZ; BISCHOFF, 2001).

A imunidade contra eimerias parece ser bastante dependente do braço celular da resposta (LILLEHOJ; LILLEHOJ, 2000). Especula-se que a resposta de heterófilos seja relevante neste contexto (PEREZ-CARBAJAL et al., 2010). Após infecção, há aumento na expressão de citocinas do braço Th17, como a IL-17 e a IL-1β. IL-4 não é alterado nesta situação (HONG et al., 2006).

A linhagem de linfócitos Th17 é responsável por prover ao indivíduo um mecanismo único de proteção contra bactérias e patógenos fúngicos pela indução da produção de citocinas inflamatórias e outras proteínas. Esses linfócitos auxiliares T também são responsáveis por induzirem a granulopoiese, ou o recrutamento de neutrófilos (heterófilos nas aves), sendo esses mecanismos importantes na resposta inata do hospedeiro (SCHWARZENBERGER et al., 1998).

Ao trabalharem experimentalmente com a suplementação de parede celular de levedura para frangos de corte, Shanmugasundaram et al. (2012) observaram que a adição de parede celular às dietas promoveu a diminuição da expressão de IL-1β nas tonsilas cecais dos animais, em relação ao grupo que não recebeu nenhum aditivo (P=0,13) aos 21 dias de idade, sendo esta diferença ainda mais significativa aos 35 dias de idade (P<0,01). Além disso, esses autores verificaram que a suplementação de parede celular promoveu aumento da expressão de interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória que estimula a inflamação pela via de linfócitos T reguladores (Treg), o que foi comprovado também pelo aumento na sua contagem no sangue dos animais que receberam tratamento à base de levedura.

No trabalho de Alizadeh et al. (2016) ao suplementaram produtos à base de levedura e antimicrobiano para frangos de corte, os autores verificaram que ambos os aditivos promoveram dimiuição da expressão gênica no baço de interferon-γ (IFN-γ) e IL-12 que são citocinas pró- inflamatórias. O IFN-γ participa na ativação de macrófagos e geralmente está envolvido na diferenciação de células T inativas em células Th1 (SCHOENBORN; WILSON, 2007); a IL-12 estimula a produção de IFN-γ e redução da mediação de IL-4 na supressão de IFN-γ (HSIEH et al., 1993). Além de promoverem a supressão de citocinas pró-inflamatórias, o antimicrobiano e os produtos à base de levedura também promoveram a diminuição da

expressão de IL-4 e IL-10 no baço de frangos de corte. Por se tratar de uma citocina anti-inflamatória, a IL-4 atua como mediador na diferenciação de linfócitos T inativos em células efetoras Th2 e atua por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN-γ e IL-12 (LUZINA et al.,2012); a IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória, reguladora e é fundamentalmente produzida por monócitos, Th2 e células Treg e limita a exacerbação da inflamação pela diminuição de citocinas Th1 (IFN-γ) (O'GARRA; VIEIRA, 2007).

A diminuição da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no baço de frangos de corte pode ser explicada pelo balanço e regulação de feitos cruzados entre citocinas Th1 e Th2 (KIDD, 2003). Além de Alizadeh et al. (2016), outros autores também constataram que os produtos de levedura são capazes atuar diminuindo a expressão de citocinas Th1 e Th2 na ausência de desafio experimental (COX et al., 2010; MUNYAKA at al., 2012).

6. CONCLUSÃO

A suplementação do aditivo de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* na inclusão de 4 kg/t nas dietas para frangos de corte promoveu melhora no desempenho zootécnico das aves verificada pela melhor conversão alimentar em relação às não suplementadas durante o período cumulativo de estudo. A resposta à suplementação de 55 ppm de bacitracina de zinco foi semelhante à obtida com levedura. Em termos de persistência do efeito do uso do aditivo à base de levedura, a inclusão de 2 kg/t de levedura nas dietas promoveu as melhores respostas zootécnicas na fase inicial da criação (1-21 dias) e a inclusão de 4 kg/t de levedura, no período final (21-35 dias). Em relação à resposta imune, o antimicrobiano e os dois tratamentos à base de levedura modularam de forma distinta a enumeração dos grupos bacterianos estudados, sem provocarem mudanças significativas na contagem de células imunológicas no sangue periférico dos animais. Ainda sobre a modulação do sistema imune, o aumento na expressão de IL-1β e IL-4 em resposta ao antimicrobiano e o aumento na expressão de IL-1β com 4 kg/t de levedura autolisada indicam que os dois tratamentos têm vias de ativação do sistema imune distintas.

REFERÊNCIAS

ABEL, G.; CZOP, J.K. Stimulation of human monocyte β-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1. **International Journal of Immunopharmacology**, Amesterdam, v. 14, n. 8, p. 1363-1373, 1992.

ADJEI, A.A.; JONES, J.T.; ENRIQUEZ, F.J.; YAMAMOTO, S. Dietary nucleosides and nucleotides reduce Cryptosporidum parvum infection in dexamethasone immunosuppresed adult mice. **Experimental Parasitology**, Amesterdam, v. 92, n. 3, p. 199-208, 1999.

ALIZADEH, M.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C.; ROGIEWICZ, A.; PATTERSON, R.; SLOMINSKI, B.A. Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance, gut morphology, and gene expression of pattern recognition receptors and cytokines in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 507-517, 2016.

ALLEN, P.C.; FETTERER. R.H. Recent advances in biology and immunobiology of Eimeria species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 1, p. 58–65, 2002.

ARSTILA, T.P.; VAINIO, O.; LASSILA, O. Central role of CD4+ T cells in avian immune response. **Poultry Science**, Champaign, v. 73, n. 7, p. 1019–1026, 1994.

BAR-SHIRA, E.; FRIEDMAN, A. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Raanana, v. 60, n. 2, p. 42-50, 2005.

BEUM, P.V.; BASMA, H.; BASTOLA, D.R.; CHENG, P.W Mucin biosynthesis: Upregulation of core 2 beta 1,6 *N*-acetylglucosaminyltransferase by retinoic acid and Th2 cytokines in a human airway epithelial cell line. **American Journal of Physioogy. Lung Cellular Molecular Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 1, p. 116–124, 2005.

BRENNAN, K.M.; GRAUGNARD, D.E.; XIAO, R.; SPRY, M.L.; PIERCE, J.L.; LUMPKINS, B.; MATHIS, G.F. Comparison of gene expression profiles of the jejunum of broilers supplemented with a yeast cell wall-derived mannan oligosaccharide versus bacitractin methylene disalicylate, **British Poultry Science**, London, v. 54, n. 2, p. 238-246, 2013.

BRIDLE, B.W.; JULIAN, R.; SHEWEN, P.E.; VAILLANCOURT, J.P.; KAUSHIK, A.K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ontario, v. 70, n. 3, p.183-190, 2006.

BRÜMMER, M.; JANSEN VAN RENSBURG, C.; MORAN, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall products: The effects on gut morphology and performance of broiler chickens. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 40, n. 1, p. 14–21, 2010.

CARON, L.F. Ferramentas Nutricionais Moduladoras do Sistema Imune. In: 29ª REUNIÃO DO CBNA – Congresso Sobre Nutrição de Aves e Suínos, 2015, São Pedro. **Anais…** São Pedro: CBNA, 2015, p. 1-6.

CARVER, J.D. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects. **Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 124, n.1, p. 144-148, 1994.

CARVER, J.D.; WALKER, W.A. The role of nucleotides in human nutrition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 6, n. 2 p. 58-72, 1995.

CASTANON, J. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n 11, p. 2466-2471, 2007.

Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. **Sindirações**, São Paulo, 4ª edição, 2013.

COX, C.M.; STUARD, L.H.; KIM, S.; MCELROY, A.P.; BEDFORD, M.R.; DALLOUL, R.A. Performance and immune responses to dietary β-glucan in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n. 9, p. 1924-1933, 2010 a.

COX, C.M.; SUMNERS, L.H.; KIM, S.; MCELROY, A.P.; BEDFORD, M.R.; DALLOUL, R. A. Immune responses to dietary β-glucan in broiler chicks during an *Eimeria* challenge. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n. 12, p. 2597-2607, 2010 b.

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**, Hatfield, v. 82, n. 6, p. 1882–1891, 2004.

DIBNER, J.; RICHARDS, J. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 27, n. p. 519–550, 2009.

DOITA, M.; RASMUSSEN, L.T.; SELJELID, R.; LIPSKY, P.E. Effect of soluble aminated β-1,3-D-polyglucose on human monocytes: stimulation of cytokine and prostaglandin E2 production but not antigen-presenting function. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 49, n. 4, p. 342-351, 1991.

ENGBERG, R.M.; HEDEMANN, M.S.; LESER, T.D.; JENSEN, B.B. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 1311-1319, 2000.

ENGERING, A.J.; CELLA, M.; FLUITSMA, D.; BROCKHAUS, M.: HOEFSMIT, E.C.; LANZAVECCHIA, A.; PIETERS, J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 27, n. 9, p. 2417-2425, 1997.

FABER, F.; BAUMLER, A.J. The impact of intestinal inflammation on the nutritional environment of the gut microbiota. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 162, n. 2, p. 48-53, 2014.

FAIR, J.M.; TAYLOR-MCCABE, K.J.; SHOU, Y.; MARRONE, B.L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 268-273, 2008.

FANNING, A.S.; JAMESON, B.J.; JESAITIS, L.A.; ANDERSON, J.M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 273, n. 45, p. 29745–29753, 1998.

FERKET, P.R.; PARKS, C.W.; GRIMES, J.L. Benefits of dietary antibiotic and mannoligosaccharide supplementation for poultry. In: Multi-State Poultry Feeding and Nutrition Conference, 2002, Indianapolis. **Anais…** Indianapolis, 2002, p. 1-22.

GANGADHARAN, D; CHEROUTRE, H. The isoform The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. **Current Opinion in Immunology**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p.264-270, 2004.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESECROUCK, F.; GAST, R.; HUMPREY, T.J.; VAN IMMERSEEL, F. Mechanism of egg contamination by Salmonella Enteritidis. **FEMS Microbiology Review**, Malden, v. 33, n. 4, p. 718-738, 2009.

GAO, J.; ZHANG, H.J.; WU, S.G.; YU, S.; YOON, H.I.; MOORE, D.; GAO, Y.P.; YAN, H. J.; QI, G.H. Effect of Saccharomyces cerevisiae fermentation product on immune functions of broilers challenged with Eimeria tenella. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n. 10, p. 2141-2151, 2009.

GAO, J.; ZHANG, H.J.; YU, S.H.; WU, S.G.; YOON, I.; QUIGLEY, J.; GAO, Y. P.; QI, G.H. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. **Poultry Science**, Champaign, v.87, n. 7, p. 377–1384, 2008.

GAO, Y.Y.; XIE, Q.M.; JIN, L.; SUN, B.L.; JI, J.; CHEN, F.; MA, J.Y.; BI, Y.Z. Supplementation of xanthophylls decreased proinflamatory and increased anti-inflamatory cytokines in hens and chicks. **British Journal of Nutrition**, London, v. 108, n. 10, p. 1746-1755, 2012.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 125, n. 6, p. 1401–1412. 1995.

HAGHIGHI, H.R.; GONG, J.; GYLES, C.L.; HAYES, M.A.; ZHOU, H.B.; SANEI, H.; CHAMBERS, J.R.; SHARIF, S. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. **Clinical and Vaccine Immunology: CVI**, Washington, v. 13, n. 9, p. 975–980, 2006.

HOLEN, E.; JHONSSON, R. Dietary nucleotides and intestinal cell line: I. Modulation of growth. **Nutrition Research**, Davis, v. 24, n. 3, p. 197-207, 2004.

HONG, Y.H.; LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P.; LEE, S.H. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following Eimeria maxima infection of chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 114, n. 3-4, p. 259–272, 2006.

HSIEH, C.-S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, Washington, v. 260, n. p. 547–549, 1993.

IKEDA, S.; SAIJO, S.; MURAYAMA, M.A.; SHIMIZU, K.; AKITSU, A.; IWAKURA, Y.; Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-induced Foxp3 expression. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 192, n. 4, p. 1449–58, 2014.

JAEHRIG, S.C.; ROHN, S.; KROH L.W.; WILDENAUER, F.X.; LISDAT, F.; FLEISCHER, L.G.; KURZ, T. Antioxidative activity of (1 →3),(1 →6)-*β*-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. **Food Science and Technology,** Davis, v. 41, n. 5, p. 868–877, 2008.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review: A Journal of clinical therapeutic**, Napa, v. 8, n. 3, p. 223–246, 2003.

KINUGASA, T.; SAKAGUCHI, T.; GU, X.; REINECKER, H.C. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. **Gastroenterology**, Oxford, v. 118, n. 6, p. 1001–1011, 2000.

KOLLAR, R.; REINHOLD, B.; PETRAKOVA, E.; YEH, H.; ASHWELL, G.; DRGONOVA, J.; KAPTEYN, J.; KLIS, F.; CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)glucaninterconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, n. 28, p. 17762-17775, 1997.

LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. **Avian diseases**, Wooster, v. 44, n. 2, p. 408–425, 2000.

LILLEHOJ, H.S.; MIN, W.; DALLOUL, R.A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 4, p. 611–623, 2004.

LILLEHOJ, H.S.; TROUT, J.M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. **Clinical Microbiological Reviews**, Washington, v. 9, n. 3, p. 349-360, 1996.

LORENÇON, L.; NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; POZZA, M.S.S.; APPELT, M.D.; SILVA, W. T.M. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Scientiarum,** Maringá, v. 29, n. 2, p. 151-158, 2007.

LORENTZ, A.; BISCHOFF, S.C. Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL 4. **Immunological reviews**, Malden, v. 179, p. 57–60, 2001.

LUZINA, I. G.; KEEGAN, A.D.; HELLER, N.M.; ROOK, G.A.; SHEA-DONOHUE, T.; Atamas, S.P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 92, n. 4, p. 753–764, 2012.

MAST, J.; GODDEERIS, B.M. Development of immunocompetence of broiler **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amesterdam, v. 70, n. 3-4, p. 245-256, 1999.

MATEO, E.D.; DAVE, R.I.; STEIN, H.H. Effect of supplemental nucleosides for newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 82, n. 2, p. 42, 2004.

MATHEW, A.G.; CHATTIN, S.E.; ROBBINS, C. M.; GOLDEN, D.A. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 76, n. 8, p. 2138–2145, 1998.

MCINNES, I.B. Cytokines. In: FIRESTEIN, G.S.; BUDD, R.; GABRIEL, S.E.; MCINNES, L.B.; O'DELL, J.R. **Kelley's Textbook of Rheumatology**, Elsevier Health Sciences, Philadelphia, p. 367–377, 2012.

MOGENSEN, T.H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.

MUNYAKA, P.M.; ECHEVERRY, H.; YITBAREK, A.; CAMELO-JAIMES, G.; SHARIF, S.; GUENTER, W.; HOUSE, J.D.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C. Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, n. 9, p. 2164-2172, 2012.

NABESHIMA, S.; MURATA, M.; KIKUCHI, K.; IKEMATSU, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. A reduction in the number of peripheral CD28+CD8+Tcells in the acute phase of influenza. **Clinical & Experimental Immunology**, Hoboken, v. 128, n. 2, p. 339-346, 2002.

NETEA, M.G.; GOW, N.A.R.; MUNRO, C.A.; BATES, S.; COLLINS, C.; FERWERDA, G.; HOBSON, R.P.; BERTRAM, G.; HUGHES, H.B.; JANSEN, T. Immune sensing of Candida albicans requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 116, n. 6, p. 1642–1650, 2006.

NATIONAL CHICKEN COUNCIL. Questions and Answers about Antibiotics in Chicken Poduction. **National Chicken Council**, Washington, 2014. Disponível em: http://www.nationalchickencouncil.org/questions-answers-antibiotics-chicken-production (Acesso em Agosto de 2016).

NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; CHEN, X.B.; MCINTOSH, F.M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 73, n. 6, p. 1811–1818, 1995.

NIEWOLD, T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 605–609, 2007.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 7, n. 6, p. 425–428, 2007.

OLAH, I.; NAGY, N.; MAGYAR, A.; PALYA, V. Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 5, p. 767-770, 2003.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. **World Health Organization**, Genebra, 2014.

ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. World Population Prospects. **United Nations**, NewYork, 2015. Disponível em: https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf (Acesso em Agosto de 2016).

PARRY, S.; BARRATT, M.J.; JONES, S.; MCKEE, S.; MURRAY, J.D. Modeling coccidial infection in chickens: emphasis on vaccination by in-feed delivery of oocysts. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 157, n. 4, p. 407–425, 1992.

PAUL, W.E.; SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, Cambridge, v. 76, n. 2, p. 241–251, 1994.

PAWELEC, G.; AKBAR, A.; CARUSO, C.; EFFROS, R.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; WIKBY, A. Is immunosenescence infectious? **Trends in Immunology**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 406-410, 2004.

PEREZ-CARBAJAL, C.; CALDWELL, D.; FARNELL, M.; STRINGFELLOW, K.; POHL, S.; CASCO, G.; PRO-MARTINEZ, A.; RUIZ-FERIA, C.A. Immune response of broiler chickens fed different levels of arginine and vitamin E to a coccidiosis vaccine and Eimeria challenge. **Poultry Science,** Champaign, v. 89, n. 9, p. 1870–1877, 2010.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleics Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2003-2007, 2001.

POPE, C.R. Lymphoid system. In: Avian histopathology, 1999, 2ndEd. C. Riddel, Ed. American Association of Avian Pathologists, Kennet Square. **Anais ...** Kenet Square: AAAP, 1999, p. 18-34.

RAJAPAKSE, J.R.P.V.; BUDDHIKA, M.D.P.; NAGATAKI, M.; NOMURA, H.; WATANABE, Y.; IKEUE, Y.; AGATSUMA, T. Effect of sophy β-glucan on immunity and growth performance in broiler chicken. **Journal of Veterinary Medical Science,** v. 72, n. 12, p. 1629–1632, 2010.

RANTALA M.; NURMI, E. Prevention of the growth of Salmonella infantis in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. **British Poultry Science**, London, v. 14, n. 6, p. 627–630, 1973.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. Yeast Technology. **Van Nostrand Reinhold**, 2ª edição, New York, 1991.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos:** composição de alimentos e exigências nutricionais. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.

RUTZ, F.; RECH, J.; XAVIER, E.G.; ANCIUTI, M.A.; ROSSI, P. Cuidados críticos na nutrição inicial de aves: alternativas para melhorar o desempenho e o papel essencial dos nucleotídeos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., 2005, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Alltech Biotechnology, 2005, p.19-39.

SAALMULLER, A.; WERNER, T.; FACHINGER, V. T-helper cells from naïve to committed. **Vet Immunology and. Immunopathology**, Amsterdam, v. 87, n. 3-4, p. 137–145, 2002.

SAIJO, S.; IKEDA, S.; YAMABE, K.; KAKUTA, S.; ISHIGAME, H.; AKITSU, A.; FUJIKADO, N.; KUSAKA, T.; KUBO, S.; CHUNG, S. Dectin-2 recognition of α-Mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity**, Cambridge, v. 32, n. 5, p. 681–691, 2010.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, 2007, 283p.

SANTIN, E.; DE MORAES, M.L. IMUNIDADE E NUTRIÇÃO EM AVES. In: VI Congresso Latino Americano de Nutrição Animal, 2015, São Pedro. **Anais…** São Pedro: CBNA, 2015, p. 1-17.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System:** user's guide; version 9.3 ed. Cary, 2012.

SCHIEPERS, O.J.; WICHERS, M.C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Progress in neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 201-217, 2005.

SCHOENBORN, J.R.; WILSON, C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, Amsterdam, v. 96, p. 41–101, 2007.

SCHWARZENBERGER, P.; LA RUSSA, V.A.; MILLER, A.; YE, P.; HUANG, W.; ZIESKE, A.; NELSON, S.; BAGBY, G.J.; STOLTZ, D.; MYNATT, R.L.; SPRINGS, M.; KOLLS, J.K. “IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines”. **Journal of Immunology**, Rockville, v. 161, n. 11, p. 6383–6389, 1998.

SHANMUGASUNDARAM, R.; SELVARAJ, R.K. Effect of killed whole yeast cell prebiotic supplementation on broiler performance and intestinal immune cell parameters. **Poultry Science**, Champaign, v.91, n. 1, p. 107–111., 2012.

SHAO, Y.; GUO, Y.; WANG, Z. β-1,3/1,6-Glucan alleviated intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged with Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, n. 7, p. 1764-73, 2013.

SHASHIDHARA, R.; DEVEGOWDA, G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1319–1325, 2003.

SIMS, M. D.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E.; SPRING, P.; HOOGELL, D.M. Effects of Dietary Mannan Oligosaccharide, Bacitracin Methylene Disalicylate, or Both on the Live Performance and Intestinal Microbiology of Turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1148-1154, 2004.

SOMMER, R. Yeast extract: Production, Properties and Components. In: 9th International Symposium of Yeast, Sydney, 1996. **Anais…** Sydney, 1996.

STABEL,T.J.; BOLIN, S.R.; PESCH, B.A.; RAHNER, T.E. A simple and rapid flow cytometric method for detection of porcine cell surface markers. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 245, n. 1-2, p. 147–152, 2000.

STANLEY, V.G.; GRAY, C.; DALEY, M.; KRUEGER, W.F.; SEFTON, A.E. An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* spp.-infected litter. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 1, p. 39–44, 2004.

STEINMAN, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, London, v. 13, n. 2, p. 139–145, 2007.

STENGER, S.; RÖLLINGHOFF, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. **Annals of Rheumatic Diseases**, London, v. 60, n. 3, p. 43-46, 2001.

SULLIVAN, Y. B.; LANDAY, A.L.; ZACK, J.A.; KITCHEN, S.G.; AL-HARTHI, L. Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. **Immunology**, Malden v. 103, n. 3, p.270-280, 2001.

ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WŁOSEK, A.; JÓZEFIAK, D. Immunomodulatory efficacy of yeast cell products in poultry: a current review . **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v. 70, n.1, p. 57-68, 2014.

TIZZARD, I.R. **Veterinary Immunology:** An Introduction. 8th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO. 2009. 608p.

TOROK, V.A.; HUGHES, R.J.; MIKKELSEN, L.L.; PEREZ-MALDONADO, R.; BALDING, K.; McALPINE, R.; PERCY, N.J.; OPHEL-KELLER, K. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiota in broilers chickens across various feeding trials. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 77, n. 17, p. 5868-5878, 2011.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 2, n. 4, p. 285–293, 2001.

UAUY, R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.124, Supplement 1, p. 1575-1585, 1994.

UK Five Year Antimicrobial Resistance Strategy 2013 to 2018. **Department of Health**, Richmond House, 79 Whitehall, London SW1A2NS. Disponível em: http://www.gov.uk/dh (Acesso em Agosto de 2016).

U.S ORGANIC TRADE ASSOCIATION. U.S Organic Worldwide 2015, Annual Report for OTA's International Work. **U.S Organic Trade Asssociation**, Washington, p. 1-4, 2015. Disponivel em: http://ota.com/sites/default/files/indexed_files/OTAWorldwide2015AR.pdf (Acesso em Agosto de 2016).

UNI, Z.; SMIRNOV, A. Modulating mucin dynamics using functional carbohydrates. Gut microbiology: research to improve health, immune response and nutrition. In: Fitfh RRI-INRA Joint Symposium, Aberdeen, 2006. **Anais…** Aberdeen, 2006.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Economic Research Service**. Summary of retail prices and prices spreads. Março, 2016. Disponivel em: http://www.ers.usda.gov/data-products/meat-price-spreads.aspx (Acesso em Agosto de 2016)

VAN DE VEERDONK, F.L.; NETEA, M.G. T-cell subsets and antifungal host defenses. **Current Fungal Infection Reports**, Berlin, v. 4, n. 4, p. 238–243, 2010.

VISEK, W. J. The mode of growth promotion by antibiotics. **Journal of Animal Science,** Hatfield, v. 46, n.5, p. 1447-1469, 1978**.**

WALLACE, R.J. Ruminal microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 72, n. 11, p. 2992–3003, 1994.

WOLOWCZUK, I.; VERWAERDE, C.; VILTART, O.; DELANOYE, A.; DELACRE, M.; POT, B.; GRANGETTE, C. Feeding our Immune system: impact on metabolism. **Journal of Immunology Research**, v. 2008: 639803, 19 p, 2008.

WORLD BANK. Ending Extreme Poverty and Sharing Prosperity: Progress and Policies. **World Bank Group,** Washington, Police Research Note, p. 1-83, 2015. Disponível em: http://pubdocs.worldbank.org/en/109701443800596288/PRN03Oct2015TwinGoals.pdf. (Acesso em Agosto de 2016).

YANG, Y.; IJI, P.A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poultry Science Journal,** Beekbergen, v. 65, p. 97-114, 2009.

YEGANI, M.; KORVER, D.R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 10, p. 2052-2063, 2008.

YITBAREK, A.; ECHEVERRY, H.; BRADY, J.; HERNANDEZ-DORIA, J.; CAMELO-JAIMES, G.; SHARIF, S.; GUENTER, W.; HOUSE, J.D.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C. Innate immune response to yeast-derived carbohydrates in broiler chickens fed organic diets and challenged with Clostridium perfringens. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, n. 5, p. 1105-1112. 2012.

YITBAREK, A.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C.; ECHEVERRY, H.M.; MUNYAKA, P.; BARJESTEH, N.; SHARIF, S.; CAMELO-JAIMES, G. Performance, histomorphology, and Toll-like receptor, chemokine, and cytokine profile locally and systemically in broiler chickens fed diets supplemented with yeast-derived macromolecules. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, n. 9, 2013.

YUN, C.H. Intestinal immune responses to coccdiosis**. Developmental and Comparative Immunology**, Amsterdam, v. 24, n. 2-3, p. 303-324, 2000.

ZANUTTO, C.A.; MOREIRA, I.; FURLAN, A.C.; SCAPINELLO, C.; MURAKAMI, A.E. Utilização da levedura de recuperação (*Saccharomyces sp*.), seca por rolo rotativo ou por spray-dry, na alimentação de leitões na fase inicial. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 3, p. 705-710, 1999.

ZHANG, A.W.; LEE, B.D.; LEE, S.K.; LEE, K.W.; AN, G.H.; SONG, K.B.; LEE, C.H. Effects of yeast (Saccharomyces cerevisiae) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 7, p. 1015–1021, 2005.