

**LETICIA CARDOSO BITTENCOURT**

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE PARÂMETROS DA  
RESPOSTA IMUNE, HEMATOLÓGICOS E DE DESEMPENHO DE FRANGOS DE  
CORTE**

Pirassununga

2006

LETICIA CARDOSO BITTENCOURT

**Efeitos da utilização de probiótico sobre parâmetros da resposta imune,  
hematológicos e de desempenho de frangos de corte**

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

**Departamento:**

Nutrição e Produção Animal

**Área de Concentração:**

Nutrição Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque

Pirassununga  
2006

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1664  
FMVZ

Bittencourt, Leticia Cardoso

Efeitos da utilização de probiótico sobre parâmetros da resposta imune, hematológicos e de desempenho de frangos de corte / Leticia Cardoso Bittencourt. – Pirassununga : L. C. Bittencourt, 2006.

98 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Nutrição Animal.

Área de concentração: Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque.

1. Probiótico. 2. Desempenho. 3. Imunidade. 4. Hematologia.  
5. Frangos de corte. I. Título.

## ERRATA

Página	Seção	Linha	Onde se lê	Leia-se
2	Ficha Catalográfica	6	98	97
7	Resumo	3	98	97
9	Abstract	3	98	97

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da utilização de probiótico sobre parâmetros da resposta imune, desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte", Protocolo nº501/2004, utilizando 1.200 frangos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Effects of probiotics on parameters of immune response, performance and intestinal morphology of broiler chickens", protocol number 501/2004, utilizing 1.200 broiler chickens, under the responsibility of Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 20 de julho de 2004

  
Profª Drª Júlia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Nome:** BITTENCOURT, Letícia Cardoso

**Título:** Efeitos da utilização de probiótico sobre parâmetros da resposta imune, hematológicos e de desempenho de frangos de corte

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*À Deus e a toda minha família.*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por sempre iluminar meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, quem muito admiro, pela orientação, apoio e amizade, indispensáveis para a condução e finalização deste trabalho e que contribuiu muito nesta etapa de minha vida.

Aos colegas do curso de Pós – Graduação, Ana Louise, Estelinha, Paulinha, Francine, Lílian e Paulo pela amizade, apoio e colaboração na elaboração deste trabalho.

Aos funcionários, China, Pedro e em especial ao Edinho, pela disponibilidade e fundamental ajuda na condução do experimento.

A todos do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária – CEPTOX, VPT, FMVZ, USP, em especial, à Ester e à Isis pela orientação, auxílio e disposição em ajudar sempre.

Às pesquisadoras, Ana Lúcia e Eliana, do Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola de Descalvado, pela realização das análises hematológicas e sorológicas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a condução do experimento.

À Imeve pelo fornecimento do probiótico testado.

À todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

À minha família que me apoiou desde o início.

E ao Maurício que me aturou durante todo este período sempre me acompanhando, me apoiando e me incentivando, obrigada.

## RESUMO

BITTENCOURT, L. C. **Efeitos da utilização de probiótico sobre parâmetros da resposta imune, hematológicos e de desempenho de frangos de corte.** [Effect of the use of Probiotic on parameters of the immunity, hematology and performance of broilers]. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

As exigências dos consumidores por produtos de qualidade são cada vez maiores e a indústria avícola está tendo que se adequar a estas mudanças. Um exemplo é a proibição do uso de antibióticos na alimentação animal devido a possível indução de resistência bacteriana. Contudo, a busca de alternativas a estes produtos está sendo alvo de muitas pesquisas e os probióticos se destacam com promessas de equilíbrio da microbiota intestinal e diminuição do estresse imunológico, impedindo a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam relacionadas com a produção, promovendo desta forma, uma melhor resposta do sistema imune e conseqüente melhora no desempenho zootécnico. Devido à escassez de estudos relacionando o efeito dos probióticos com a imunidade das aves, o presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência de um tipo de probiótico em alguns parâmetros da resposta imune e hematológicos associados ao desempenho de frangos de corte. Foram utilizados 1200 pintos de corte, criados até 42 dias de idade, em um delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (antibiótico, probiótico e controle) e 10 repetições. Considerando-se o período total de criação e nas condições em que o experimento foi conduzido, não foi possível mostrar a influência dos aditivos testados nos parâmetros zootécnicos avaliados. Também não foi observada influência na resposta imune de macrófagos, linfócitos T e alteração de peso de órgãos linfóides nas idades avaliadas e com os métodos utilizados. Entretanto, foi possível observar resposta positiva do probiótico em relação ao antibiótico no que diz respeito à produção de anticorpos em resposta à vacina de Newcastle, porém, sem diferir do controle. Para os parâmetros hematológicos, apesar das diferenças

encontradas entre os tratamentos, os valores hematológicos do presente estudo encontraram-se dentro da normalidade quando comparados a outros estudos.

Palavras-chave: Probiótico. Desempenho. Imunidade. Hematologia. Frangos de corte.

## ABSTRACT

BITTENCOURT, L. C. **Effect of the use of Probiotic on parameters of the immunity, hematology and performance of broilers.** [Efeitos da utilização de probiótico sobre parâmetros da resposta imune, hematológicos e de desempenho de frangos de corte]. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006

The demand from consumers for good-quality products has been increasing and the poultry industry has to adjust to it. An example that shows this is the prohibition of the use of antibiotic in animal feeding, given the fact it could induce bacterial resistance. Therefore, the search for alternatives to these products has been the major goal of many researches and the probiotics stand out with promises to balance the intestinal microbial and to reduce immunologic stress, hindering the mobilization of nutrients for activities that are not related with the production, promoting, this way, a better response from the immune system and a consequential improvement in its performance. Due to the lack of studies that relate the effect of the probiotics with the poultry immunity, the present study has been carried through with the objective of verifying the influence of a type of probiotic in some parameters of the immune and hematology response associated to the performance of broilers. 1200 broilers were used, bred up for 42 days, in a completely randomized design with 3 types of treatments (antibiotic, probiotic and control) and 10 repetitions. Considering the total period of creation and the conditions in which the experiment was led, it was not possible to show the influence of additives tested in the evaluated parameters of performance. It was not observed the influence on the immunity of macrophages, T lymphocytes and alteration of weight of lymphoid organs in the evaluated ages and with the used methods either. However, it was possible to observe a positive response from the probiotic - comparing it to the antibiotic - regarding the production of antibodies in response to the vaccine of Newcastle, still, without differing from the control. For the hematological parameters, despite the differences found

among the treatments, the hematological values of the present study are found to be within normality when compared to other studies.

**Key words:** Probiotic. Performance. Immunity. Hematology. Broilers.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

- Tabela 1 - Composição percentual das rações experimentais nas diferentes fases de criação..... 40
- Tabela 2 - Composição dos suplementos vitamínico-minerais (Vit.-Min.) utilizados..... 41
- Tabela 3 - Ganho de peso médio (GP), consumo de ração médio (CR), conversão alimentar (CA) e mortalidade (Mort) de frangos de corte nos intervalos de criação 0-7, 0-14, 0-21, 0-28, 0-35 e 0-42 dias de idade sob os diferentes tratamentos..... 43

### CAPÍTULO IV

- Tabela 1 - Efeitos dos aditivos sobre a média dos títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle, obtidos pelo teste ELISA em frangos de corte nas diferentes idades..... 66
- Tabela 2 - Valores médios das taxas de fagocitose, em porcentagem de células que fagocitaram uma ou mais partículas de Zymosan, nos diferentes tratamentos, em frangos de corte com 21 dias de idade..... 68
- Tabela 3 - Valores médios de água oxigenada liberada por macrófagos de frangos de corte de 21 dias de idade, com ou sem PMA, nos diferentes tratamentos..... 69

Tabela 4 -	Reação cutânea basofílica, em mm de aumento, após inoculação intradérmica de fitoemaglutinina, nos intervalos: antes da inoculação e 8h após (T8h-T0h) e antes da inoculação e 24h após (T24-T0h).....	70
Tabela 5 -	Pesos médios relativos dos órgãos linfóides: baço, bursa e timo, em relação ao peso vivo de frangos de corte nos diferentes tratamentos.....	71

## CAPÍTULO V

Tabela 1 -	Intervalos de valores hematológicos considerados normais de frangos ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) em idades diversas. ....	82
Tabela 2 -	Valores hematológicos das aves: hemoglobina, hematócrito, hemácias, hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume corpuscular médio (VCM) e trombócitos, nos diferentes tratamentos. ....	90
Tabela 3 -	Valores de proteínas totais, nos diferentes tratamentos aos 14, 28 e 35 dias de idade. ....	90
Tabela 4 -	Médias dos valores numéricos de glóbulos brancos (GB) e dos valores relativos de linfócitos, heterófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, nos diferentes tratamentos. ....	92
Tabela 5 -	Médias dos valores numéricos de glóbulos brancos (GB) e dos valores absolutos de linfócitos, heterófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, nos diferentes tratamentos. ....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{l}$	microlitro
CA	conversão alimentar
CD3	<i>Cluster of differentiation</i> – Molécula presente em todos os linfócitos T
CD4	<i>Cluster of differentiation</i> – Molécula presente em todos os linfócitos T- helper
CD8	<i>Cluster of differentiation</i> – Molécula presente em todos os linfócitos T citotóxicos
céls	células
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CR	consumo de ração
CV	coeficiente de variação
dl	decilitro
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio Imuno-Enzimático
fl	fentolitro
g	grama
GP	ganho de peso
h	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	água oxigenada
HCM	hemoglobina corpuscular média
Ig A	imunoglobulina A
Ig G	imunoglobulina G
Ig M	imunoglobulina M
Ig	imunoglobulina

kg	kilograma
LPS	lipopolissacárides
M	molar
m <sup>2</sup>	metro quadrado
ml	mililitro
Mort	mortalidade
n <sup>o</sup>	número
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetro
nmoles	nanomoles
O <sub>2</sub>	oxigênio
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (pH 7,2)
PG	peptídeoglicanos
PHA	fitoemaglutinina
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
sp	espécie
spp	espécies
ton	tonelada
UFC	unidades formadoras de colônias
VCM	volume corpuscular médio
VG/GA	<i>Villegas Glisson /Georgia</i>
Well	poços

## SUMÁRIO

### CAPITULO I

1	INTRODUÇÃO.....	18
---	-----------------	----

	<b>CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
--	--	-----------

1	PROBIÓTICOS .....	20
---	-------------------	----

2	IMUNIDADE .....	22
---	-----------------	----

3	HEMATOLOGIA .....	25
---	-------------------	----

	REFERÊNCIAS.....	28
--	------------------	----

### CAPITULO III - INFLUÊNCIA DE PROBIÓTICO NO DESEMPENHO DE

	FRANGOS DE CORTE.....	32
--	-----------------------	----

	RESUMO .....	32
--	--------------	----

	ABSTRACT .....	33
--	----------------	----

1	INTRODUÇÃO.....	34
---	-----------------	----

2	MATERIAL E MÉTODOS .....	39
---	--------------------------	----

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
---	-----------------------------	----

4	CONCLUSÕES.....	47
---	-----------------	----

	REFERÊNCIAS.....	48
--	------------------	----

<b>CAPITULO IV - INFLUÊNCIA DE PROBIÓTICO EM PARÂMETROS DA</b>	
<b>RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE .....</b>	
	<b>51</b>
RESUMO .....	51
ABSTRACT .....	52
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
2.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL – RESPOSTA À VACINA	
DENEWCASLE.....	60
2.2 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	61
2.2.1 <b>Fagocitose .....</b>	<b>62</b>
2.2.2 <b>Produção de Água Oxigenada .....</b>	<b>62</b>
2.3 RESPOSTA CUTÂNEA BASOFÍLICA À FITOEMAGLUTININA .....	63
2.4 PESO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES .....	64
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
3.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL – RESPOSTA À VACINA DE	
NEWCASTLE.....	66
3.2 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	68
3.2.1 <b>Fagocitose .....</b>	<b>68</b>
3.2.2 <b>Produção de Água Oxigenada .....</b>	<b>69</b>
3.3 RESPOSTA CUTÂNEA BASOFÍLICA À FITOEMAGLUTININA .....	70
3.4 PESO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES .....	71
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

<b>CAPITULO V - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE FRANGOS DE</b>	
<b>CORTE QUE RECEBERAM PROBIÓTICO NA DIETA ..... 79</b>	
RESUMO .....	79
ABSTRACT .....	80
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	81
2 <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	86
3 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	89
4 <b>CONCLUSÕES</b> .....	94
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95

# CAPITULO I

## 1 INTRODUÇÃO

As exigências dos consumidores e do mercado externo por produtos de qualidade são cada vez maiores e a indústria avícola está tendo que se adequar a estas mudanças. O impacto da produção sobre o meio ambiente e na saúde animal estão ganhando importância não havendo mais apenas o enfoque na alta produtividade. Um exemplo é a proibição do uso de antibióticos na alimentação animal.

Visando alta produtividade a baixo custo, os antibióticos promotores de crescimento vêm sendo utilizados de forma indiscriminada e em larga escala na produção animal há muitos anos. Atualmente, o uso destes aditivos nos animais está sendo questionado devido à possível relação destes, com o crescente desenvolvimento de resistência bacteriana nos animais e no homem.

As buscas de alternativas que mantenham a alta produtividade sejam economicamente viáveis e sem prejudicar a saúde humana e animal estão sendo alvo de muitas pesquisas e os probióticos se destacam com promessas de equilíbrio da microbiota intestinal e diminuição do estresse imunológico, impedindo a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam relacionadas com a produção o que conseqüentemente beneficia a saúde e o desempenho do animal.

Diante deste contexto, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi avaliar os parâmetros zootécnicos de frangos de corte que receberam probiótico na dieta e associado ao desempenho, devido à escassez de estudos relacionando o efeito deste aditivo com a

imunidade das aves, mensurar também a influência em alguns parâmetros da resposta imune e hematológicos como meios de avaliação do efeito imunomodulador.

## CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA

### 1 PROBIÓTICOS

Fuller (1989) define probiótico como um suplemento alimentar constituído de microorganismos vivos, que no organismo animal atuam de forma benéfica melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal.

Em equilíbrio, o trato intestinal consegue de forma mais eficiente absorver nutrientes e impedir a fixação e multiplicação de agentes patogênicos na mucosa intestinal (FERNANDES et al., 2000), prevenindo desta forma a instalação de doenças entéricas e consequentemente melhorando a produtividade, diminuindo a mortalidade e a contaminação dos produtos de origem animal (EDENS, 2003; ISOLAURI et al., 2001; PATTERSON; BURKHOLDER, 2003).

As cepas bacterianas utilizadas no preparo de probióticos são principalmente: *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* sp, *Enterococcus faecium* e *Bacillus* spp. (FERREIRA et al., 2002; SIMON et al., 2001).

Alguns autores não acreditam que as alternativas aos antibióticos atinjam os mesmos níveis de produtividade e que sejam capazes de atuar de forma terapêutica em problemas sanitários graves (FERKET, 2003).

Porém, diversos trabalhos realizados no Brasil com probióticos em frango de corte mostraram que, no que se refere ao desempenho, as respostas são praticamente equivalentes às apresentadas com o uso dos antibióticos (MENTEN; LODDI, 2003; ZULKIFLI et al., 2000). Muitos dos estudos citados apresentam bons resultados na melhora do ganho de peso e conversão alimentar (EDENS, 2003; FERREIRA et al., 2002; JIN et al., 1998).

Também foram observadas características positivas no uso de probióticos quanto ao controle de patógenos tóxicos ao homem como, *Samonella* spp, *Campylobacter* sp, *Listeria* sp, *Escherichia coli*, dentre outras (FERREIRA et al., 2002).

Por outro lado, outros estudos não verificaram efeito positivo com a inclusão do probiótico sobre o desempenho das aves (LIMA et al., 2003; LODDI, 2000).

É possível encontrar na literatura uma diversidade de trabalhos mostrando efeitos positivos e negativos no que se refere ao uso dos probióticos (JIN et al., 1997).

Esta diversidade nos resultados pode estar relacionada a fatores externos (estresse e situação sanitária do galpão) ou a fatores relacionados aos microrganismos utilizados que devem ser adequados a cada situação (LIMA et al., 2003).

Portanto, comparar resultados fica muito difícil devido aos vários fatores interferentes e a grande diversidade de microrganismos utilizados como probióticos. Tournut (1998) relata a importância da análise separada dos probióticos, da mesma maneira como é feita com os antibióticos.

Para que seja obtido um efeito desejado de um probiótico é de grande importância assegurar que o microrganismo ingerido irá sobreviver à passagem pelo estômago e se proliferar no trato intestinal (FERREIRA et al., 2002; JIN et al., 1998).

Alguns modos de ação descritos na literatura tentam esclarecer os efeitos benéficos deste suplemento no desempenho animal e na resistência a doenças. Os principais são: competição por sítios de ligação, produção de substâncias antibacterianas, aumento da atividade enzimática, competição por nutrientes, supressão da produção de amônia, neutralização de enterotoxinas e estímulo ao sistema imune (FULLER, 1989; JIN, 1997; ROLFE, 2000).

## 2 IMUNIDADE

Altos níveis zootécnicos na produção de frangos dependem diretamente do sistema imune. É através da imunidade que o animal se defende dos patógenos aos quais estão expostos diariamente, portanto é de extrema importância que este sistema esteja atuando de forma adequada e eficiente para impossibilitar a introdução de doenças no organismo da ave e consequentemente impedir a diminuição do desempenho produtivo (MORGULIS, 2002).

A resposta imune humoral é caracterizada pela participação de imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos séricos, que são produzidas por plasmócitos derivados de linfócitos B ativados e diferenciados após contato e reconhecimento antigênico prévio. Já a resposta imune celular diferencia-se da humoral, pelo fato de haver a participação de linfócitos T efetores, que se desenvolvem após o estímulo antigênico sobre os linfócitos T auxiliares. Os leucócitos polimorfonucleares (heterófilos e eosinófilos), os trombócitos, as células endoteliais, os monócitos e basófilos atuam como células efectoras na mediação dos processos inflamatórios da resposta imune inata (MONTASSIER, 1998).

Os macrófagos são células fagocíticas didaticamente consideradas como sendo a primeira frente de defesa contra antígenos invasores. Além da atividade fagocítica, estas células exercem inúmeras outras funções, dentre elas: o reconhecimento antigênico e processamento destes antígenos no interior de fagossomos sejam eles de origem bacteriana, viral ou tumoral, para posterior apresentação antigênica para linfócitos, quimiotaxia, e produção de mediadores químicos importantes, as citocinas, para a ativação adequada do sistema imune adquirido (mediado por linfócitos B e T). A participação de macrófagos é fundamental para a regulação da resposta imunológica e desempenham importante função de união entre resposta imune inata e adquirida (KLASING, 1998; KUROGI, et al., 2003;

QURESHI, 1998; QURESHI, 2003). Ainda, as funções destas células podem ser moduladas de acordo com fatores nutricionais, genéticos e ambientais (QURESHI, 2003).

A fagocitose não é um processo simples, nela estão envolvidas várias etapas nas quais ocorrerão: ingestão, morte e digestão do antígeno. A destruição do microrganismo englobado ocorre através de mecanismos oxidativos (oxigênio e nitrogênio reativos) ou não oxidativos (hidrolases ácidas, lisozimas e proteínas catiônicas), sem haver necessidade de transcorrer muito tempo após o estímulo (KUROGI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003).

A influência dos nutrientes imunestimulantes de forma positiva no desempenho zootécnico do animal ocorre pela diminuição do estresse imunológico e desta forma, minimizando a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam ligadas com produção (FERKET, 2003).

Relatos de literatura indicam que os vários tipos de probióticos existentes possuem algum efeito imunomodulador (COPPOLA; TURNES, 2004), acredita-se que as alterações imunológicas induzidas pelos probióticos não estão limitadas a imunidade local da mucosa intestinal, há também relatos de efeitos sobre a resposta imune sistêmica (ERICKSON; HUBBARD, 2000; PERDIGON et al., 1995).

Os gêneros de bactérias que estão diretamente relacionadas com o aumento da imunidade das aves são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, principalmente quando relacionadas com doenças que afetam o trato intestinal (ERICKSON; HUBBARD, 2000; MENTEN; LODDI, 2003).

Há hipóteses de que são os produtos da parede celular das bactérias que compõem os probióticos que co-estimulam a indução da resposta imune (ERICKSON; HUBBARD, 2000; ROLFE, 2000). Estão presentes na parede da bactéria principalmente dois componentes moleculares, os peptídeoglicanos (PG) e os lipopolissacárides (LPS), pequenas quantidades são liberadas constantemente na luz intestinal das aves o que vai ser aumentado quando da

ocorrência de processos infecciosos. Estes produtos são fundamentais no desenvolvimento e manutenção da função do sistema imune (HAMANN et al., 1998).

Células endoteliais, macrófagos, células da musculatura lisa e neutrófilos são ativados por estes componentes da parede celular e em resposta liberam outros mediadores químicos, por exemplo: citocinas, metaloproteínas, prostaglandinas, bem como metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio (ERICKSON; HUBBARD, 2000).

Quanto ao efeito dos probióticos na imunidade foram observados: aumento na produção de citocinas e atividade fagocítica de macrófagos (EDENS, 2003; ERICKSON; HUBBARD, 2000; FERREIRA et al., 2002), aumento da produção de imunoglobulinas IgA, IgM, IgG e ativação de células T natural *killer*, CD3, CD4 e CD8 (EDENS, 2003; JIN et al., 1997), proliferação de células T e produção de interferon (JIN et al., 1997).

Perdigon et al. (1991) observaram que Lactobacilos quando suplementados na ração de camundongos aumentam a produção de IgA secretora, fato este observado pelo aumento de celularidade nas Placas de Peyer, aumento este suficiente para prevenir infecções entéricas (ERICKSON; HUBBARD, 2000), reduzindo desta forma, o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (JIN et al., 1997).

Embora haja diversos estudos voltados para a prevenção de doenças e o aumento da resposta imune quando da ingestão de probióticos, principalmente na medicina humana, os mecanismos específicos de ação ainda não estão bem esclarecidos (ERICKSON; HUBBARD, 2000; FERREIRA et al., 2002; MENTEN; LODDI, 2003). Muito pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa intestinais dos probióticos nas aves (DALLOUL, 2003; FERKET, 2003).

### 3 HEMATOLOGIA

A hematologia aviária embora ainda não esteja bem desenvolvida como a hematologia dos mamíferos, está ganhando importância e começando a ser estudada (ANDERSON; STEPHENS, 1970; CAMPBELL; DEIN, 1984).

Nas células sanguíneas das aves existem algumas particularidades como: as hemácias são nucleadas e os heterófilos e trombócitos nucleados correspondem aos neutrófilos e plaquetas dos mamíferos, respectivamente, mas estas diferenças não impedem que as técnicas hematológicas utilizadas para os mamíferos sejam aplicadas nas aves, sendo necessárias apenas algumas adaptações (CAMPBELL; DEIN, 1984; MORGULIS, 2002).

O hemograma consta de uma série de provas que possibilitam detectar anormalidades que se apresentam em certos fenômenos fisiopatológicos importantes e que se refletem no sangue (CHARLES NORIEGA, 2000).

A hemoglobina é importante no transporte de CO<sub>2</sub> entre os tecidos e os alvéolos pulmonares, mantendo desta maneira o pH do sangue e a entrada de oxigênio nas células. Com a concentração da hemoglobina no sangue, é possível determinar a capacidade de oxigenação tissular (CHARLES NORIEGA, 2000) e classificar um processo anêmico (STURKIE, 1976).

O hematócrito permite avaliar a parte globular em uma amostra de sangue. Os valores normais variam de acordo com a idade. Em geral, pode-se considerar que quando as aves apresentam hematócrito menor que 29% significa que há um processo de anemia (CHARLES NORIEGA, 2000).

Nas aves as hemácias são ovais e nucleadas, medem 7,7 micra de largura e 8,1 a 10 micra de comprimento. A contagem total de hemácias permite realizar uma análise mais

detalhada da presença ou ausência de anemia ou hemoconcentração (CHARLES NORIEGA, 2000). O número varia entre as diferentes espécies aviárias, idade, sexo, influências hormonais e meio ambiente (HODGES, 1977).

Os índices de Wintrobe (WINTROBE, 1933): hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM), detectam a presença de anemia e avaliam a capacidade que a medula óssea tem de produzir hemácias de tamanho e capacidade metabólica normais, assim como o conteúdo de hemoglobina.

Os trombócitos circulam em grande número no sangue das aves e são células importantes na resposta imune inespecífica (GRECCHI et al., 1980). Possuem função semelhante às plaquetas nos mamíferos no processo da coagulação sangüínea, mas sua principal característica é a função fagocítica (CAMPBELL; DEIN, 1984; CHARLES NORIEGA, 2000).

As proteínas plasmáticas do sangue são formadas por: albumina, globulinas, alfa, beta, gama e fibrinogênio e a maioria destas são sintetizadas no fígado. Estas fazem parte de 20% do sangue, são nutrientes essenciais para a vida, possuem as funções de manter a pressão osmótica, regular o mecanismo ácido-base do sangue, transportar hormônios além de participar da formação de parte importante das enzimas e imunoglobulinas. A mensuração destas proteínas no sangue proporciona informações importantes sobre a saúde e estado fisiológico, incluindo respostas imunológicas e inflamatórias (CHARLES NORIEGA, 2000; FAIRBROTHER et al., 2004).

A contagem total de leucócitos é necessária para poder interpretar com maior certeza a natureza de uma infecção viral ou bacteriana quando se associa com a interpretação da contagem diferencial de leucócitos ou também avaliar o estado geral do animal (NORIEGA, 2000), é um método simples, não invasivo e compatível com outras análises de sangue, porém

a interpretação pode ser difícil em aves, pela falta de estudos publicados na literatura (FAIRBROTHER et al., 2004).

A contagem diferencial de leucócitos é de extrema importância para o diagnóstico, pois estabelece a percentagem e a quantidade de cada tipo de leucócito que se encontra em uma determinada circunstância ou enfermidade da ave. Em conjunto com a contagem total é possível determinar o diagnóstico de uma maneira mais precisa (CHARLES NORIEGA, 2000).

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, E. L.; STEPHENS, J. F. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. **Appl. Microbiol.**, v. 19, n. 5, p. 726-730, 1970.

CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. Avian Hematology. The Basics. **Vet. Clin. North Am. Small. Pract.**, v. 14, n. 2, p. 223-248, 1984.

CHARLES NORIEGA, M. I. V. C. Apuntes de hematologia aviar: material didático para curso de hematologia aviária. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. México, 2000. 70p. (**Apostila mimeo**).

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, 2004.

DALLOUL, R. A; LILLEHOJ, H. S.; SHELLEM, T. A; DOERR, J. A Intestinal immunomodulatory by vitamin A deficiency and *Lactobacillus*-based probiotic in *Eimeria acervulina* – infected broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 47, p. 1313-1320, 2003.

EDENS, F. W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotic. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003.

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

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

FERKET, P. R. Manutenção da saúde intestinal em um mundo sem antibióticos. In: RONDA LATINO AMERICANA DA ALLTECH, 13., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: Alltech, 2003, p. 26-39.

FERNANDES, P. C. C.; LADEIRA, I. Q.; FERREIRA, C. L. L. F.; RODRIGUEZ, N. M.; SILVA, A. V. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogátricos. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 31, p. 53-71, 2000.

FERREIRA, A. J. P.; PIZARRO, L. D. C. R.; LEME, I. L. Probióticos e prebióticos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002. p. 574-578.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.

GRECCHI, R.; SALIBA, A. M.; MARIANO, M. Morphological changes, surface receptors and fagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes *in vivo* and *in vitro*. **J. of Pathol.**, v. 130, p. 23-31, 1980.

HAMANN, L.; EL-SAMALOUTI, V.; ULMER, A. J.; FLAD, H. D.; RIETSCHER, E. T. Components of gut bacteria as immunomodulators. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 41, p. 141-154, 1998.

HODGES, R. D. Normal avian (poultry) haematology. In: ARCHER, R. K.; JEFFCOTT, L. B. (Ed.). **Comparative clinical haematology**. London: Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 483-517.

ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPAA, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 4445-4505, 2001.

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotic in poultry: modes of action. **World's Poultry Sci. J.** v. 53, p. 351-368, 1997.

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* culture. **Poultry Sci.** v. 77, p. 1259-1265, 1998.

KLASING, K. C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses. **Poultry Science**, v. 77, p. 983-989, 1998.

KUROGI, A. S.; BARBOZA, L. E. D.; OLIVEIRA, C. C.; CAVAZZANI, L. F. M.; BUCHI, D. F. Effect of Canova on mouse peritoneal macrophages. In: CONGRESS OF BRAZILIAN SOCIETY OF MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 19., 2003, Caxambu, MG. **Proceedings...** 2003.

LIMA, A. C. F.; PIZAURO, J. M.; MACARI, M. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **R. Bras. Zootec.** v. 32, n. 1, p. 200-207, 2003.

LODDI, M. M.; GONZALES, E.; TAKITA, T. S. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Rev. Bras. Zootec.** v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

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

MONTASSIER, H. J. Importância da imunidade em pintos na primeira semana. In: CPNFERÊNCIA APINCO, 1998. **Anais...** Campinas: APINCO, 1998. p. 99-120.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAM, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 231-246.

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; BUCHI, D. F. Effects of Canova on mouse peritoneal macrophages oxidative metabolism. In: CONFRESS OF BRAZILIAN SOCIETY OF MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 19., 2003, Caxambu, MG. **Proceedings...** LOCAL DE PUBLICAÇÃO DO EVENTO: EDITORA, 2003.

PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; HOLDAGO, A. P. R. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. **J. Dairy Res.** v. 58, p. 458-496, 1991.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGUERO, G.; GOBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. **J. Dairy Sci.** v. 78, p. 1597-1606, 1995.

QURESHI, M. A. BRAKE, I.; HAMILTON, P. B.; HAGLER, W. M.; NESHEIM, S. Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicks. **Poultry Science**, v. 77, p. 812-819, 1998.

QURESHI, M. A. Avian Macrophage and Immune Response: An Overview. **Poultry Science**, v. 82, p. 691-698, 2003.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in control of gastrointestinal health. **J. Nutr.** v. 130, p. 396S-402S, 2000.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, E. Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action. **J. Anim. Feed Sci.** v. 10, p. 51-67, 2001.

STURKIE, P. D. Blood: Physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: STURKIE, P. D. **Avian physiology**. New York: Springer-Verlag, 1976. p. 53-75

TOURNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, p. 179-199.

WINTROBE, M. M. Variations in size and hemoglobin content of eritrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia haematol.**, v. 51, p. 31, 1933.

ZULKIFLI, I.; ABDULLAH, N.; MOHD AZRIN, N.; HO, Y. W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus cultures* and oxytetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science**, v. 41, p. 593-597, 2000.

## **CAPITULO III - INFLUÊNCIA DE PROBIÓTICO NO DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE**

### **RESUMO**

As exigências dos consumidores por produtos de qualidade são cada vez maiores e a indústria avícola está tendo que se adequar a estas mudanças. Um exemplo é a proibição do uso de antibióticos na alimentação animal devido a possível indução de resistência bacteriana, contudo, a busca de alternativas a estes produtos está sendo alvo de muitas pesquisas e os probióticos se destacam com promessas de equilíbrio da microbiota intestinal e conseqüente melhora no desempenho zootécnico. O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência de um tipo de probiótico no desempenho de frangos de corte. Foram utilizados 1200 pintos de corte, criados até 42 dias de idade, em um delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (antibiótico, probiótico e controle) e 10 repetições com 40 aves cada. Os parâmetros avaliados foram ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade. Considerando-se o período total de criação e nas condições em que o experimento foi conduzido, não foi possível mostrar a influencia dos aditivos testados nos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Probiótico. Desempenho. Frango de corte.

## **INFLUENCE OF PROBIOTIC IN PERFORMANCE OF BROILERS**

### **ABSTRACT**

The exigencies of the consumers for quality products are bigger and the poultry industry has to adjust to these changes. An example is the prohibition of the antibiotic use in the animal feeding which can turn possible the induction of bacterial resistance. However, the search of alternatives to these products is being the target of many researches and the probiotics stands out with promises of balance of intestinal microbial and consequent improvement in the performance. The present study it was carried out to investigate the influence of a type of probiotic in the performance of broilers. They had been used 1200 broilers in a completely randomized design, with 3 treatments (antibiotic, probiotic and control) and 10 repetitions with 40 birds each. The evaluated parameters had been body weight gain, feed intake, feed conversion and mortality, in the different phases of creation. Considering the total period, in the conditions where the experiment was lead, it was not possible to show the influences it of additives tested in the evaluated parameters.

**Key words:** Probiotic. Performance. Broilers.

## 1 INTRODUÇÃO

A exigência com a qualidade de produtos de origem animal é cada vez maior e há uma crescente preocupação com seus efeitos sobre a população humana. Atualmente o que redobra a atenção é o impacto da produção sobre o meio ambiente e na saúde humana e animal, não havendo mais apenas o enfoque na alta produtividade (FERKET, 2003).

Há muitos anos é sabido que os antibióticos quando usados na alimentação animal, com a finalidade de promover crescimento, permitem a obtenção de um melhor desempenho zootécnico, fato este observado em diversos trabalhos científicos (DIBNER; RICHARDS, 2005; NETO, 2004). Porém, o crescente questionamento quanto a possível relação existente entre o uso de antimicrobianos na dieta animal e o aumento da resistência bacteriana nos animais e no homem, provocou a adoção de novas medidas para o controle do uso deste tipo de substância química (FERKET, 2003; FULLER, 1989; JIN 1997), embora os fatos ainda permaneçam incertos (JONES; RICKET, 2005; NETO, 2004).

Neste sentido, as autoridades de diversas regiões do mundo estão restringindo o uso dos antibióticos na criação animal e estabelecendo programas de vigilância e monitoramento de rotina, sugerindo que sejam banidos os antimicrobianos que pertençam à classe dos utilizados pelos seres humanos, a menos que avaliações de risco sejam realizadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000 apud DIBNER; RICHARDS, 2005).

A União Européia e outros países do mundo já estão impondo medidas restritivas quanto ao uso dos antibióticos. Até 2006, a Europa permitia apenas o uso de quatro promotores de crescimento: monensina, salinomicina, avilamicina e flavomicina; a partir deste ano, deve ocorrer a proibição total do uso de aditivos antimicrobianos na produção animal nestes países (MENTEN; LODDI, 2003). Nos Estados Unidos, por outro lado,

medidas são adotadas com enfoque maior em análises de risco, porém em muitos casos é a pressão do mercado consumidor preocupado com a qualidade dos produtos de origem animal e não o legislativo, que comanda o comércio dos antimicrobianos, provocando um urgente posicionamento das autoridades e a busca de novas alternativas para manter o alto desempenho zootécnico (DIBNER; RICHARDS, 2005).

Diante deste contexto, muitas pesquisas estão voltadas para a busca de alternativas que mantenham a alta produtividade e que sejam economicamente viáveis, sem prejudicar a saúde humana e animal, atendendo desta forma, as novas exigências do consumidor e do mercado externo. Dentre estas, destaca-se o uso dos probióticos que quando suplementados na dieta garantem isenção de resíduos medicamentosos nos produtos de origem animal e contribuem com a melhoria do desempenho e da saúde (FERREIRA et. al., 2002; FULLER, 1989; JIN 1997; PATTERSON; BURKHOLDER, 2003; ZULKIFLI et. al., 2000).

Antes da introdução de uma nova estratégia, especialmente nos períodos críticos da criação, é de grande importância a otimização do manejo na redução da dependência do uso dos antibióticos (FERKET, 2003).

Fuller (1989) define probiótico como um suplemento alimentar constituído de microorganismos vivos, que no organismo animal atuam de forma benéfica melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal.

Em equilíbrio, o trato intestinal consegue de forma mais eficiente absorver nutrientes e impedir a fixação e multiplicação de agentes patogênicos na mucosa intestinal (FERNANDES et al., 2000), prevenindo desta forma a instalação de doenças entéricas e conseqüentemente melhorando a produtividade, diminuindo a mortalidade e a contaminação dos produtos de origem animal (EDENS, 2003; ISOLAURI et al., 2001; PATTERSON; BURKHOLDER, 2003).

As principais cepas bacterianas utilizadas no preparo de probióticos são: *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* sp, *Enterococcus faecium* e *Bacillus* spp. (FERREIRA et al., 2002; SIMON et al., 2001).

Alguns autores não acreditam que as alternativas aos antibióticos atinjam os mesmos níveis de produtividade e que sejam capazes de atuar de forma terapêutica em problemas sanitários graves (FERKET, 2003).

Porém, diversos trabalhos realizados no Brasil com probióticos em frango de corte mostraram que, no que se refere ao desempenho, as respostas são praticamente equivalentes às apresentadas com o uso dos antibióticos (MENTEN; LODDI, 2003; ZULKIFLI et al., 2000). Diversos estudos apresentaram bons resultados na melhora do ganho de peso e conversão alimentar (EDENS, 2003; FERREIRA et al., 2002; JIN et al., 1998).

Também foram observadas características positivas no uso de probióticos quanto ao controle de patógenos tóxicos ao homem como, *Samonella* spp, *Campylobacter* sp, *Listeria* sp, *Escherichia coli*, dentre outras (FERREIRA et al., 2002).

Por outro lado, outros estudos não verificaram efeito positivo com a inclusão do probiótico sobre o desempenho das aves (LIMA et al., 2003; LODDI, 2000).

É possível encontrar na literatura uma diversidade de trabalhos mostrando efeitos positivos e negativos no que se refere ao uso dos probióticos (JIN et al., 1997).

Esta diversidade nos resultados pode estar relacionada a fatores externos (estresse e situação sanitária do galpão) e a fatores relacionados aos microrganismos utilizados (LIMA et al., 2003).

Portanto, comparar resultados fica muito difícil devido aos vários fatores interferentes e a grande diversidade de microrganismos utilizados como probióticos. Tournut (1998) relata a importância da análise separada dos probióticos, da mesma maneira como é feita com os antibióticos.

Para que seja obtido um efeito desejado de um probiótico é de grande importância assegurar que o microrganismo ingerido irá sobreviver à passagem pelo estômago e se proliferar no trato intestinal (JIN et al., 1998; FERREIRA et al., 2002).

Alguns modos de ação descritos na literatura tentam esclarecer os efeitos benéficos deste suplemento no desempenho animal e na resistência a doenças. Os principais são: competição por sítios de ligação, produção de substâncias antibacterianas, aumento da atividade enzimática, competição por nutrientes, supressão da produção de amônia, aumento da proliferação de células do epitélio intestinal, neutralização de enterotoxinas e estímulo ao sistema imune (FULLER, 1989; JIN, 1997; ROLFE, 2000; SAMANYA; YAMAUCHI, 2002).

Visando alta produtividade a baixo custo, os antibióticos promotores de crescimento vêm sendo utilizados de forma indiscriminada e em larga escala na produção animal há muitos anos. Atualmente, o uso destes aditivos nos animais está sendo questionado devido à possível relação destes, com o crescente desenvolvimento de resistência bacteriana em animais e no homem.

Com isso, muitas restrições estão sendo feitas, podendo ocorrer proibição total ao uso de aditivos antimicrobianos na produção animal em alguns países, principalmente na Europa.

Fica então a questão: como retirar os antibióticos promotores de crescimento da nutrição animal sem perder os altos níveis de produção que são obtidos atualmente?

Para resolver este problema vários centros de pesquisa e empresas buscam alternativas para manter a alta produtividade, sem prejudicar a saúde humana e animal. Dentre estas, se destaca o uso dos probióticos na alimentação com possíveis atuações benéficas para a produção e a saúde do animal.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de frangos de corte que receberam probiótico na ração durante de 1 a 42 dias de idade, através dos parâmetros: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, empregando-se galpão de alvenaria dividido em boxes, de 4,25 m<sup>2</sup> cada, sendo a criação em piso. O experimento teve início em 24 de março de 2005 e término em 4 de maio de 2005, totalizando 42 dias de criação.

O manejo e os equipamentos utilizados foram os convencionais para a criação de frangos de corte, com as devidas adaptações para um aviário experimental. As aves foram pesadas no primeiro dia do experimento e alojadas nos boxes experimentais. As temperaturas médias, máximas e mínimas foram anotadas diariamente, utilizando-se termômetros de bulbo seco localizados em dois pontos distintos do galpão. As condições de temperatura as quais as aves ficaram submetidas durante o período experimental permaneceram em média entre 20-28 °C.

Utilizaram-se 1200 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem AgRoss 308, criados até a idade de 42 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 10 repetições/tratamento. Os animais foram distribuídos em 30 parcelas experimentais com 40 aves em cada uma.

As rações experimentais foram formuladas de acordo com os níveis nutricionais rotineiramente praticados na criação comercial de frangos de corte, sendo adicionado ao primeiro tratamento um antibiótico promotor de crescimento (avilamicina), ao segundo um probiótico e ao terceiro tratamento nenhum tipo de suplementação foi empregada (controle). Os diferentes tratamentos foram estabelecidos a partir da substituição do produto em estudo

(Antibiótico ou Probiótico) pelo equivalente em peso de material inerte (areia). Foram utilizadas rações isoprotéicas e isocalóricas, elaboradas a base de milho e soja (Tabela 1).

A composição dos suplementos vitamínicos minerais utilizados está representada na tabela 2.

Tabela 1- Composição percentual e análise calculada das rações experimentais nas diferentes fases de criação

Ingredientes	Ração Inicial (%)	Ração Crescimento (%)	Ração Final (%)
Milho	52,26	57,11	63,70
Farelo de Soja	40,13	34,00	28,00
Óleo de Soja	3,52	4,90	4,5
Sal	0,35	0,35	0,35
Calcário	1,24	1,60	1,60
Fosfato Bicálcico	1,60	1,14	0,95
Metionina	0,24	0,21	0,18
Suplemento Vit-Min <sup>1</sup>	0,30	0,30	0,30
Antibiótico	0,01	0,01	0,01
Probiótico	0,20	0,20	0,20
Inerte	0,15	0,18	0,21
Total	100	100	100
<b>ANÁLISE CALCULADA</b>			
Energia metabolizável (kcal/kg)	2950	3100	3150
Proteína (%)	22,5	20,0	18,0
Metinina (%)	0,35	0,32	0,30
Metionina + cistina (%)	0,71	0,65	0,60
Cálcio (%)	0,95	0,95	0,90
Fósforo disponível (%)	0,45	0,35	0,30

<sup>1</sup>Níveis das misturas do suplemento vitamínico mineral utilizado estão presentes na tabela 2.

Tabela 2 - Composição dos suplementos vitamínico-minerais (Vit.-Min.) utilizados.

Suplemento Vit.-Min. Inicial	Vit. A, 2250000UI; vit. D <sub>3</sub> , 450000UI; vit. K, 360mg; vit. B <sub>2</sub> , 1130mg; vit. B <sub>12</sub> , 3750mcg; niacina, 7465mg; colina, 62250mg; pantotenato de cálcio, 2580mg; ferro14000mg; cobre, 12500mg; manganês, 14500mg; cobalto, 21mg; iodo, 150mg; selênio, 52mg; antioxidante (BHT), 1280mg; veículo qsq 1000g.
Suplemento Vit.-Min. Crescimento	Vit. A, 1875000UI; vit. D <sub>3</sub> , 375000UI; vit. K, 270mg; vit. B <sub>2</sub> , 900mg; vit. B <sub>12</sub> , 2500mcg; niacina, 6270mg; colina, 48800mg; pantotenato de cálcio, 1990mg; ferro14000mg; cobre, 1750mg; manganês, 14500mg; cobalto, 21mg; iodo, 150mg; selênio, 43mg; antioxidante (BHT), 1280mg; veículo qsq 1000g.
Suplemento Vit.-Min. Final	Vit. A, 1875000UI; vit. D <sub>3</sub> , 375000UI; vit. K, 270mg; vit. B <sub>2</sub> , 900mg; vit. B <sub>12</sub> , 2500mcg; niacina, 6270mg; colina, 48800mg; pantotenato de cálcio, 1990mg; ferro14000mg; cobre, 1750mg; manganês, 14500mg; cobalto, 21mg; iodo, 150mg; selênio, 43mg; antioxidante (BHT), 1280mg; veículo qsq 1000g.

Não foi adicionada à ração nenhum tipo anticoccidiano ou qualquer outra droga ou aditivo que não os em estudo.

As aves foram vacinadas contra coccidiose na primeira semana de vida. Foi utilizada vacina viva atenuada, administrada via água de bebida conforme recomendações do fabricante.

A composição do probiótico empregado foi: *Lactobacillus acidophilus* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC), *Streptococcus faecium* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC) e *Bifidobacterium bifidum* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC), na dose 2kg/ton de ração, durante toda a fase de criação. O produto citado é produzido e comercializado sob o nome DBA<sup>®</sup> pela Empresa IMEVE.

Para as análises de desempenho foram determinados os seguintes parâmetros aos 07, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade:

Ganho de peso médio – determinado pela diferença entre as pesagens semanais e divididas pelo número de aves contidas no box.

Consumo de ração - obtido pela diferença entre a ração fornecida e a sobra de cada parcela e dividida pelo número de aves do box.

Conversão alimentar – obtida pela relação entre o consumo total de ração e o ganho de peso em cada parcela (g de ração/g de ganho).

Mortalidade – anotada diariamente e calculada pela relação entre o número de aves que morreram no período experimental pelo número inicial de aves na parcela e multiplicada por cem.

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste de Hartley (OTT, 1983). Os dados foram submetidos à análise de variância e os efeitos de tratamento separados através do teste de Tukey. Tal análise foi realizada utilizando-se procedimento General Linear Model (PROC GLM do SAS).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e mortalidade (Mort) de frangos de corte submetidos aos diferentes tratamentos, nos intervalos entre o início da criação até 07, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade, estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Ganho de peso médio (GP), consumo de ração médio (CR), conversão alimentar (CA) e mortalidade (Mort) de frangos de corte nos intervalos de criação 0-7, 0-14, 0-21, 0-28, 0-35 e 0-42 dias de idade sob os diferentes tratamentos

Parâmetros	Tratamentos			P	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
<b>0 – 7 dias</b>					
GP (g)	116,9 <b>a</b>	111,2 <b>b</b>	110,4 <b>b</b>	0,0012	4,16
CR (g)	101,4 <b>a</b>	97,7 <b>b</b>	99,0 <b>ab</b>	0,0377	3,38
CA (g/g)	0,87	0,88	0,90	0,1155	3,75
Mort (%)	0,25	0,00	1,00	0,1294	276,68
<b>0 – 14 dias</b>					
GP (g)	367,8 <b>a</b>	353,3 <b>b</b>	356,4 <b>b</b>	0,0051	3,10
CR (g)	457,7	468,6	475,9	0,5572	3,54
CA (g/g)	1,29	1,30	1,34	0,0932	3,44
Mort (%)	1,00 <b>ab</b>	0,25 <b>b</b>	1,75 <b>a</b>	0,0529	140,81
<b>0 – 21 dias</b>					
GP (g)	730,0 <b>a</b>	716,6 <b>ab</b>	699,0 <b>b</b>	0,0580	4,14
CR (g)	1107,7	1094,6	1100,3	0,6853	2,98
CA (g/g)	1,52	1,53	1,58	0,1474	4,59
Mort (%)	5,00	4,00	5,25	0,5539	55,89
<b>0 – 28 dias</b>					
GP (g)	1306,6 <b>a</b>	1276,2 <b>ab</b>	1255,8 <b>b</b>	0,0133	3,17
CR (g)	2102,0	2090,0	2085,9	0,8202	3,75
CA (g/g)	1,61	1,64	1,66	0,1403	3,73
Mort (%)	7,75	7,00	8,25	0,6605	39,18
<b>0 – 35 dias</b>					
GP (g)	2018,0 <b>a</b>	1974,0 <b>ab</b>	1962,9 <b>b</b>	0,0317	2,57
CR (g)	3373,9	3358,7	3345,0	0,7177	2,29
CA (g/g)	1,67	1,70	1,71	0,2920	2,94
Mort (%)	7,75	7,25	8,25	0,7649	38,22
<b>0 – 42 dias</b>					
GP (g)	2635,5	2624,3	2585,7	0,1839	2,42
CR (g)	659,6	4623,7	4593,9	0,2235	1,82
CA (g/g)	1,77	1,76	1,78	0,6539	2,09
Mort (%)	10,50	9,75	11,00	0,7176	32,19

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

CV(%) – coeficiente de variação.

Para o parâmetro ganho de peso, nos períodos de 0 - 7 dias e 0 - 14 dias de idade, o grupo que recebeu antibiótico apresentou maiores valores quando comparados ao grupo tratado com probiótico e o grupo controle ( $p < 0,05$ ), estes últimos não apresentaram diferenças entre si. Nos períodos entre 0 - 21, 0 - 28 e 0 - 35 dias de idade, o grupo que recebeu antibiótico apresentou novamente maiores valores de ganho de peso, porém apenas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e o grupo tratado com probiótico não apresentou diferença estatística em relação aos demais. No estudo de Ramarao et al. (2004) também não foi possível observar influência do probiótico no ganho de peso de frangos de corte, contrariando os resultados obtidos por Kabir et al. (2004) que observaram maior ganho de peso nas aves tratadas com probiótico em relação ao controle em todas as fases de criação analisadas (2°, 4°, 5° e 6° semanas de idades).

Zulkifli et al. (2000), por outro lado, observaram uma equivalência no que se refere ao ganho de peso das aves tratadas com probiótico e antibiótico, encontrando valores maiores em relação ao controle, no período de 0-21 dias de idade e diferentemente do encontrado no presente estudo, no período total de criação (0-42 dias de idade), observaram que os animais tratados com probiótico apresentaram maior ganho de peso em relação aos demais grupos. Boratto et al. (2004), assim como Zulkifli et al. (2000), observaram maior ganho de peso no grupo tratado com probiótico em relação ao controle, mas sem diferença do grupo que recebeu antibiótico, porém apenas na fase inicial, nos demais períodos não observaram diferença para este parâmetro. Jin et al. (1998) obtiveram maiores valores de ganho de peso no grupo tratado com probiótico em relação ao controle no período de 0 - 21 dias e no período entre 0 - 42 dias este fato se repetiu.

Para o parâmetro consumo de ração, apenas no período inicial de 0-7 dias de idade, foi observada diferença significativa entre os tratamentos, sendo o grupo tratado com antibiótico

o que apresentou maior valor de consumo de ração quando comparado ao grupo que recebeu probiótico ( $p < 0,05$ ) e as médias obtidas com os grupos que receberam os aditivos estudados, não diferiram do grupo controle. Para os outros intervalos, não foi apresentada diferença estatística entre os tratamentos. Esta ausência de influência dos aditivos em estudo no consumo de ração em relação ao controle também foi observada por Maiorka et al. (2001) e Pelicano et al. (2004a).

Entretanto, em outros experimentos, foi possível observar a influência do probiótico e antibiótico no consumo de frangos de corte. Corrêa et al. (2003) ao testar diferentes probióticos na dieta de frangos de corte, observaram menor consumo de ração no grupo que recebeu probiótico em relação ao controle no período de 0 – 21 dias de idade, fato também observado por Zulkifli et al. (2000). Boratto et al. (2004), por outro lado, observaram neste mesmo período, maior consumo de ração no grupo que recebeu probiótico em relação ao controle e semelhante ao grupo que recebeu antibiótico.

A mortalidade diferiu apenas no intervalo entre 0-14 dias de idade, sendo maior no grupo controle quando comparado ao grupo que recebeu probiótico ( $p < 0,05$ ) e o grupo tratado com antibiótico não apresentou diferença quando comparado aos demais. Considerando-se os outros períodos de criação, não foi possível demonstrar nenhuma influência dos aditivos na mortalidade, contrariando os resultados de Pelicano et al. (2004a) que em estudo do uso de probióticos e prebióticos em frangos de corte, observou melhor viabilidade com o uso destes aditivos na dieta.

Para o parâmetro conversão alimentar, não foi apresentada diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos intervalos apresentados, fato também observado em experimento de Loddi et al. (2000). Porém em outros estudos foi mostrada diferença, sendo a conversão alimentar melhor no grupo que recebeu probiótico no período de 0 – 21 dias (CORRÊA et al, 2003; MAIORKA et al, 2001; PELICANO et al. 2004a; ZULKIFLI et al.,

2000) e 0 – 40 dias (BORATTO et al., 2004; MAIORKA et al., 2001) observaram melhor conversão alimentar no grupo tratado com antibiótico no período até 21 dias de idade.

Considerando-se o período total de criação, desde o primeiro dia até 42 dias de idade, para todos os parâmetros estudados, não foi apresentada diferença estatística entre os tratamentos, resultado também observado em trabalho de Boratto et al. (2004), Lima et al. (2003) e Pelicano et al. (2004b).

Melhores resultados com o uso de probióticos na dieta de frangos de corte foram observados no período inicial de criação, entre 0 - 21 dias de idade, fato que não se manteve no período entre 0 - 35 dias tão pouco no período total de criação nos estudos de Pelicano et al. (2004a).

As condições de criação podem influenciar de forma direta na eficiência dos aditivos promotores de crescimento (BORATTO, 2004; TAKAHASHI et al., 1997). Práticas adequadas de manejo, como as utilizadas neste experimento, podem levar a resultados que não mostrem efeito significativo dos aditivos no desempenho das aves.

A presença de situações de desafio sanitário, bem como qualquer situação de estresse e a relação entre o número e o tipo de microorganismos viáveis presente no probiótico, podem estar relacionadas com a eficiência de ação deste produto (LIMA et al., 2003). Como a eficácia do probiótico está muito dependente destes fatores, fica difícil a comparação entre os diferentes estudos (BORATTO, 2004; LODDI et al., 2000), além da grande diversidade existente entre os tipos de probióticos, vias de administração e condições experimentais adotados nos trabalhos citados na literatura (BORATTO, 2004).

#### 4 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do presente estudo os aditivos empregados às dietas dos frangos de corte não influenciaram nos parâmetros de desempenho avaliados, considerando-se o período total de criação.

## REFERÊNCIAS

BORATTO, A. J. Uso de antibiótico, de probiótico e de homeopatia, inoculados ou não com *Escherichia coli*, para frangos de corte criados em conforto. **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n. 6, p. 1477-1485, 2004.

CORRÊA, G. S. S. Efeitos de antibiótico e probióticos sobre desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 4, 2003.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotics growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, p. 634-643, 2005.

EDENS, F. W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotic. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003.

FERKET, P. R. Manutenção da saúde intestinal em um mundo sem antibióticos. In: RONDA LATINO AMERICANA DA ALLTECH, 13., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: Alltech, 2003, p. 26-39.

FERNANDES, P. C. C. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogátricos. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 31, p.5 3-71, 2000.

FERREIRA, A. J. P.; PIZARRO, L. D. C. R.; LEME, I. L. Probióticos e prebióticos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002. p. 574-578.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.

ISOLAURI, E. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 4445-4505, 2001.

JIN, L. Z. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* culture. **Poultry Science**, v. 77, p. 1259-1265, 1998.

JIN, L. Z. Probiotic in poultry: modes of action. **World's Poultry Sci. J.** v. 53, p. 351-368, 1997.

JONES, E. T.; RICKET, S. C. Symposium: Antibiotics in Animal Feeds: are there viable alternatives? – Introduction. **Poultry Science**, v. 84, p. 633, 2005.

KABIR, S. M. L.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. B.; RAHMAN, M. M.; AHMED, S. U. The Dynamics of Probiotics on Growth Performance and Immune Response in Broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 5, p. 361-364, 2004.

LIMA, A. C. F. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **R. Bras. Zootec.** v. 32, n. 1, p. 200-207, 2003.

LODDI, M. M. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Rev. Bras. Zootec.** v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M.; ALMEIDA, J. G.; MACARI, M. Utilização de prébióticos, probióticos e simbióticos em dietas para frangos. **Ver. Bras. Cienc. Avic.** v. 3, n. 1, 2001.

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

OTT, R. L. **An introduction to statistical methods and data analysis.** Wadsworth, 1983.

PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, R. A.; SOUZA, H. B. A.; LEONEL, F. R.; ZEOLA, N. M. B. L.; BOIAGO, M. M. Productive traits of broiler chickens fed diets containing different growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 3, p. 177-182, 2004a.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, R. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, B. A.; KODAWARA, B. A.; LIMA, T. M. A. Performance of broilers fed diets containing natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2004b.

RAMARAO, S. V.; REDDY, M. R.; RAJU, M. V. L. N.; PANDA, A. K. Growth, nutrient utilization competence in broiler chicken fed probiotic, gut acidifier and antibacterial compounds. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 39, n. 2, p. 125-130, 2004.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, v. 130, p. 396S-402S, 2000.

SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 95-104, 2002.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. 5. ed., Cary: SAS, 1985.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, E. Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action. **J. Anim. Feed Sci.** v. 10, p. 51-67, 2001.

TAKAHASHI, K.; AKIBA, Y.; MATSUDA, A. Effect of probiotic on immune responses in broiler chicks under different sanitary conditions or immune activations. **Animal Science and Technology**, v. 68, n. 6, p. 537-544, 1997.

TOURNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, p. 179-199.

ZULKIFLI, I. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus cultures* and oxytetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science**, v. 41, p. 593-597, 2000.

## **CAPITULO IV - INFLUÊNCIA DE PROBIÓTICO EM PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE**

### **RESUMO**

Devido à escassez de estudos relacionando o efeito dos probióticos com a imunidade das aves, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo estudar os efeitos deste suplemento em alguns parâmetros da resposta imune de frangos de corte. Foram utilizados 1200 pintos de corte de 1 a 42 dias de idade, em um delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (antibiótico, probiótico e controle) e 10 repetições com 40 aves cada. Os parâmetros avaliados foram: resposta à vacina de Newcastle, atividade de macrófagos peritoneais (fagocitose e produção de água oxigenada), resposta cutânea à fitoemaglutinina e peso dos órgãos linfóides. Nas condições em que o experimento foi conduzido não foi possível observar influência do probiótico na resposta imune de macrófagos, linfócitos T e alteração de peso de órgãos linfóides nas idades avaliadas e com os métodos utilizados. Entretanto, foi possível observar resposta positiva do probiótico em relação ao antibiótico no que diz respeito à produção de anticorpos em resposta à vacina de Newcastle, porém, sem diferir do controle.

Palavras-chave: Probiótico. Resposta imune. Frangos de corte.

## INFLUENCE OF PROBIOTIC IN PARAMETERS OF THE IMMUNE RESPONSE OF BROILERS

### ABSTRACT

Due to the scarcity of studies that relate the effect of probiotics with the immunity of broilers, this research paper had as an objective, to study the effect of this supplement in some parameters of the immune response of broilers. 1200 broilers were used, bred up to 42 days of age, in a completely randomized design, with 3 treatments (antibiotic, probiotic and control) and 10 repetitions with 40 birds each. The parameters evaluated were: the response to the vaccine of Newcastle, activity of peritoneal macrophages (phagocytic function and hydrogen peroxide production), cutaneous response to the phytohemagglutinin and weight of the lymphoid organs. In the conditions in which the experiment was led, it was not possible to observe an influence from the probiotic in the immune response of macrophages, T lymphocytes and alteration of weight of lymphoid organs in the evaluated ages and with the used methods. However, it was possible to observe positive response from the probiotic in comparison to the antibiotic, regarding the production of antibodies in response to the vaccine of Newcastle, still, without differing from the control.

Key Words: Probiotic. Imune response. Broilers.

## 1 INTRODUÇÃO

Saúde e segurança pública são hoje as maiores preocupações mundiais no que diz respeito à produção animal. A exigência com a qualidade de produtos de origem animal é cada vez maior, e há um crescente interesse nos efeitos sobre a população humana. Ainda, o que redobra a atenção mundial é o impacto da produção sobre o meio ambiente e na saúde humana e animal, não havendo mais apenas o enfoque na alta produtividade (FERKET, 2003).

Há muitos anos é sabido que os antibióticos usados na alimentação animal, com a finalidade de promover crescimento, permitem a obtenção de um melhor desempenho zootécnico, fato este observado em diversos estudos (DIBNER; RICHARDS, 2005). Porém, o crescente questionamento acerca da possível relação existente entre o uso de antimicrobianos na dieta animal e o aumento da resistência bacteriana nos animais e no homem, provocou a adoção de novas medidas que controlassem o uso deste tipo de substância química na criação animal (FERKET, 2003; FULLER, 1989; JIN 1997), embora os resultados existentes ainda permaneçam incertos (JONES; RICKET, 2005).

Neste sentido, as autoridades de diversas regiões do Mundo estão restringindo o uso destes promotores na criação animal e estabelecendo programas de vigilância e monitoramento de rotina, sugerindo, ainda, que os antimicrobianos que pertençam à classe daqueles empregados para terapêutica humana sejam banidos, a menos que avaliações de risco sejam realizadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000 apud DIBNER; RICHARDS, 2005).

Em muitos casos é a pressão do mercado consumidor preocupado com a qualidade dos produtos de origem animal, e não o legislativo, que comanda o comércio dos antimicrobianos,

provocando um urgente posicionamento das autoridades governamentais e a busca de novas alternativas para manter o alto desempenho zootécnico (DIBNER; RICHARDS, 2005).

Diante deste contexto, muitas pesquisas estão voltadas para a busca de alternativas que mantenham a alta produtividade e que sejam economicamente viáveis, sem prejudicar a saúde humana e animal, atendendo desta forma, as novas exigências do consumidor e do mercado externo. Dentre estas, destaca-se o uso dos probióticos que, quando suplementados na dieta, garantem isenção de resíduos medicamentosos nos produtos de origem animal e contribuem com a melhoria do desempenho e da saúde do animal (FERREIRA et al., 2002; FULLER, 1989; JIN 1997; PATTERSON; BURKHOLDER, 2003; ZULKIFLI et al., 2000).

Fuller (1989) define probiótico como um suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos, que no organismo animal atuam de forma benéfica melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal.

Altos níveis zootécnicos na produção de frangos dependem diretamente da homeostase do sistema imune. É por meio dos componentes celulares e moleculares deste sistema que o organismo animal consegue se manter livre de patógenos, oportunistas ou não. Assim, o manutenção da imunocompetência dos animais de produção é extremamente desejoso, uma vez que fatores exógenos que desencadeiem nestes animais a imunossupressão, e consequentemente a ocorrência de processos infecciosos, podem resultar em queda nos índices zootécnicos e prejuízos econômicos relevantes ao produtor.

A resposta imune humoral é caracterizada pela participação de imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos séricos, que são produzidos por plasmócitos derivados de linfócitos B ativados e diferenciados após contato e reconhecimento antigênico prévio (MONTASSIER, 1998). Já a resposta imune celular diferencia-se da humoral, pelo fato de haver a participação de linfócitos T efetores, que se desenvolvem após o estímulo antigênico sobre os linfócitos T auxiliares. Os leucócitos polimorfonucleares (heterófilos e eosinófilos), os trombócitos, as

células endoteliais, os monócitos e basófilos atuam como células efetoras na mediação dos processos inflamatórios da resposta imune inata (MONTASSIER, 1998).

Os macrófagos são células fagocíticas didaticamente consideradas como sendo a primeira frente de defesa contra antígenos invasores. Além da atividade fagocítica, estas células exercem inúmeras outras funções, dentre elas: o reconhecimento antigênico e processamento destes antígenos no interior de fagossomos sejam eles de origem bacteriana, viral ou tumoral, para posterior apresentação antigênica para linfócitos, quimiotaxia, e produção de mediadores químicos importantes, as citocinas, para a ativação adequada do sistema imune adquirido (mediado por linfócitos B e T). A participação de macrófagos é fundamental para a regulação da resposta imunológica e desempenham importante função de união entre resposta imune inata e adquirida (KLASING, 1998; KUROGI, et al., 2003; QURESHI, 1998; QURESHI, 2003). Ainda, as funções destas células podem ser moduladas de acordo com fatores nutricionais, genéticos e ambientais (QURESHI, 2003).

A fagocitose não é um processo simples, nela estão envolvidas várias etapas nas quais ocorrerão: ingestão, morte e digestão do antígeno. A destruição do microrganismo englobado ocorre através de mecanismos oxidativos (oxigênio e nitrogênio reativos) ou não oxidativos (hidrolases ácidas, lisozimas e proteínas catiônicas), sem haver necessidade de transcorrer muito tempo após o estímulo (KUROGI, et al., 2003; OLIVEIRA, et al., 2003).

Uma resposta imune eficiente está intimamente relacionada com a presença de nutrientes imunomoduladores na dieta (QURESHI, 2003), estes vão atuar diminuindo o estresse imunológico e desta forma, impedindo a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam ligadas com a produção animal, não prejudicando, desta forma, o desempenho zootécnico do mesmo (FERKET, 2003).

Relatos de literatura indicam que os vários tipos de probióticos existentes possuem algum efeito imunomodulador (COPPOLA; TURNES, 2004), acredita-se que as alterações

imunológicas induzidas pelos probióticos não estão limitadas à imunidade local da mucosa intestinal, há também relatos de efeitos sobre a resposta imune sistêmica (ERICKSON; HUBBARD, 2000; PERDIGON et al., 1995).

Os gêneros de bactérias que estão diretamente relacionadas com o aumento da imunidade das aves são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, principalmente quando relacionadas com doenças que afetam o trato intestinal (ERICKSON; HUBBARD, 2000; MENTEN; LODDI, 2003).

Há hipóteses de que são os produtos da parede celular das bactérias (peptídeoglicanos e lipopolissacárides) que compõem os probióticos que co-estimulam a indução da resposta imune (ERICKSON; HUBBARD, 2000; ROLFE, 2000). Pequenas quantidades destes componentes são liberadas constantemente na luz intestinal das aves o que vai ser aumentado quando da ocorrência de processos infecciosos; sendo estes, fundamentais no desenvolvimento e manutenção da função do sistema imune (HAMANN et al., 1998).

Células endoteliais, macrófagos, células da musculatura lisa e neutrófilos são ativados por estes componentes da parede celular e em resposta liberam outros mediadores químicos, por exemplo: citocinas, metaloproteínas (elastase e catepsina), prostaglandinas, bem como metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio (ERICKSON; HUBBARD, 2000).

Quanto ao efeito dos probióticos na imunidade, foram observados: aumento na produção de citocinas e atividade fagocítica de macrófagos (EDENS, 2003; ERICKSON; HUBBARD, 2000; FERREIRA et al., 2002), aumento da produção das imunoglobulinas IgA, IgM, IgG e ativação de linfócitos *natural killer*, linfócitos CD3, CD4 e CD8 (EDENS, 2003; JIN et al., 1997), proliferação de linfócitos T e produção de interferon (JIN et al., 1997).

Perdigon et al. (1991) observaram que *Lactobacilos* quando suplementados na ração de camundongos aumentam a produção de IgA secretora, fato este observado pelo aumento de celularidade nas Placas de Peyer, aumento este suficiente para prevenir infecções entéricas

(ERICKSON; HUBBARD, 2000), reduzindo desta forma, o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (JIN et al., 1997).

Embora haja diversos estudos voltados para a prevenção de doenças e o aumento da resposta imune quando da ingestão de probióticos, principalmente na medicina humana, os mecanismos específicos de ação ainda não estão bem esclarecidos (ERICKSON; HUBBARD, 2000; FERREIRA et al., 2002; MENTEN; LODDI, 2003). Muito pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa intestinais dos probióticos nas aves (DALLOUL, 2003; FERKET, 2003).

Entre os testes específicos, propostos por pesquisadores, para avaliar a resposta imune das aves, estão: a resposta vacinal, a resposta cutânea basofílica à fitoemaglutinina (BACON, 1992) e o peso dos órgãos linfóides primários e secundários (AL-AFALEQ; HOMEIRA, 1998; BROWN-BORG; EDENS, 1992; GONE; QURESHI, 1997; TAKAHASHI et al., 1991), como sendo métodos possíveis de avaliação da imunocompetência das aves.

Diferente dos testes que apenas mensuram a estrutura do sistema imune são os testes funcionais que possibilitam avaliar a competência do sistema imune em responder a um determinado estímulo. Em aves, o teste mais comum aplicado *in vivo* é a resposta cutânea à fitoemaglutinina (PHA), o qual avalia a resposta imune mediada por células T (CORRIER; DELOACH, 1990; FAIRBROTHER et al., 2004). A PHA é uma lecitina, que quando injetada na região intradérmica das aves, estimula a proliferação e diferenciação de linfócitos T e liberação de citocinas, resultando em uma resposta inflamatória que ocorre em um tempo máximo de 12 – 24 horas (FAIRBROTHER et al., 2004).

Testes *in vitro* podem ser utilizados para mensurar a atividade fagocítica de macrófagos em aves. As células são incubadas com células de leveduras e o número de macrófagos que fagocitaram estas partículas é mensurado, obtendo-se uma porcentagem de macrófagos que realizaram fagocitose. Após a ingestão das partículas, os macrófagos

freqüentemente liberam  $O_2$  reativo para matar ou degradar as partículas e esta produção também pode ser mensurada (FAIRBROTHER et al., 2004).

Por ser considerada uma primeira ativação de toda uma resposta imune subsequente, julga-se importante a mensuração da atividade fagocítica dos macrófagos. É após a fagocitose que uma grande variedade de mediadores químicos é liberada, resultando em recrutamento de células imunocompetentes e com isso uma resposta imunológica sistêmica (ISOLAURI et al., 2001).

As técnicas para análise da taxa de fagocitose e de liberação de água oxigenada ( $H_2O_2$ ), pela oxidação do vermelho de fenol, são de fácil execução, baixo custo e não requerem equipamentos sofisticados para sua realização (MORI et al., 2001).

Devido à escassez de estudos relacionando o efeito dos probióticos com a imunidade das aves, o presente trabalho de pesquisa esteve voltado para obtenção de maiores esclarecimentos sobre a influência deste suplemento em alguns parâmetros da resposta imune de frangos de corte.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, empregando-se galpão de alvenaria dividido em boxes, de 4,25 m<sup>2</sup> cada, sendo a criação em piso. O experimento teve início em 24 de março de 2005 e término em 4 de maio de 2005, totalizando 42 dias de criação.

O manejo e os equipamentos utilizados foram os convencionais para a criação de frangos de corte, com as devidas adaptações para um aviário experimental. As aves foram pesadas no primeiro dia do experimento e alojadas nos boxes experimentais, as temperaturas médias, máximas e mínimas foram anotadas diariamente, utilizando-se termômetros de bulbo seco localizados em dois pontos distintos do galpão. As condições de temperatura as quais as aves ficaram submetidas durante o período experimental permaneceram em média entre 20-28°C.

Utilizam-se 1200 pintos de um dia, machos, da linhagem AgRoss 308, criados até a idade de 42 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 10 repetições/tratamento. Os animais foram distribuídos em 30 parcelas experimentais com 40 aves em cada uma.

As rações experimentais foram formuladas de acordo com os níveis nutricionais rotineiramente praticados na criação comercial de frangos de corte, sendo adicionado ao primeiro tratamento um antibiótico promotor de crescimento (avilamicina), ao segundo um probiótico e ao terceiro tratamento nenhum tipo de suplementação foi empregada (controle). Foram utilizadas rações isoprotéicas e isocalóricas, elaboradas a base de milho e soja (Tabelas 1 e 2 Capítulo III).

Não foi adicionado à ração nenhum tipo anticoccidiano ou qualquer outra droga ou aditivo que não os em estudo.

As aves foram vacinadas contra coccidiose na primeira semana de vida. Foi utilizada vacina viva atenuada, administrada via água de bebida e conforme recomendações do fabricante.

A composição do probiótico empregado foi: *Lactobacillus acidophilus* (3,5 x 10<sup>11</sup> UFC), *Streptococcus faecium* (3,5 x 10<sup>11</sup> UFC) e *Bifidobacterium bifidum* (3,5 x 10<sup>11</sup> UFC), na dose 2kg/ton de ração, durante toda a fase de criação. O produto citado é produzido e comercializado sob o nome DBA® pela Empresa IMEVE.

## 2.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL – RESPOSTA Á VACINA DE NEWCASTLE

Todas as aves do experimento foram vacinadas contra a Doença de Newcastle aos 14 dias de idade pela via ocular ou nasal, com vacina liofilizada, cepa VG/GA, viva e atenuada. A dose vacinal utilizada foi a recomendada pelo fabricante (0,03 ml) e utilizou-se o diluente do fabricante, na proporção de 30 ml/1000 doses vacinais/ 1000 aves.

Amostras de sangue para a avaliação dos títulos séricos de anticorpos anti-Newcastle foram coletadas de 20 aves de cada tratamento (duas de cada unidade experimental), identificadas individualmente e, portanto permitindo a coleta das mesmas aves aos 14, 28, 35 e 42 dias de idade, por punção da veia ulnar. Estas foram colocadas em tubos eppendorf sem anticoagulante e centrifugados para obtenção do soro. Posteriormente foram feitas avaliações da produção de anticorpos medidos através do ensaio imunoenzimático – kit ELISA

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), produzido pela empresa Idexx Laboratórios e utilizando-se da metodologia descrita por Purchase et al. (1989).

## 2.2 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Na cavidade peritoneal de 20 aves de cada tratamento (duas de cada unidade experimental), com 21 dias de idade, foram injetados 1ml para cada 200g de peso corpóreo de solução de Sephadex (Sephadex G-50 Fine a 3% em solução salina 0,9%), com a finalidade de atrair macrófagos para a cavidade, visto que nas aves estas células não estão presentes no líquido peritoneal em quantidade suficiente para coleta.

Quarenta e oito horas após a inoculação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Na cavidade peritoneal inoculou-se 20 ml de meio RPMI - 1640 e após o massageamento da região, para o desprendimento das células, o lavado peritoneal foi aspirado e transferido para tubos plásticos que ficaram mantidos em gelo.

A determinação do número de células de cada amostra foi realizada através de contagem em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade das células determinada pela técnica de exclusão de Azul de Tripán, onde apenas as células não viáveis coram-se em azul.

Foram tomadas alíquotas destas amostras para posterior realização dos testes de fagocitose e produção de água oxigenada.

### 2.2.1 Fagocitose

Foram tomadas alíquotas das amostras citadas no item 2.2. para o teste de fagocitose. Estas foram resuspensas em 1ml de meio RPMI - 1640, para padronizar uma concentração de  $2 \cdot 10^6$  cels/ml, para então serem distribuídas em placas de cultivo (placas de 24 *wells* com lamínulas redondas de vidro n° 13), sendo colocados 200µl da amostra em cada *well* e mantidas 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente realizou-se lavagem com PBS, adição de 1 ml de meio RPMI - 1640 e de 7µl de parede de células mortas de *Scharomyces cerevisiae* (Zymosan). As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 41°C por 1h. Logo após este período, as células não aderentes foram removidas, através de nova lavagem com PBS. Finalmente, foi adicionado glutaraldeído 0,5% para conservação e fixação das células.

As lamínulas redondas foram coradas com Panótipo LB, para posterior leitura em microscópio de contraste de fase, em aumento de 100x em imersão.

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

### 2.2.2 Produção de Água Oxigenada

A liberação de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pelos macrófagos foi quantificada pelo método baseado na oxidação do vermelho de fenol pela H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dependente de peroxidase, segundo

método de Pick e Keisari (1980), adaptado por Pick e Mizel (1981) e modificado por Russo et al. (1989).

Foram tomadas alíquotas das amostras citadas no item 2.2. para o teste de produção de água oxigenada. Estas foram resuspensas em 1ml de *Phenol Red*, para padronizar uma concentração de  $2.10^6$  céls/ml, para então serem plaqueadas (placas de 96 wells). Em metade de cada amostra plaqueada foi adicionado *phorbol myristate acetate* (PMA), conhecido como potencializador da produção de  $H_2O_2$  pelos macrófagos, utilizado como controle positivo (OLIVEIRA et al.,2003). Cada grupo foi então analisado com ou sem a presença de PMA.

As placas ficaram em estufa de  $CO_2$  5% a  $41^\circ C$  por 1h e após este período foi adicionado 10 $\mu$ l de NaOH (1M) para parar a reação.

A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada através da leitura da absorbância em leitor de ELISA utilizando filtro de 620 nm. A produção de peróxido de hidrogênio foi então calculada com base nos valores de absorbância obtidos para valores de diluições 1:10, 1:40, 1:80 e 1:160 da curva padrão. Os resultados estão apresentados em nmoles de  $H_2O_2$ , mediante equação de regressão com base na curva padrão.

### 2.3 RESPOSTA CUTÂNEA BASOFÍLICA Á FITOEMAGLUTININA

Em 10 aves de cada tratamento (uma de cada unidade experimental), com 36 dias de idade, foram injetados, entre a 3<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> prega interdigital da pata direita e por via intradérmica, 0,1 ml de fitoemaglutinina Cultilab<sup>®</sup>. Na pata esquerda, foi injetado o mesmo volume de solução salina. A espessura da prega foi medida com o auxílio de um paquímetro, antes da

injeção (T0h) e após 8 (T8h) e 24 horas (T24h). Os resultados foram obtidos através da diferença entre as medidas nos diferentes tempos em milímetros.

## 2.4 PESO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES

Aos 40 dias de idade, 10 aves de cada tratamento (uma de cada unidade experimental) foram sacrificadas por deslocamento cervical, para coleta e pesagem dos seguintes órgãos: bursa, timo e baço. Os resultados foram analisados através da relação entre o peso do órgão e o peso corporal da ave.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste de Hartley (OTT, 1983). Os dados foram submetidos à análise de variância e os efeitos de tratamento separados através do teste de Tukey. Tal análise foi realizada utilizando-se procedimento General Linear Model (PROC GLM do SAS). Quando não respeitadas as premissas utilizou-se estatística não paramétrica.

Foi adicionado aos resultados de títulos de anticorpos, o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos dias de colheita dos dados. As probabilidades das interações com o

tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizado-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). Análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos foram significativas. Para tal foi utilizado o comando SLICE do GLM do SAS.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Os efeitos dos aditivos nas dietas de frangos de corte sobre as médias dos títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle, obtidos pelo teste ELISA, estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Efeitos dos aditivos sobre a média dos títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle, obtidos pelo teste ELISA em frangos de corte nas diferentes idades

Idades	Tratamentos			p	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
14 dias	367,75 <b>b</b>	786,70 <b>a</b>	695,70 <b>ab</b>	0,0196	88,62
28 dias	1070,45 <b>b</b>	3256,85 <b>a</b>	2173,74 <b>ab</b>	0,0474	154,96
35 dias	2219,00	3268,53	2910,11	0,2803	97,39
42 dias	2075,30 <b>b</b>	3717,26 <b>a</b>	2860,53 <b>ab</b>	0,0728	101,57

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste do Qui-Quadrado ( $p < 0,05$ ).

CV(%) – coeficiente de variação.

Aos 14 dias de idade, antes da vacinação das aves, as médias dos títulos de anticorpos analisados são considerados anticorpos passivos (maternos). Foi observado que as aves que receberam o probiótico apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo tratado com antibiótico ( $p < 0,05$ ) e o grupo controle não diferiu dos demais. Após o nascimento fisiologicamente ocorre queda gradativa nos níveis de anticorpos maternos, com os dados obtidos neste estudo pode-se observar que as aves tratadas com probiótico retardaram a queda nos níveis de anticorpos maternos.

Aos 28 e 42 dias de idade, as diferenças foram mantidas e aos 35 dias de idade não foi possível observar diferenças estatísticas entre os tratamentos.

É possível observar nos resultados apresentados que, numericamente, as médias dos títulos de anticorpos do grupo que recebeu probiótico na dieta foram superiores a dos outros grupos e que o grupo tratado com antibiótico apresentou médias visivelmente inferiores em todas as idades. Porém, o alto coeficiente de variação não permitiu mostrar diferença estatística em relação ao grupo controle.

Este aumento na síntese de anticorpos específicos para o vírus da doença de Newcastle observado no presente estudo, não foi observado nos estudos dos autores Balevi et al. (2001), que ao avaliarem os efeitos de um probiótico comercial na resposta imune humoral de galinhas poedeiras não observaram diferenças significantes, atribuindo esta ausência de estímulo ao uso de microrganismos não específicos para a espécie em estudo.

Zulkifli et al. (2000) observaram maiores títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em frangos de corte que receberam probiótico em relação ao controle, sem diferir do grupo tratado com antibiótico, porém estes resultados foram observados apenas após período de exposição à alta temperatura, o que reforça o argumento de que os benefícios do probiótico são intensificados em situações de estresse.

Ramarao et al. (2004) também observaram aumento nos títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle e Gumboro em frangos de corte que receberam probiótico na dieta durante o período de 3 a 35 dias de idade.

Em estudos com camundongos, Yasui et al. (1999) puderam observar aumento na produção de Imunoglobulinas G (Ig G) contra o vírus da Influenza em animais tratados com probiótico.

## 3.2 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

### 3.2.1 Fagocitose

As porcentagens médias de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 21 dias de idade, que fagocitaram uma ou mais partículas de Zymosan, nos diferentes tratamentos, estão representadas na tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios das taxas de fagocitose, em porcentagem de células que fagocitaram uma ou mais partículas de Zymosan, nos diferentes tratamentos, em frangos de corte com 21 dias de idade

Taxa de Fagocitose (%)	Tratamentos			p	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
	24,04	15,90	15,94	0,1935	56,00

p – Probabilidade.

CV(%) – coeficiente de variação.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais.

Metodologias de análise da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais, circulantes ou esplênicos, são normalmente utilizadas para mensurar a resposta imune inespecífica ou inata. Embora sejam ensaios simples, Erickson e Hubbard (2000) acreditam que particularmente pela distância do sítio de ação dos probióticos (trato intestinal), os resultados possam ser pouco compreendidos.

Porém, em estudos realizados em camundongos, por Perdigón et al. (1991), foi possível observar proteção contra patógenos intestinais através da indução do aumento de atividade fagocítica de macrófagos peritoneais nos animais tratados com probiótico.

Talvez a ação sistêmica do probiótico ocorra através da estimulação da liberação de mediadores, o que estaria indiretamente, estimulando o sistema imune em locais distantes do trato intestinal (CROSS, 2002).

### 3.2.2 Produção de Água Oxigenada

Os valores médios de água oxigenada liberada pelos macrófagos ativados, com e sem a presença de PMA, de frangos de corte com 21 dias de idade, nos diferentes tratamentos, estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios de água oxigenada liberada por macrófagos de frangos de corte de 21 dias de idade, com ou sem PMA, nos diferentes tratamentos

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tratamentos			P	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
s/PMA	21,65	20,08	30,94	0,3249	83,34
c/PMA	52,40	52,15	61,88	0,5196	45,54

p – Probabilidade.

CV(%) – coeficiente de variação.

O peróxido de hidrogênio é um dos metabólitos reativos do oxigênio produzidos pelos macrófagos após ativação (OLIVEIRA et al., 2003). Segundo dados de literatura, os probióticos poderiam atuar na ativação dos macrófagos, através de componentes que estão presentes na parede celular das bactérias que os compõem e que são liberados constantemente na luz intestinal (ERICKSON; HUBBARD, 2000).

A produção de água oxigenada pelos macrófagos ocorre através de um processo conhecido como “explosão respiratória”, que consiste basicamente em um aumento no consumo de oxigênio molecular pela célula fagocítica. A quantidade produzida pode variar de acordo com o estágio de ativação das células (OLIVEIRA et al., 2003).

Neste estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa de ativação de macrófagos, mensurada a partir da liberação de água oxigenada, nos diferentes tratamentos.

### 3.3 RESPOSTA CUTÂNEA BASOFÍLICA Á FITOEMAGLUTININA

Os resultados relacionados à resposta cutânea basofílica após administração intradérmica de fitoemaglutinina no espaço interdigital de frangos de corte, estão representados na tabela 4.

Tabela 4 - Reação cutânea basofílica, em mm de aumento, após inoculação intradérmica de fitoemaglutinina, nos intervalos: antes da inoculação e 8h após (T8h-T0h) e antes da inoculação e 24h após (T24-T0h)

Intervalos	Tratamentos			P	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
T8h-T0h	0,98	0,90	1,19	0,0835	29,54
T24h-T0h	1,18	1,14	1,36	0,3849	29,56

p – Probabilidade.

CV(%) – coeficiente de variação.

É possível notar que houve proliferação e diferenciação de linfócitos T devido ao aumento na espessura do espaço interdigital após inoculação intradérmica de fitoemaglutinina, porém esta resposta não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, mostrando desta forma, que nas condições em que foi conduzido o experimento, não foi possível mostrar a influência do probiótico na resposta de linfócitos T em nenhum dos intervalos estudados,

Em estudo do uso de um probiótico em galinhas poedeiras, Panda et al.(2003), puderam observar maior resposta cutânea basofílica após administração intradérmica de fitoemaglutinina nas aves com 64 semanas de idade tratadas com este aditivo durante o período de 24 a 72

semanas, nos outros períodos testados (24 e 40 semanas) a resposta não foi diferente dos outros grupos experimentais.

### 3.4 PESO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES

Os resultados das médias dos pesos relativos dos órgãos linfóides, baço, bursa e timo, em percentagem do peso vivo de frangos de corte tratados com antibiótico ou probiótico, estão representados na tabela 5.

Tabela 5- Pesos médios relativos dos órgãos linfóides: baço, bursa e timo, em relação ao peso vivo de frangos de corte nos diferentes tratamentos

Órgãos	Tratamentos			p	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
Baço	0,123	0,121	0,118	0,8506	17,04
Bursa	0,250 <b>a</b>	0,200 <b>b</b>	0,227 <b>ab</b>	0,0349	18,63
Timo	0,373	0,293	0,363	0,2306	31,18

p – Probabilidade.

CV(%) – coeficiente de variação.

Apenas para peso relativo de bursa foi possível mostrar diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), sendo observado um maior peso relativo no grupo que recebeu antibiótico em relação ao grupo tratado com probiótico e ambos não diferiram do grupo controle.

No presente estudo não foi possível observar relação entre peso relativo de órgãos linfóides e produção de anticorpos como no estudo de Kabir et al. (2004) que observaram maior peso relativo de baço e bursa nas aves tratadas com probiótico em relação ao grupo

controle, valores estes relacionados com um maior título de anticorpos nas aves que receberam probiótico na dieta.

As condições de criação podem influenciar de forma direta na eficiência dos aditivos promotores de crescimento, tanto no que diz respeito ao desempenho como na eficácia de resposta do sistema imune (BORATTO, 2004; TAKAHASHI et al., 1997). Práticas adequadas de manejo, como as utilizadas neste experimento, podem levar a resultados que não mostrem efeito significativo dos aditivos na resposta imune das aves.

A presença de situações de desafio sanitário, bem como qualquer situação de estresse e a relação entre o número e o tipo de microrganismos viáveis presente no probiótico, podem estar relacionadas com a eficiência de ação deste produto (LIMA et al., 2003). Como a eficácia do probiótico está muito dependente destes fatores, fica difícil a comparação entre os diferentes estudos (BORATTO, 2004; LODDI et al., 2000), além da grande diversidade existente entre os tipos de probióticos, vias de administração e condições experimentais adotados nos trabalhos citados na literatura (BORATTO, 2004).

Embora os resultados ainda sejam pouco conclusivos e controversos, muitos estudos relatam efeitos imunoestimulantes relacionados com o uso de probióticos nas dietas de animais, justificando a continuidade de estudos para que se obtenham maiores esclarecimentos do modo de ação deste suplemento alimentar.

#### 4 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foram conduzidas as análises, não foi possível observar influência do probiótico na resposta imune de macrófagos, linfócitos T e alteração de peso de órgãos linfóides nas idades avaliadas e com os métodos utilizados. Entretanto, foi possível observar resposta positiva do probiótico em relação ao antibiótico no que diz respeito à produção de anticorpos em resposta à vacina de Newcastle, porém, sem diferir do controle.

## REFERÊNCIAS

AL-AFALEQ; HOMEIRA, A. M. Effects of low doses of oestradiol, testosterone and dihydrotestosterone on immune response of broiler chicks. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 20, n. 2, p. 315-327, 1998.

BACON, L. D. Measurement of immune competence in chickens. **Poultry Science Reviews**, v. 4, n. 3, p. 187-191, 1992.

BALEVI, T.; UÇAN, U. S.; COSKUN, B.; KURTOGLU, V.; CETINGUL, I. S. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response in layer hens. **British Poultry Science**, v. 42, p. 456-461, 2001.

BROWN-BORG, H. M.; EDENS, F. W. In vivo neurotoxin administration alters immune responses in chickens (*Gallus domesticus*). **Comparative Biotechnology and Physiology C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 102C, n. 1, p. 177-183, 1992.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, 2004.

CORRIER, D. E.; DeLOACH, J. R. Evaluation of Cell-Mediated, Cutaneous Basophil Hypersensitivity in Young Chickens by Interdigital Skin Test. **Poultry Science**, v. 69, p. 403-408, 1990.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S.; SHELLEM, T. A.; DOERR, J. A. Intestinal immunomodulatory by vitamin A deficiency and *Lactobacillus*-based probiotic in *Eimeria acervulina* – infected broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 47, p. 1313-1320, 2003.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotics Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. **Poultry Science**, v. 84, p. 634-643, 2005.

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

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

FERKET, P. R. Manutenção da saúde intestinal em um mundo sem antibióticos. In: RONDA LATINO AMERICANA DA ALLTECH, 13., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: Alltech, 2003, p. 26-39.

FERREIRA, A. J. P.; PIZARRO, L. D. C. R.; LEME, I. L. Probióticos e Prebióticos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002. p. 574-578.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.

GONE, A. B.; QURESHI, M. A. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. **Poultry Science**, v. 76, p. 984-991, 1997.

HAMANN, L.; EL-SAMALOUTI, V.; ULMER, A. J.; FLAD, H. D.; RIETSCHER, E. T. Components of gut bacteria as immunomodulators. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 41, p. 141-154, 1998.

ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPAA, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 4445-4505, 2001.

JIN, L. Z. Probiotic in poultry: modes of action. **World's Poultry Sci. J.** v. 53, p. 351-368, 1997.

JONES, E. T.; RICKET, S. C. Symposium: Antibiotics in Animal Feeds: are there viable alternatives? – Introduction. **Poultry Science**, v. 84, p. 633, 2005.

KABIR, S. M. L.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. B.; RAHMAN, M. M.; AHMED, S. U. The Dynamics of Probiotics on Growth Performance and Immune Response in Broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 5, p. 361-364, 2004.

KLASING, K. C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses. **Poultry Science**, v. 77, p. 983-989, 1998.

KUROGI, A. S.; BARBOZA, L. E. D.; OLIVEIRA, C. C.; CAVAZZANI, L. F. M.; BUCHI, D. F. Effect of Canova on mouse peritoneal macrofages. In: CONGRESS OF BRAZILIAN SOCIETY OF MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 19., 2003, Caxambu, MG. **Proceedings...** 2003.

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

MONTASSIER, H. J. Importância da imunidade em pintos na primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO, 1998. **Anais...** Campinas, SP. 1998. p. 99-120.

MORI, E.; MORI, C. M. C.; FERNANDES, W. R. Evaluation of alveolar macrophage function in healthy horses. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.*, v. 53, n. 2, p. 1-7, 2001.

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

OTT, R. L. **An introduction to statistical methods and data analysis**. Wadsworth, 1983.

PANDA, A. K.; REDDY, M. R.; RAMA RAO, S. V.; PRAHARAJ, N. K. Production Performance, Serum/Yolk Cholesterol and Immune Competence of White Leghorn Layers as Influenced by Dietary Supplementation with Probiotic. **Tropical Animal Health and Production**, v. 35, N. 1, p. 85- 94, 2003.

PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; HOLDAGO, A. P. R. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. **J. Dairy Res.** v. 58, p. 458-496, 1991.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Meth.**, v. 38, p. 161-170, 1980.

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

PURCHASE, H. G.; ARP, L. H.; DOMERMUTH, C. H.; PEARSON, J. E. **A Laboratory manual for isolation and identification of avian pathogens.** 3. ed. Dudeney, Kendall, Hunt: Publishing Company, 1989. 227 p.

QURESHI, M. A. Avian Macrophage and Immune Response: An Overview. **Poultry Science**, v. 82, p. 691-698, 2003.

QURESHI, M. A.; BRAKE, I.; HAMILTON, P. B.; HAGLER, W. M.; NESHEIM, S. Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicks. **Poult. Science**, v. 77, p. 812-819, 1998.

RAMARAO, S. V.; REDDY, M. R.; RAJU, M. V. L. N.; PANDA, A. K. Growth, nutrient utilization competence in broiler chicken fed probiotic, gut acidifier and antibacterial compounds. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 39, n. 2, p. 125-130, 2004.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, v. 130, p. 396S-402S, 2000.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by macrophages. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 22, p. 1271-1273, 1989.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics.** 5. ed., Cary: SAS, 1985.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, E. Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action. **J. Anim. Feed Sci.** v. 10, p. 51-67, 2001.

TAKAHASHI, K.; AKIBA, Y.; MATSUDA, A. Effect of probiotic on immune responses in broiler chicks under different sanitary conditions or immune activations. **Animal Science and Technology**, v. 68, n. 6, p. 537-544, 1997.

TAKAHASHI, K.; NISHIMURA, H.; AKIBA, Y.; HORIGUCHI, E. Effects of stocking density and supplemental ascorbic acid on growth, organ weight, mixed function oxidase in hepatic microsomes, lipid metabolism and plasma corticosterone in male broiler chicks. **Animal Science Technology**, v. 62, n. 9, p. 829-838, 1991.

YASUI, H. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 383-389, 1999.

ZULKIFLI, I. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus cultures* and oxytetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science**, v. 41, p. 593-597, 2000.

## **CAPITULO V - PARAMETROS HEMATOLOGICOS DE FRANGOS DE CORTE QUE RECEBERAM PROBIOTICO NA DIETA**

### **RESUMO**

Estão disponíveis no mercado produtos ditos imunomoduladores, com promessas de diminuição do estresse imunológico, impedindo a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam relacionadas com a produção. Um destes produtos são os probióticos, que atuam de forma benéfica melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal e promovendo desta forma, uma melhor resposta do sistema imune. O presente trabalho teve como objetivo, usar os parâmetros hematológicos como ferramenta para avaliar o estado de saúde dos frangos que receberam probiótico na dieta. Foram utilizados 1200 pintos de corte de um a 42 dias de idade, em um delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (antibiótico, probiótico e controle) e 10 repetições. Foram colhidas amostras de sangue de 10 aves por tratamento aos 14, 28 e 35 dias de idade, para a realização das seguintes provas: hematócrito, dosagem de proteína plasmática e de hemoglobina, contagem de hemácias, de trombócitos e de leucócitos (total e diferencial) e cálculo dos índices de Windrobe. Apesar das diferenças encontradas entre os tratamentos, os valores hematológicos do presente estudo encontram-se dentro da normalidade quando comparado a outros estudos, ocorrendo algumas variações devido aos vários fatores que interferem nestes dados. Podemos concluir desta forma que o probiótico em estudo, nas condições em que foram conduzidas as análises, não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos avaliados.

Palavras-chave: Frango de corte. Hematologia aviária. Probiótico.

## **HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF BROILERS THAT HAD RECEIVED PROBIOTIC IN THE DIET**

### **ABSTRACT**

In the market there are available, products said to be nutritional-immune function, with promises to reduce immunologic stress, hindering the mobilization of nutrients for activities that are not related with the production. One of those products is the probiotic, which acts in a beneficial way, improving the balance of intestinal microbial and promoting, this way, a better response from the immune system. The present work had as an objective, to use the hematological parameters as a tool to evaluate the state of health of the broilers that have received probiotic in their diet. There had been used 1200 broilers, bred up to 42 days of age, in a completely randomized design, with 3 treatments (antibiotic, probiotic and control) and 10 repetitions with 40 birds each. Blood samples were collected from 10 birds per treatment at the ages of 14, 28 and 35 days, in order to make the following tests: hematocrit, dosage of plasmatic protein and hemoglobin, counting of eritrocyte, trombocytes and leukocytes (total and distinguishing) and calculation of the indices of Windrobe. Despite the differences found among the treatments, the hematological values of the present study are found to be within normality when compared to other studies, some variations occurring because of some factors that intervene with these data. We can then conclude that, the probiotic studied, in the conditions in which the analyses were led, did not promote alteration in the evaluated hematological parameters.

**Key Words:** Broilers. Avian Hematolofy. Probiotic.

## 1 INTRODUÇÃO

Altos níveis zootécnicos na produção de frangos de corte estão intimamente relacionados com a saúde destes animais. É de extrema importância que o sistema imunológico esteja atuando de forma adequada e eficiente para possibilitar um bom desempenho produtivo e impedir a introdução de doenças (MORGULIS, 2002).

Estão disponíveis no mercado uma série de produtos ditos imunomoduladores, com promessas de diminuição do estresse imunológico, impedindo desta forma a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam relacionadas com a produção (FERKET, 2003).

Muitos estudos descritos na literatura demonstram que os probióticos, microorganismos vivos, que no organismo animal atuam de forma benéfica melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989), possuem este efeito imunomodulador (COPPOLA; TUNES, 2004) e acredita-se que estas alterações imunológicas não estejam restritas ao sistema imune local da mucosa intestinal (ERICKSON; HUBBARD, 2000; PERDIGON et al., 1995).

O crescente questionamento quanto à possível relação existente entre o uso de antibióticos na dieta animal e o aumento da resistência bacteriana, está atraindo a atenção dos pesquisadores e criadores para estas novas alternativas de controle da saúde dos animais de produção (FERKET, 2003; FULLER, 1989; JIN, 1997).

Alguns modos de ação descritos na literatura tentam esclarecer os efeitos benéficos do probiótico na resistência a doenças, dentre estes, o estímulo ao sistema imune, porém ainda pouco esclarecido.

Com o emprego da hematologia e da química sanguínea é possível estabelecer um diagnóstico definitivo, permitindo orientar e aprofundar a natureza de diversas situações fisiopatológicas que afetam as aves (CHARLES NORIEGA, 2000).

A hematologia aviária embora ainda não esteja bem desenvolvida como a hematologia dos mamíferos, está ganhando importância e começando a ser estudada (ANDERSON; STEPHENS, 1970; CAMPBELL; DEIN, 1984).

Na tabela 1, pode-se observar intervalos de valores hematológicos obtidos em trabalhos de Cardoso e Tessari (2003), Charles Noriega (2000) e Jain (1993), considerados normais para frangos de corte em idades diversas.

Tabela 1 - Intervalos de valores hematológicos considerados normais de frangos (*Gallus gallus domesticus*) em idades diversas

Parâmetro	Intervalo
Eritrócitos ( $10^6 \mu\text{L}$ )	2,5 - 3,5
Hemoglobina (g/dl)	7 - 13
Hematócrito %	29 - 55
VCM (fl)	90 - 140
HCM (pg)	33 - 47
CHCM %	26 - 35
Trombócitos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	20 - 40
Proteínas plasmáticas (g/dl)	3 - 6
Leucócitos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	12 - 30
Heterófilos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	3 - 6
Linfócitos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	7 - 17,5
Monócitos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	0,15 - 2
Eosinófilos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	0 - 1
Basófilos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	Raro

Adaptado de JAIN, 1993; CHARLES NORIEGA, 2000; CARDOSO, TESSARI, 2003.

Nas células sanguíneas das aves existem algumas particularidades como: as hemácias são nucleadas e os heterófilos e trombócitos correspondem aos neutrófilos e plaquetas dos

mamíferos, respectivamente, mas estas diferenças não impedem que as técnicas hematológicas utilizadas para os mamíferos sejam aplicadas nas aves, sendo necessárias apenas algumas adaptações (CAMPBELL; DEIN, 1984; MORGULIS, 2002).

O hemograma consta de uma série de provas que possibilitam detectar anormalidades que se apresentam em certos fenômenos fisiopatológicos importantes e que se refletem no sangue (CHARLES NORIEGA, 2000).

A hemoglobina é importante no transporte de CO<sub>2</sub> entre os tecidos e os alvéolos pulmonares, mantendo desta maneira o pH do sangue e a entrada de oxigênio nas células. Com a concentração de hemoglobina no sangue, é possível determinar a capacidade de oxigenação tissular (CHARLES NORIEGA, 2000) e classificar um processo anêmico (STURKIE, 1976).

O hematócrito permite avaliar a parte globular em uma amostra de sangue. Os valores normais variam de acordo com a idade. Em geral, pode-se considerar que quando as aves apresentam hematócrito menor que 29% significa que há um processo de anemia (CHARLES NORIEGA, 2000).

A contagem total de hemácias permite realizar uma análise mais detalhada da presença ou ausência de anemia ou hemoconcentração (CHARLES NORIEGA, 2000). O número varia entre as diferentes espécies aviárias, idade, sexo, influências hormonais e meio ambiente (HODGES, 1977).

Os índices de Wintrobe (WINTROBE, 1933): hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM), detectam a presença de anemia e avaliam a capacidade que a medula óssea tem de produzir hemácias de tamanho e capacidade metabólica normais, assim como o conteúdo de hemoglobina.

Nas aves os trombócitos circulam em grande número no sangue, e são células importantes na resposta imune inespecífica (GRECCHI et al., 1980). Possuem função semelhante às plaquetas nos mamíferos no processo da coagulação sanguínea, mas sua principal característica é a função como célula fagocítica (CAMPBELL; DEIN, 1984; CHARLES NORIEGA, 2000).

As proteínas plasmáticas do sangue são formadas por: albumina, globulinas (alfa, beta e gama) e fibrinogênio, e a maioria destas são sintetizadas no fígado. Estas fazem parte de 20% do sangue, são nutrientes essenciais para a vida, possuem as funções de manter a pressão osmótica, regular o mecanismo ácido-base do sangue, transportar hormônios além de participar da formação de parte importante das enzimas e imunoglobulinas. A mensuração destas proteínas no sangue proporciona informações importantes sobre a saúde e estado fisiológico, incluindo respostas imunológicas e inflamatórias (CHARLES NORIEGA, 2000; FAIRBROTHER et al., 2004).

A contagem total de leucócitos é necessária para poder interpretar com maior certeza a natureza de uma infecção viral ou bacteriana quando se associa com a interpretação da contagem diferencial de leucócitos ou também avaliar o estado geral do animal (CHARLES NORIEGA, 2000), é um método simples, não invasivo e compatível com outras análises de sangue, porém a interpretação pode ser difícil em aves, pela falta de estudos publicados na literatura (FAIRBROTHER et al., 2004).

A contagem diferencial de leucócitos é de extrema importância para o diagnóstico, pois estabelece a percentagem e a quantidade de cada tipo de leucócito que se encontra em uma determinada circunstância ou enfermidade da ave. Em conjunto com a contagem total é possível determinar o diagnóstico de uma maneira mais precisa (CHARLES NORIEGA, 2000).

Diante deste contexto, a hematologia pode ser vista como ferramenta importante para o diagnóstico do estado de saúde do animal podendo ser um meio de avaliação dos probióticos na dieta de frangos de corte.

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo verificar a influência do probiótico na saúde animal através da avaliação dos parâmetros hematológicos de frangos de corte que receberam este aditivo na dieta de 1 a 42 dias de idade.

## 2 MATERIAL E METODOS

O experimento foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, empregando-se galpão de alvenaria dividido em boxes, de 4,25 m<sup>2</sup> cada, sendo a criação em piso. O experimento teve início em 24 de março de 2005 e término em 4 de maio de 2005, totalizando 42 dias de criação.

O manejo e os equipamentos utilizados foram os convencionais para a criação de frangos de corte, com as devidas adaptações para um aviário experimental. As aves foram pesadas no primeiro dia do experimento e alojadas nos boxes experimentais, as temperaturas médias, máximas e mínimas foram anotadas diariamente, utilizando-se termômetros de bulbo seco localizados em dois pontos distintos do galpão. As condições de temperatura as quais as aves ficaram submetidas durante o período experimental permaneceram em média entre 20-28 °C.

Utilizaram-se 1200 pintos de um dia, machos, da linhagem AgRoss 308, criados até a idade de 42 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 10 repetições/tratamento. Os animais foram distribuídos em 30 parcelas experimentais com 40 aves em cada uma.

As rações experimentais foram formuladas de acordo com os níveis nutricionais rotineiramente praticados na criação comercial de frangos de corte, sendo adicionado ao primeiro tratamento um antibiótico promotor de crescimento (avilamicina), ao segundo um probiótico e ao terceiro tratamento nenhum tipo de suplementação foi empregada (controle). Foram utilizadas rações isoprotéicas e isocalóricas, elaboradas a base de milho e soja (Tabelas 1 e 2 Capítulo III).

Não foi adicionada à ração nenhum tipo anticoccidiano ou qualquer outra droga ou aditivo que não os em estudo.

As aves foram vacinadas contra coccidiose na primeira semana de vida. Foi utilizada a vacina viva atenuada, administrada via água de bebida conforme recomendações do fabricante.

A composição do probiótico empregado foi: *Lactobacillus acidophilus* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC), *Streptococcus faecium* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC) e *Bifidobacterium bifidum* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC), na dose 2kg/ton de ração, durante toda a fase de criação. O produto citado é produzido e comercializado sob o nome DBA<sup>®</sup> pela Empresa IMEVE.

Para avaliação dos parâmetros hematológicos (hemograma e leucograma completos), foram colhidas amostras de 1,0 ml de sangue no 14<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dias de idade das aves, por punção da veia ulnar, de 10 aves por tratamento (uma de cada unidade experimental), totalizando 90 amostras. As amostras foram colocadas em tubos *ependorf* com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), na proporção de 0,1 ml para cada 1,0 ml de sangue.

No Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola de Descalvado, Estado de São Paulo, foram realizadas as seguintes provas hematológicas: hematócrito efetuado através do método do microhematócrito, dosagem de proteína plasmática determinada por meio do método de refratometria, dosagem de hemoglobina realizada através do método de cianometahemoglobina, contagem de hemácias e leucócitos realizada em hematocitômetro. A contagem diferencial leucocitária e de trombócitos foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos, sem anticoagulante, corados com hematoxilina-eosina (Panótipo LB) sendo determinados valores relativos e absolutos de linfócitos, heterófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos.

Por meio de fórmulas padronizadas foram calculados os seguintes índices de Windrobe: hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM).

A dosagem de hemoglobina foi determinada conforme metodologia de Campbell e Dein (1984) e as demais metodologias hematológicas foram realizadas de acordo com Charles Noriega (2000).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSAO

As avaliações dos parâmetros hematológicos obtidos nesta pesquisa foram baseados em resultados obtidos em trabalhos de Cardoso e Tessari (2003), Charles Noriega (2000) e Jain (1993) (Tabela 1).

Nas tabelas 2 e 3 estão representadas as médias dos parâmetros hematológicos de 10 aves de cada tratamento. Para as provas de hemoglobina, hematócrito, hemácias, hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume corpuscular médio (VCM) e trombócitos (Tabela 2), não foram encontradas interações significativas entre estas variáveis e o tempo, por este motivo, não foi necessária a separação dos dados por idade na tabela, visto que não houve diferença estatística entre as idades, sendo apresentada então a média nos diferentes tempos.

Apenas para a variável proteína total, observou-se interação estatisticamente significativa entre tempo e tratamento ( $p < 0.05$ ) (Tabela 3), ou seja, as diferentes idades dos frangos tiveram alguma influência nos dados para esta variável estudada, por este motivo foi especificado na Tabela 3 as médias em cada tempo.

Tabela 2 - Valores hematológicos das aves: hemoglobina, hematócrito, hemácias, hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume corpuscular médio (VCM) e trombócitos, nos diferentes tratamentos

Parâmetros	Tratamentos			p	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
Hemoglobina (g/dl)	8,33	8,22	8,47	0,0504	7,05
Hematócrito (%)	35,53 <b>b</b>	36,07 <b>ab</b>	36,57 <b>a</b>	0,0518	4,61
Hemácias ( $10^6 \mu\text{L}$ )	2,32 <b>ab</b>	2,27 <b>b</b>	2,36 <b>a</b>	0,0485	5,05
HCM (pg)	36,16	36,48	36,18	0,9856	9,07
CHCM (g/dl)	23,42 <b>a</b>	22,56 <b>b</b>	23,15 <b>ab</b>	0,0144	5,77
VCM (fl)	154,15	159,88	156,25	0,2412	7,36
Trombócitos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	24,04	23,47	23,89	0,7052	5,02

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

CV(%) – coeficiente de variação.

Tabela 3 - Valores de proteínas totais, nos diferentes tratamentos aos 14, 28 e 35 dias de idade

Idades	Tratamentos			p	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
14 dias	2,99	2,99	3,00	0,9721	3,63
28 dias	3,51 <b>a</b>	3,09 <b>b</b>	3,13 <b>b</b>	0,0005	7,11
35 dias	3,89 <b>a</b>	3,53 <b>b</b>	3,69 <b>ab</b>	0,0061	6,19

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

CV(%) – coeficiente de variação.

Os valores hematológicos de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM) e trombócitos, não mostraram diferença dentre os tratamentos. Por outro lado, os valores de hematócrito foram mais elevados no grupo controle, mais baixo no grupo que recebeu antibiótico e o que recebeu probiótico ficou semelhante aos

demais ( $p < 0,05$ ). O mesmo ocorreu com a dosagem de hemácias, porém o grupo que recebeu antibiótico foi o que não diferiu dos demais ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi maior no grupo que recebeu antibiótico, menor no do probiótico e o grupo controle não diferiu dos demais ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Os valores de proteínas totais foram influenciados pelo fator tempo nas idades 28 dias ( $p < 0,0001$ ) e 35 dias ( $p < 0,0005$ ), estes aumentaram com o avançar da idade, variação também citada pelos autores Meluzzi et al. (1992), que observaram um aumento de até 4,25 g/dl aos 45 dias de idade. No presente trabalho, não foi possível mostrar diferença entre os tratamentos aos 14 dias de idade, porém aos 28 dias de idade o grupo que recebeu antibiótico na dieta apresentou maiores valores de proteínas totais em relação aos demais ( $p < 0,05$ ) e aos 35 dias de idade maiores valores em relação ao grupo que recebeu probiótico e o grupo controle não diferiu dos demais ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Apesar dos valores estarem dentro da normalidade, houve diferença significativa entre os tratamentos para os seguintes parâmetros: hematócrito, hemácias, CHCM e proteínas totais. Este fato pode ser explicado pelo grande intervalo entre os valores mínimos e máximos citados como normais na literatura, o que pode ser observado na Tabela 1.

Os valores de volume corpuscular médio (VCM) encontram-se um pouco acima do limite citado na literatura (CHARLES NORIEGA, 2000; JAIN, 1993), fato também observado por Cardoso e Tessari (2003) em estudo dos parâmetros hematológicos normais de frangos de corte. Estes autores citam que estas alterações podem estar relacionadas com as diferentes idades das aves, uma vez que alguns dos valores de referência encontrados na literatura são baseados em estudos com matrizes.

Nas tabelas 4 e 5 estão representadas as médias das contagens diferenciais de leucócitos relativas e absolutas, de 10 aves de cada tratamento. Como não foi demonstrada

diferença estatística dos parâmetros estudados em relação ao tempo (idades), nas tabelas 4 e 5 estão representadas as médias das diferentes idades.

Tabela 4 - Médias dos valores numéricos de glóbulos brancos (GB) e dos valores relativos de linfócitos, heterófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, nos diferentes tratamentos

Parâmetros	Tratamentos			p	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
GB ( $10^3 \mu\text{L}$ )	15,96	15,93	15,99	0,9379	7,03
Linfócitos (%)	59,27	57,54	58,1	0,5303	8,19
Heterófilos (%)	38,43	40,40	40,1	0,3411	13,11
Monócitos (%)	1,8	1,53	1,2	0,0715	54,14
Eosinófilos (%)	0,43	0,47	0,5	0,9307	112,2
Basófilos (%)	0,07	0,06	0,1	0,858	346,27

p – Probabilidade.

CV(%) – coeficiente de variação.

Tabela 5 - Médias dos valores numéricos de glóbulos brancos (GB) e dos valores absolutos de linfócitos, heterófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, nos diferentes tratamentos

Parâmetros	Tratamentos			p	CV%
	Antibiótico	Probiótico	Controle		
GB ( $10^3 \mu\text{L}$ )	15,96	15,93	15,99	0,9379	7,03
Linfócitos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	9,46	9,17	9,29	0,5974	11,32
Heterófilos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	6,13	6,43	6,41	0,359	14,35
Monócitos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	0,29	0,24	0,195	0,078	54,88
Eosinófilos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	0,069	0,075	0,079	0,8318	112,05
Basófilos ( $10^3 \mu\text{L}$ )	0,011	0,015	0,016	0,8505	347,03

p – Probabilidade.

CV(%) – coeficiente de variação.

Não foi encontrada diferença significativa para contagem de glóbulos brancos, linfócitos, heterófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, quer de maneira relativa (Tabela 4) e absoluta (Tabela 5), entre os diferentes tratamentos.

Os valores de leucócitos encontrados no presente estudo foram similares aos citados por Charles Noriega (2000).

Os valores dos parâmetros hematológicos citados neste trabalho encontram-se dentro da normalidade e podem ser considerados níveis de referência devido à escassez de estudos publicados sobre hematologia em frangos de corte no Brasil.

Diferenças de idade, sexo, linhagem, região, ambiente, manejo (CAMPBELL; DEIN, 1984), métodos de amostragem, de obtenção do sangue, de análise além de outros vários fatores podem influenciar nos diferentes resultados para parâmetros hematológicos encontrados (MELUZZI et al., 1992).

#### 4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que o probiótico em estudo, nas condições em que foram conduzidas as análises, não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos avaliados.

## REFERENCIAS

ANDERSON, E. L.; STEPHENS, J. F. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with Salmonella. **Appl. Microbiol.**, v. 19, n. 5, p. 726-730. 1970.

CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. Avian Hematology. The Basics. **Vet. Clin. North Am. Small. Pract.** , v. 14, n. 2, p. 223-248, 1984.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arq. Inst. Biol.** , v. 70. n. 4, p. 419-424, 2003.

CHARLES NORIEGA, M. I. V. C. **Apuntes de hematologia aviar: material didático para curso de hematologia aviária.** México: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. 2000: 70 p. Apostila.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, 2004.

ELSBACH, P. Degradation of microorganisms by phagocytic cells. **Ver. Infect. Dis.**, v. 2, p. 106-128, 1980.

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

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

FERKET, P. R. Manutenção da saúde intestinal em um mundo sem antibióticos. In: RONDA LATINO AMERICANA DA ALLTECH, 13., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: Alltech, 2003, p. 26-39.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.

GRECCHI, R.; SALIBA, A. M.; MARIANO, M. Morphological changes, surface receptors and fagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. **J. of Pathol.**, v. 130, p. 23-31, 1980.

HODGES, R. D. Normal avian (poultry) haematology. In: ARCHER, R. K.; JEFFCOTT, L. B. (Ed.). **Comparative clinical haematology**. London: Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 483-517.

JAIN, N. C. Essencial of veterinary hematology. Philadelphia: LEA & FEBIGER, 1993. p. 365-372.

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotic in poultry: modes of action. **World's Poultry Sci. J.**, v. 53, p. 351-368, 1997.

MELUZZI, A.; PRIMICERI, G.; GIORDANI, R.; FABRIS, G. Determination of blood constituents reference values in broilers. **Poultry Science**, v. 71, p. 337-345, 1992.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. eds. **Fisiologia aviária aplicada a frango de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375 p.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGUERO, G.; GOBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 1597-1606, 1995.

POWELL, P. C. Immune mechanisms in infections of poultry. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 15, p. 87-113, 1987.

SHARMA, J. M. Effect of infectious bursal disease virus on protection against Marek's disease by turkey herpesvirus vaccine. **Avian Dis.**, v. 28, p. 629-640, 1984.

STURKIE, P. D. Blood: Physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: STURKIE, P. D. **Avian physiology**. New York: Springer-Verlag, 1976. p. 53-75.

WINTROBE, M. M. Variations in size and hemoglobin content of eritrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia haematol.**, v. 51, p 31, 1933.