

MARIANA CAMARGO LOURENÇO



EFEITO DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS SOBRE A
RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Santin

CURITIBA
2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

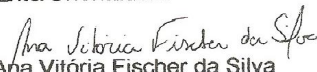


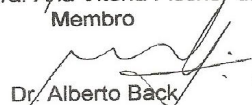
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “EFEITO DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE” apresentada pela Mestranda **MARIANA CAMARGO LOURENÇO** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata Nota para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 21 de fevereiro de 2011


Professora Dra. Elizabeth Santin
Presidente/Orientadora


Professora Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Membro


Dr. Alberto Back
Membro

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio e compreensão durante esta caminhada.

Aos professores, funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia, grandes companheiros, pelo auxílio e dedicação no meu experimento e nos momentos de trabalho.

À minha orientadora, pelos seus ensinamentos pessoais e profissionais, que levarei sempre comigo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS.....	102
CAPÍTULO 1 - INFLUÊNCIA DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DAS AVES – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
RESUMO	15
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO.....	16
O QUE SÃO PREBIÓTICOS?.....	17
SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS COMO PREBIÓTICOS.....	18
FUNÇÕES DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS	20
SISTEMA IMUNE DAS AVES E MANANOLIGOSSACARÍDEOS	21
CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2 - QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T NA MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM MANANOLIGOSSACARÍDEOS E DESAFIADOS COM <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS	29
RESUMO	30
ABSTRACT	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
ANIMAIS E AMBIENTE.....	34
VACINAÇÃO	35
PREPARAÇÃO DO INÓCULO DE SE E DESAFIO DAS AVES.....	35
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	36
ANÁLISES HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	36

ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão do Ganho de peso das aves nos períodos de 1 a 21, 1 a 42, 1 a 49 e 1 a 56 dias de vida das aves nos diferentes grupos experimentais.....	39
Tabela 2 – Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis, UFC/suabe Log10, em suabe de cloaca coletados aos 2, 7 e 14 dias após desafio (AD) nos diferentes grupos experimentais.....	39
Tabela 3 – Média e Desvio Padrão da Contagem de células caliciformes no íleo das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais.....	40
Tabela 4 – Média e Desvio Padrão da Contagem de células caliciformes nos cecos das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais.....	40
Tabela 5 – Média e Desvio Padrão da Contagem de células CD3+ no íleo e cecos das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Imunohistoquímica, 100X).....	42
Tabela 6 – Média e Desvio Padrão da Contagem de células CD4+ e CD8+ no íleo e cecos das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Imunohistoquímica, 100X).....	44
Tabela 7 – Relação da Contagem de células CD4+:CD8+ no íleo e cecos das aves aos 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Imunohistoquímica, 100X).....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia dos cecos das aves com 37 dias de vida, comparando os intestinos dos diferentes grupos experimentais (a-Controle; b-MOS+; c-MOS-) em relação a quantidade de células caliciformes (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X)..... 41
- Figura 2 – Fotomicrografia dos cecos das aves com 56 dias de vida, comparando os intestinos dos diferentes grupos experimentais (a-Controle; b-MOS+; c-MOS-) em relação a quantidade de células CD3+ (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Imunohistoquímica, 100X)..... 43
- Figura 3 – Quantificação de células CD3+ e células caliciformes nos cecos das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais..... 45

RESUMO GERAL

A intensa seleção genética aplicada aos animais de produção têm manifestado alguns efeitos negativos sobre o desenvolvimento da resposta imunológica frente a constante exposição aos desafios microbiológicos e vacinais. Para a manutenção da saúde animal, o mercado nutricional busca adequações nas fórmulas de ração e aditivos como os mananoligossacarídeos. Este prebiótico pode estimular a resposta imunológica das aves, ou ainda, funcionar como um imunomodulador. A presente dissertação busca estudar o efeito dos mananoligossacarídeos sobre o sistema imune de frangos de corte. Essa foi dividida em dois capítulos: Capítulo I, revisão bibliográfica sobre “Influência dos mananoligossacarídeos na resposta imunológica das aves” e Capítulo II, trabalho experimental “Quantificação de linfócitos T na mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com mananoligossacarídeos e desafiados com *Salmonella* Enteritidis”.

Palavras-Chave: MOS, prebiótico, sistema imune, aves.

ABSTRACT

The intense genetic selection applied to production animals has manifested negative effects on the development of the immunological response related to the constant exposition to vaccinal and microbiological challenges. For the animal health maintenance, the nutritional market searches an improvement in his feed formulas and additives like the mannanoligosaccharides. This prebiotic can stimulates broiler immunological response or act in immunomodulation. This thesis aims to study the effect of mannanoligosaccharides on the broilers immune response. This was divided in two chapters: Chapter I, a review about “Mannanoligosaccharides influence in the immune response of birds” and Chapter II, scientific report “T Lymphocytes in intestinal mucosa of broiler chickens supplemented with mannanoligosaccharides and challenged with *Salmonella* Enteritidis”.

Key-words: MOS, prebiotic, immune system, birds.

INTRODUÇÃO GERAL

A intensa seleção genética aplicada em animais de produção, para um melhor desenvolvimento animal, sanitário e nutricional, têm manifestado efeitos negativos sobre a resistência a bactérias patogênicas e ao desenvolvimento da resposta imunológica. As aves são constantemente expostas a desafios microbiológicos e vacinais, já desde os primeiros dias de vida, o que faz com que o seu sistema imunológico (SI) esteja sob constante ativação.

A Salmonela é uma bactéria patogênica presente em grande parte do sistema de criação avícola, capaz de causar doença de forma assintomática nos frangos de corte, o que não deixa de provocar grande demanda imunológica e conseqüentemente, nutricional para a ave infectada (Gast e Beard, 1990). Segundo alguns autores (Dibner et al., 1998; Klassing, 1998 e Kogut, 2009), a resposta imune pode aumentar a necessidade de recursos orgânicos pelo animal e assim, afetar o desempenho das aves.

Neste contexto, para manter a saúde animal, o mercado nutricional busca adequações nas fórmulas de ração e aditivos para atender a demanda e exigências do mercado consumidor, sem prejudicar a produtividade animal. Aditivos alimentares como os prebióticos, capazes de equilibrar a microbiota intestinal e/ou que tenham atividade imunomoduladora, parecem ser ferramentas cada vez mais interessantes para a avicultura.

Prebióticos são ingredientes não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular o crescimento seletivo e/ou à atividade de um número limitado de bactérias no colon (Gibson e Roberfroid, 1995), combatendo a população de microorganismos patogênicos. Segundo Shashidhara e Devegowda (2003) e

Biggs et al. (2007), dentre as classes de prebióticos mais utilizadas destacam-se os frutooligossacarídeos, transgalactoligossacarídeos e mananoligossacarídeos (MOS).

Na produção avícola, os MOS apresentam propriedades capazes de modificar da flora intestinal, reduzir a taxa de renovação da mucosa intestinal (*turnover*) e estimular o SI (Spring et al., 2000). Os efeitos destes produtos de levedura sobre a produção em monogástricos tem sido relatados em aves comerciais (Hayat et al., 1993; Bradley e Savage, 1995; Stanley et al., 2004; Zhang et al., 2005).

Os uso dos MOS provoca a redução do crescimento de bactérias intestinais patogênicas, como *E.coli* e salmonela, através da diminuição do pH causada pelo aumento de ácidos graxos no ceco (Choi et al., 1994; Mathew et al., 1998; Juskiewicz et al., 2004). Outro possível mecanismo de ação que altera a população microbiana intestinal é a capacidade dos MOS de se comportar com um local de ligação competitiva por bactérias patogênicas manose específicas fimbria do tipo 1, que resulta em sua excreção dos intestinos (Spring et al., 2000; Baurhoo et al., 2007).

Os MOS podem ainda interferir na resposta imunológica das aves. Uma hipótese para este mecanismo de ação sugere que os receptores tipo Toll, presentes na membrana das células do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), possuem a capacidade de identificar moléculas denominadas PAMPs ("pathogen-associated molecular patterns). Estas moléculas são encontradas em componentes da parede celular de levedura como mananos e glucanos juntamente com outras moléculas microbianas, tais como peptidoglicano, lipopolissacarídeo, e glicolípídeos (Ballou, 1970). Este reconhecimento pode desencadear uma reação em cascata que resultaria na ativação de macrófagos e consequente liberação de citocinas, ativando a resposta imune adquirida (Collet, 2000). O sistema imune inato

das aves é capaz de reconhecer estruturas características de microorganismos patogênicos e que não estão presentes em células de aves e mamíferos como lipopolissacarídeos e mananoligossacarídeos (Abbas, 2000).

A presente dissertação busca estudar o efeito dos mananoligossacarídeos sobre o sistema imune de frangos de corte. O trabalho foi dividido em dois capítulos: Capítulo I que apresenta uma revisão bibliográfica sobre “Influência dos mananoligossacarídeos na resposta imunológica das aves” e no Capítulo II um trabalho científico desenvolvido com o objetivo de avaliar a “Quantificação de linfócitos T na mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com mananoligossacarídeo e desafiados com *Salmonella Enteritidis*”, através de análises bacteriológicas, histológicas e imunohistológicas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. Cellular and molecular immunology. In____. **Innate immunity**. Philadelphia: W. B.Saunders, p.270-290, 2000.
- BALLOU, C.E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **The Journal of Biological Chemistry**, v.245, p.1197-1203, 1970.
- BAURHOO, B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C.A. Cecal populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**, v.86, p.2509-2516, 2007.
- BIGGS, P.; PARSONS, C.M.; FAHEY, G.C. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v.86, p.2327-2336, 2007.
- BRADLEY, G. L. e SAVAGE, T.F. The effect of autoclaving a yeast culture of *Saccharomyces cerevisiae* on turkey poultry performance and the retention of gross energy, and selected minerals. **Animal Feed and Science Technology**, v.55, p.1-7, 1995.
- COLLET, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: **Ronda Latino-americana Alltech: O futuro da alimentação**. Alltech Biotechnology, Campinas, 20-30, 2000.
- CHOI, K.H.; NAMKUNG, H.; PAIK, I.K. Effects of dietary fructooligosaccharides on suppression of intestinal colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler chicken. **Korean Journal of Animal Science**, v.36, p.271-284, 1994.

- DIBNER, J.J.; KNIGHT, C.D.; KITCHEL, M.L.; ATWELL, C.A.; DOWNS, A.C.; IVEY, F.J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.7, p.425-436, 1998.
- GAST, R.K. e BEARD, C.W. Production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Diseases**, v. 34, p.438-446, 1990.
- GIBSON, G.R. e ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1012, 1995.
- HAYAT, J.; SAVAGE, T.F.; MIROSH, L.W. The reproductive performance of two genetically distinct lines of medium white turkey hens when fed breeder diets with and without a yeast culture containing *Saccharomyces cerevisiae*. **Animal Feed and Science Technology**, v.43, p.291-301, 1993.
- JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z.; JANKOWSKI, J. Selected parameters of gastrointestinal tract metabolism of turkeys fed diets with flavomycin and different inulin content. **World Poultry Science Journal**, v. 60, n. 2, p. 177-185, 2004.
- KLASING K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, n.8, p.1119-1125, 1998.
- KOGUT, M. H. e KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, p.103-110, 2009.
- MATHEW, A. G.; CHATTIN, S.E.; ROBBINS, C.M.; GOLDEN, D.A. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2138-2145, 1998.
- SHASHIDHARA, R.G. e DEVEGOWDA, G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poultry Science**, v.82, p.1319-1325, 2003.
- SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharide on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, n.2, p.205-211, 2000.
- STANLEY, V.G.; GRAY, C.; DALEY, M.; KRUEGER, W.F.; SEFTON, A.E. An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* spp.- infected litter. **Poultry Science**, v.83, p.39-44, 2004.
- ZHANG, A. W.; LEE, B.D.; LEE, S.K.; LEE, K.W.; AN, G.H.; SONG, K.B.; LEE, C.H. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. **Poultry Science**, v.84, p.1015-1021, 2005.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DAS AVES – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INFLUÊNCIA DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DAS AVES

(Mannanligosaccharides influence in the immune response of birds)

MARIANA CAMARGO LOURENÇO

RESUMO

Os mananoligossacarídeos (MOS) são um prebiótico utilizado como aditivo na ração de animais de produção e estimação. Esse produto, derivado da parede celular de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, possui comprovada ação no controle de bactérias patogênicas, através de mecanismos ainda pouco explicados. Apresenta ainda, uma importante atividade sobre o sistema imunológico das aves, proporcionando uma melhor resposta imune do organismo frente aos constantes desafios biológicos aos quais estes animais são expostos. Sobre este aspecto, há estudos que demonstram a atividade imunomoduladora dos mananoligossacarídeos. O objetivo desta revisão foi apresentar informações recentes sobre a influência dos mananoligossacarídeos sobre a resposta imune e as práticas aplicadas na produção de aves que poderiam utilizar este prebiótico na modulação da resposta imune.

Palavras-chave: frangos, imunomodulação, prebióticos, resposta imune.

ABSTRACT

Mannanligosaccharides (MOS) are a prebiotic used as additive in production and pets animal feed. This product, derived from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, has proven action in pathogenic bacteria control by mechanisms still poorly explained. It also presents an important activity on the immune system of birds, providing a better immune response against the constant biological challenges which these animals are exposed. There are studies which show the MOS immunomodulatory activity. The purpose of this review was to present recent information about the MOS influence on the immune response and the current practices in poultry production that could use this prebiotic in the immune response modulation.

Key words: broilers, immune response, immune modulation, prebiotics.

INTRODUÇÃO

A intensa seleção genética aplicada em animais de produção, principalmente para carne e ovos, tem sido indicada como efeito proporcionalmente negativo sobre a resistência desenvolvida nas aves a determinados patógenos e o desenvolvimento da resposta imunológica. Diversos autores tem apresentado que grande parte dos animais de alta produtividade mostra-se cada vez mais susceptível a infecções bacterianas e menos capaz de responder adequadamente a estímulos imunogênicos (Dibner et al., 1998; Morgulis, 2002; Zekarias et al., 2002), apresentando macrófagos com menor capacidade de atividade fagocítica e metabolismo oxidativo (Zekarias et al., 2002) . Em especial, no que se refere à indústria avícola mundial, existe uma constante busca por alta produtividade e baixos custos, onde se soma também o aumento da exigência do mercado consumidor pela redução de patógenos e um alimento mais seguro em meio a restrições ao uso de aditivos antimicrobianos na ração animal.

Associado a isso, a constante exposição natural da ave a patógenos endêmicos presentes no ambiente de produção avícola e o uso de vacinas demandam um intenso trabalho do sistema imunológico, que causam alterações metabólicas específicas desviando nutrientes necessários ao crescimento e produção para a resposta imunológica contra mecanismos invasores (Klasing, 1998). Além disso, ingredientes e aditivos alimentares podem interferir na resposta imunológica dos animais, prejudicando-a ou atuando de forma benéfica ao seu funcionamento.

Frente a isso, o mercado nutricional busca adequações nas fórmulas de ração e aditivos para atender a demanda e exigências do mercado consumidor, sem prejudicar a produtividade animal. Neste contexto, princípios ativos capazes de

equilibrar a microbiota intestinal e/ou que tenham atividade imunomoduladora parecem ser ferramentas cada vez mais interessantes de serem aplicadas na avicultura. Dentre essas ferramentas podem-se citar os ácidos orgânicos, organismos probióticos, compostos prebióticos e derivados de plantas como óleos essenciais e extratos vegetais. Essa revisão tem como objetivo abordar a função de aditivos caracterizados como prebióticos, principalmente manonoligossacarídeos, como aditivos imunomoduladores em aves.

O QUE SÃO PREBIÓTICOS?

Em 1980, os possíveis efeitos potenciais de prebióticos na alimentação animal já eram reconhecidos, o que desencadeou o desenvolvimento de muitas pesquisas. O uso de prebióticos em rações para animais de criação e de estimação tem sido documentado por diversos autores como Mul e Perry (1994), Iji e Tivey (1998, frangos de corte), Santin et al., (2003, frangos de corte) e Flickinger e Fahey (2002, pets, aves, suínos e coelhos).

Prebióticos foram então conceituados como ingredientes não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular o crescimento seletivo e/ou à atividade de um número limitado de bactérias no colon (Gibson e Roberfroid, 1995), combatendo a população de microorganismos patogênicos. Gibson e Roberfroid (1995) descrevem algumas características desejáveis de um prebiótico como não ser hidrolizado ou absorvido na parte superior do trato gastrointestinal (TGI); servir como substrato seletivo para um número limitado de bactérias comensais benéficas para o cólon; ser capaz de alterar a microbiota intestinal em favor de uma composição mais saudável e induzir efeitos luminais ou sistêmicos que são benéficos para a saúde do hospedeiro.

SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS COMO PREBIÓTICOS

São utilizados como prebióticos, carboidratos não digeríveis (oligo e polissacarídeos), alguns peptídeos, proteínas e alguns lipídios (ésteres e éteres). Oligossacarídeos são um grupo de carboidratos constituídos de 2-10 unidades de açúcar e cada oligossacarídeo tem uma estrutura química diferente. Segundo Shashidhara e Devegowda (2003) e Biggs et al. (2007), podemos citar os frutooligossacarídeos, transgalactoligossacarídeos e mananoligossacarídeos (MOS) como as classes de prebióticos mais utilizadas.

Os frutooligossacarídeos incluem oligossacarídeos não digeríveis e polissacarídeos não amiláceos, como a inulina e oligofrutose. Estes prebióticos são nomeados pelo seu comprimento da cadeia (grau de polimerização = DP). A inulina contém 20-60 DP e os frutanos sintéticos contém 2-4 DP. Oligofrutose contém 2-9 DP e pode ser obtido por hidrólise enzimática parcial da inulina (Gibson e Roberfroid, 1995). Estes carboidratos são expressos como não digeríveis, por não serem hidrolisados pelas enzimas endógenas do intestino delgado, mas sim por bactérias como bifidobactérias e lactobacilos (Gibson e Roberfroid, 1995; Bouhnik et al., 1997). No entanto, segundo Gibson e Roberfroid (1995), estes compostos apresentam o processo de fermentação bacteriana, na maioria das vezes, inespecífico, o que não permite que sejam classificados como prebióticos. Ocorrem naturalmente em vegetais, cereais e frutas como a cebola, alcachofra, brotos de bambu, raízes de chicória e banana. Suas propriedades físico-químicas dependem de sua estrutura química e composição. A maioria dos oligossacarídeos é solúvel em água ou fluidos fisiológicos (Gibson e Roberfroid, 1995).

Transgalactoligossacarídeos são um componente sintético produzido a partir de lactose por transgalactosilação enzimática realizada por fungos como *Aspergillus*

oryzae (Hsu et al., 2005), sendo formado por lactose e diversas moléculas de galactose. Possui ligações β -(1,6) e β -(1,4) que evitam sua digestão no intestino pela enzima β -galactosidase (Alles et al., 1999). Transgalactoligossacarídeos têm seus efeitos prebióticos pouco pesquisados para animais, no entanto, seu efeito bifidogênico é bastante comentado em seres humanos (Ito et al., 1993; Bouhnik et al., 1997). No Japão, é um composto bastante comercializado em nutrição humana (Ito et al., 1993).

Outro oligossacarídeo bastante pesquisado e de ação prebiótica é o MOS, derivado da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo Spring et al. (2000), a parede celular é separada do conteúdo intracelular e o líquido contendo MOS é evaporado à baixa temperatura (*spray dry*) para evitar a destruição da parte funcional da molécula do prebiótico. A parede celular da levedura pode representar 10-25% da matéria seca total da célula, dependendo das condições de crescimento. O percentual de oligossacarídeos na parede celular é de 85-90%, como glucanos e mananos, em proporções similares, e o restante é composto por proteínas, podendo conter até 1% de quitina (Swennen et al., 2006). MOS é composto de proteínas com proporções relativamente altas de serina, treonina, ácido aspártico e glutâmico e uma pequena quantidade de metionina. (Song e Li, 2001). A estrutura da parede celular da levedura é resistente à degradação das enzimas e bactérias do aparelho digestivo. Segundo Martínez et al. (2010) a composição da parede celular, sua estrutura e espessura, dependem do ciclo de vida da célula e da origem da estirpe utilizada.

FUNÇÕES DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS

Os prebióticos de maneira geral têm sido mostrados por alterar a microbiota do TGI, alterar o sistema imunológico (SI), prevenir o câncer de cólon, reduzir o número de patógenos, incluindo *Salmonella* Enteritidis e *E. coli* e reduzir o colesterol e compostos de odor (Cummings e MacFarlane, 2002).

Em especial, os benefícios dos MOS baseiam-se em propriedades específicas, que incluem a modificação da flora intestinal, a redução da taxa de renovação da mucosa intestinal (*turnover*) e a estimulação do SI (Spring et al., 2000). Os efeitos destes produtos de levedura sobre a produção em monogástricos têm sido relatados em aves comerciais (Hayat et al., 1993; Bradley e Savage, 1995; Stanley et al., 2004; Zhang et al., 2005). No entanto, o modo de ação dos produtos de levedura nestes animais ainda não está bem explicado. Diversos autores (Ofek et al., 1977; Spring et al., 2000; Fairchild et al., 2001; Fernandez et al., 2002) comentam a atuação benéfica de MOS sobre a microbiota intestinal, atuando como ligante de alta afinidade, ou ainda, um local de ligação competitiva por bactérias patogênicas manose específicas fímbria do tipo 1, que resulta em sua excreção dos intestinos (Spring et al., 2000; Baurhoo et al., 2007a). Outra possível alteração microbiana provocada pelo uso de MOS, assim como outros oligossacarídeos, é a redução do crescimento de bactérias intestinais, patogênicas ou não, através da diminuição do pH causada pelo aumento de ácidos graxos no ceco (Choi et al., 1994; Juskiewicz et al., 2004). O baixo pH reduz a habilidade de patógenos entéricos de colonizar o intestino, pois o crescimento de organismos oportunistas, incluindo *E. coli* e salmonelas, é favorecido pelo pH neutro, enquanto valores menores favorecem o crescimento de bactérias residentes, incluindo lactobacilos (Mathew et al., 1998). A confirmação dos efeitos da parede celular de levedura nas

crescentes concentrações da microbiota benéfica ou na redução de bactérias patogênicas foi relatada por diversos autores (Santin et al., 2003; Stanley et al., 2004; Baurhoo et al., 2007b; Baurhoo et al., 2009). No entanto, esses efeitos não foram verificados em outros estudos (Mathew et al., 1998; White et al., 2002; Van Heugten et al., 2003).

Os produtos de levedura podem ainda, afetar a digestibilidade dos nutrientes (Bradley e Savage, 1995; Shin et al., 2005) e o desenvolvimento da mucosa intestinal (Santin et al., 2003; Zhang et al., 2005; Baurhoo et al., 2007 b), melhorando assim os parâmetros zootécnicos do animal. Morales-López et al.(2009) e Hooge (2004) afirmam que MOS expressa melhor suas propriedades benéficas quando utilizado na suplementação de aves mantidas sob condições de desafio microbiano. A suplementação de rações de aves com MOS pode melhorar o ganho de peso e a conversão alimentar (Parks et al., 2001 e Hooge, 2004). Além disso, Shashidhara e Devegowda (2003) relataram melhora na eclodibilidade de matrizes suplementadas com MOS e Dimovelis et al. (2004) e Gracia et al. (2004) observaram melhora na produção e qualidade de ovo em aves de postura tratadas com este prebiótico, no entanto, recente estudo de Martínez et al. (2010) não demonstra estes benefícios.

SISTEMA IMUNE DAS AVES E MANANOLIGOSSACARÍDEOS

A resposta imunológica das aves é formada pela imunidade natural/inata e adquirida/específica. A imunidade inata não só é responsável pela primeira linha de defesa contra microorganismos, mas também participa da indução de respostas imunes específicas, a qual é composta de imunidade humoral e celular. O desenvolvimento destas respostas específicas é desencadeado somente após

contato com o antígeno e possui especificidade no reconhecimento dos invasores e o desenvolvimento da memória; portanto, resulta em uma resposta mais rápida da que ocorre na exposição primária (Kogut e Klasing, 2009).

Os frangos de corte têm estruturas linfóides distribuídas ao longo do trato gastrointestinal, podendo apresentarem-se de forma difusa ou agregados. Os componentes difusos incluem os linfócitos intraepiteliais, bem como da mucosa e lâmina própria; os componentes agregados incluem as Placas de Peyer, tonsilas cecais e a bolsa de Fabrício. Estes tecidos capturam e processam antígenos disponíveis no aparelho digestivo através de várias células de defesa, além de linfócitos T e derivados de linfócitos B como as imunoglobulinas IgM, IgG e IgA. O estímulo imunológico da mucosa favorece a produção de anticorpos IgA, principalmente nas Placas de Peyer, que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (Oláh e Vervelde, 2008).

Carboidratos não digeríveis como os MOS podem estimular o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), bem como o SI sistêmico. Uma hipótese do funcionamento desse mecanismo de ação sugere que os receptores tipo Toll, presentes na membrana celular das células do GALT, possuem a capacidade de identificar moléculas denominadas PAMPs (“pathogen-associated molecular patterns), as quais identificam o antígeno. As PAMPs podem ser encontradas em componentes da parede celular de levedura como mananos e glucanos juntamente com outras moléculas microbianas, tais como peptidoglicano, lipopolissacarídeo, e glicolípídeos (Ballou, 1970). Os MOS, vinculados aos macrófagos, são reconhecidos como açúcares específicos encontrados em glicoproteínas da superfície bacteriana, desencadeando uma reação em cascata que acabaria por ativar macrófagos e promover a liberação de citocinas, ativando a resposta imune adquirida (Collet,

2000). Segundo alguns autores (Savage et al., 1996; Shashidhara e Devegowda, 2003), este prebiótico também apresenta propriedades imunomoduladoras, pois os MOS, em níveis elevados, aumentam a resposta dos anticorpos protetores e melhoram a resistência a doenças reduzindo a resposta aguda (Silva et al., 2009). A redução da resposta imunológica aguda é fundamental para melhorar o desempenho dos animais, uma vez que essa resposta, ao ocorrer, é a que demanda mais tempo e recursos orgânicos do animal.

Além do efeito imunoestimulante e/ou imunomodulador próprio dos MOS, os prebióticos podem apresentar efeitos benéficos indiretos sobre o SI. Ao melhorar a saúde intestinal, beneficiam a absorção de nutrientes fundamentais ao bom funcionamento do SI, tais como Zn, Cu, Se (Shashidhara e Devegowda, 2003). Da mesma forma, bactérias produtoras de ácido lático, as quais possuem seu crescimento favorecido pelo prebiótico, produzem substâncias imunomoduladoras que reagem com o SI em diferentes níveis, incluindo a produção de citocinas, células mononucleares e a fagocitose dos macrófagos, bem como a indução de grandes quantidades de imunoglobulinas, especialmente IgA (Cummings e MacFarlane, 2002).

Suplementar MOS demonstrou aumentar a produção de IgA em ratos (Kudoh et al., 1999), cães (Swanson et al., 2002), e perus (Savage et al., 1996). A produção de IgA é importante para a imunidade, pois inibe a penetração de bactérias no lumen, aumenta a produção de muco e impede a inflamação que causa danos teciduais no epitélio (McKay e Perdue, 1993). Estudo recente de Silva et al. (2009) sugere que a suplementação de MOS resultou em significativa melhora na resposta de anticorpos em frangos de corte.

Apesar dos efeitos de MOS sobre a imunidade humoral secretora estarem bem documentados, dados relacionados a imunidade celular são escassos na literatura, sendo necessários mais estudos referentes a seus efeitos sobre a atividade do sistema imunológico.

CONCLUSÃO

A melhoramento genético em animais de produção associado a demanda por alimentos seguros e a restrição ao uso de antimicrobianos na ração animal, têm exigido maiores estudos sobre os suplementos alimentares que buscam atender a essas novas necessidades. Sabe-se que a nutrição é uma das principais ferramentas para suprir as necessidades orgânicas dos animais e proporcionar desempenho e produtividade associados ao bom funcionamento do sistema de defesa contra agentes patogênicos. Os aditivos nutricionais podem afetar benéficamente o sistema imunológico dos animais, atuando como agentes imunomoduladores. Nesse contexto, compreender a influência dos prebióticos, principalmente os mananoligossacarídeos, sobre o sistema imunológico das aves torna-se um ponto interessante para o contínuo crescimento da indústria avícola.

REFERÊNCIAS

- ALLES, M. S.; HARTEMINK, R.; MEYBOOM, S.; HARRYVAN, J.L.; VAN LAERE, K.M.; NAGENGAST, F.M.; HAUTVAST, J.G. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.980–991, 1999.
- BALLOU, C.E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **The Journal of Biological Chemistry**, v.245, p.1197-1203, 1970.
- BAURHOO, B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C.A. Cecal populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**, v.86, p.2509-2516, 2007a.
- BAURHOO, B.; PHILIP, L.; RUIZ – FERIA, C.A. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.1070–1078, 2007b.
- BAURHOO, B.; GOLDFLUS, F. ; ZHAO, X. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.8 (2), p.133-137, 2009.
- BIGGS, P.; PARSONS, C.M.; FAHEY, G.C. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v.86, p.2327-2336, 2007.
- BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; D’AGAY-ABENSOUR, L.; POCHART, P.; GRAMET, G.; DURAND, M.; RAMBAUD, J.C. Administration of transgalactooligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **Journal of Nutrition**, v.127, p.444–448, 1997.
- BRADLEY, G. L. e SAVAGE, T.F. The effect of autoclaving a yeast culture of *Saccharomyces cerevisiae* on turkey poultry performance and the retention of gross energy, and selected minerals. **Animal Feed and Science Technology**, v.55, p.1–7, 1995.
- CHOI, K.H.; NAMKUNG, H.; PAIK, I.K. Effects of dietary fructooligosaccharides on suppression of intestinal colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler chicken. **Korean Journal of Animal Science**, v.36, p.271-284, 1994.
- COLLET, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: **Ronda Latino-americana Alltech: O futuro da alimentação**. Alltech Biotechnology, Campinas, 20-30, 2000.
- CUMMINGS, J.H. e MacFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, n.2, p.145-151, 2002.
- DIBNER, J.J.; KNIGHT, C.D.; KITCHEL, M.L.; ATWELL, C.A.; DOWNS, A.C.; IVEY, F.J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.7, p.425-436, 1998.
- DIMOVELIS, P.; CHISTAKI, E.; TSERVENI-GOUSSI, A.; SPAIS, B. Performance of layer fed a diet with mannan-oligosaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Mos). In: WORLD’S POULTRY CONGRESS, XXII, 2004, Istambul. **Anais...** The World’s Poultry Science Association WPSA, 2004, p 106-108.

- FAIRCHILD, A. S.; GRIMES, J.L.; JONES, F.T.; WINELAND, M.J.; EDENS, F.W.; SEFTON, A.E. Effects of hen age, Bio-Mos, and Flavomycin on poultry susceptibility to oral *Escherichia coli* challenge. **Poultry Science**, v.80, p.562–571, 2001.
- FERNANDEZ, F.; HINTON, M.; VAN GILS, B. Dietary mannan oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. **Avian Pathology**, v.31, p.49–58, 2002.
- FLICKINGER, E.A. e FAHEY JUNIOR, G.C. Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.297-300, 2002.
- GIBSON, G.R. e ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1012, 1995.
- GRACIA, M.I.; CACHALDORA, P.; TUCKER, L.; BAUCCELLS, F.; MEDEL, P. Effect of mannan oligosaccharides supplementation to laying hen diets. **Poultry Science**, v.83 (supp 1), p.397, 2004.
- HAYAT, J.; SAVAGE, T.F.; MIROSH, L.W. The reproductive performance of two genetically distinct lines of medium white turkey hens when fed breeder diets with and without a yeast culture containing *Saccharomyces cerevisiae*. **Animal Feed and Science Technology**, v.43, p.291–301, 1993.
- HOOGE, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannanoligosaccharides, 1993-2003. **International Journal of Poultry Science**, v.3, p.163-174, 2004.
- HSU, C. A.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 197-206, 2005.
- IJI, P.A. e TIVEY, D.R. Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. **World's Poultry Science**, v.54, p.129-143, 1998.
- JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z.; JANKOWSKI, J. Selected parameters of gastrointestinal tract metabolism of turkeys fed diets with flavomycin and different inulin content. **World Poultry Science Journal**, v. 60, n. 2, p. 177-185, 2004.
- ITO, M.; DEGUCHI, Y.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, M.; ONODERA, N.; YAJIMA, T. Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.39, p.635–640, 1993.
- KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, p.1119-1125, 1998.
- KOGUT, M. H. e KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, p.103–110, 2009.
- KUDOH, K.; SHIMIZU, J.; ISHIYAMA, A.; WADA, M.; TAKITA, T.; KANLE, Y.; INNAMI, S. Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.45, p.173–181, 1999.

- McKAY, D. M. e PERDUE, M.H. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. **Digestive Diseases and Science**, v.38, p.1377–1387, 1993.
- MARTÍNEZ, B.F.; CONTRERAS, A.A.; GONZÁLEZ, E.A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls in diets for two genetic strains of laying hens reared in floor and cages. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.2, p.105-108, 2010.
- MATHEW, A. G.; CHATTIN, S.E.; ROBBINS, C.M.; GOLDEN, D.A. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2138–2145, 1998.
- MORALES-LÓPEZ, R.; AUCLAIR, E.; GARCÍA, F. ; ESTEVE-GARCIA, E.; BRUFAU, J. Use of yeast cell walls; β -1,3 / β -1,6 glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets. **Poultry Science**, v.88, p.601-607, 2009.
- MORGULIS, M.S. Imunologia Aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLEZ, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 231-245. 2002.
- MUL, A.J. e PERRY, F.G. The role of fructooligosaccharides in animal nutrition. In: GARNSWORTHY, P.C. e COLE, D.J.A. **Recent Advances in Animal Nutrition**. Nottingham, UK, Nottingham University Press, 57-79, 1994.
- OFEK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature**, v.265, p.623–625, 1977.
- OLÁH, I. e VERVELDE, E. Structure of the avian lymphoid system. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**. Great Britain: ELSEVIER, 13-50, 2008.
- PARKS, C. W.; GRIMES, J.L.; FERKET, P.R.; FAIRCHILD, A.S. The effect of mannan oligosaccharides, bambarmycins, and virginiamycin on performance of large white male market turkeys. **Poultry Science**, v.80, p.718–723, 2001.
- SANTIN, E.; PAULILLO, A.C.; MAIORKA, A.; NAKAGHI, L.S.O.; MACARI, M.; DA SILVA, A.V.F.; ALESSI, A.C. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.2, p.341-344, 2003.
- SAVAGE, T.F.; COTTER, P.F. e ZAKRZEWSKA, E.I. The effect of feeding mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, v.75(Suppl. 1), p.143, 1996.
- SHASHIDHARA, R.G. e DEVEGOWDA, G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poultry Science**, v.82, p.1319-1325, 2003.
- SHIN, Y. W.; KIM, J.G.; WHANG, K.Y. Effect of supplemental mixed yeast culture and antibiotics on nitrogen balance of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 83(Suppl. 1), p.34, 2005.
- SILVA, V.K.; DELLA TORRE DA SILVA, J.; TORRES, K.A.A.; DE FARIA FILHO, D.E.; HADA, F.H.; DE MORAES, V.M.B. Humoral immune response of broilers fed diets containing yeast extract and prebiotics in the prestarter phase and raised at

different temperatures. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18. p.530-540, 2009.

SONG, J.Y. e LI, W.F. The preparation of mannan-oligosaccharide from *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on intestinal microflora in chicken. **Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)**, v.27, p.447-450, 2001.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A ; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella* – challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.205–211, 2000.

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

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E,A.; BAUER, L.L.; HEALY, H.P.; DAWSON, K.A.; MERCHEN, N.R.; FAHEY JUNIOR; G.C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentration of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.980–989, 2002.

SWENNEN, K.; COURTIN, M.C.; DELCOUR, J.A. Nondigestible oligosaccharides with probiotic properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, p.459- 469, 2006.

VAN HEUGTEN, E.; FUNDERBURKE, D.W., DORTON, K.L. Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1004–1012, 2003.

WHITE, L. A.; NEWMAN, M.C.; CROMWELL, G.L.; LINDEMANN, M.D. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2619–2628, 2002.

ZEKARIAS, B.; TER HUURNE, A.; LANDMAN, W.J.M.; REBEL, J.M.J.; POL, J.M.A.; GRUYS, E.. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v.33, p.109-125, 2002.

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

CAPÍTULO 2

QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T NA MUCOSA
INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS
COM MANANOLIGOSSACARIDEO E DESAFIADOS COM
SALMONELLA ENTERITIDIS

QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T NA MUCOSA INTESTINAL DE
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM
MANANOLIGOSSACARIDEO E DESAFIADOS COM
SALMONELLA ENTERITIDIS
(*T lymphocytes in intestinal mucosa of broiler chickens supplemented with
mannanligosaccharides and challenged with
Salmonella Enteritidis*)

MARIANA CAMARGO LOURENÇO

RESUMO

Mananoligossacarídeos (MOS) tem sido utilizados no controle de microorganismos e por sua interação com a resposta imune animal. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de células CD3+, CD4+, CD8+ e caliciformes no intestino de frangos vacinados e desafiados com SE, suplementados com MOS. Foram utilizados 3 grupos experimentais: Controle, com dieta a base de milho e farelo de soja; MOS 1 (1kg/Ton 1-21dias e 0,5 kg/Ton 22-56 dias); e MOS 2 (2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias). O MOS na ração reduziu significativamente a excreção fecal de SE pelas aves 14 dias após o desafio e na mucosa de íleo e ceco foi observado aumento de células CD3+ e redução do número de células caliciformes após a vacinação. O inverso desta relação ocorre aos 56 dias, após o desafio com SE. Estes resultados demonstram uma relação inversa entre células CD3+ e o número de células caliciformes na mucosa intestinal sugerindo que a suplementação com MOS aumenta a resposta imune específica por células CD3+ e reduz a resposta imune inata relacionada a produção de muco pelas células caliciformes. Também houve aumento de células CD4+ e CD8+ aos 56 dias.

Palavras-chave: caliciformes; imunidade celular; linfócitos T; MOS

ABSTRACT

Mannanligosaccharides (MOS) have been used to control microorganisms and possibly interact with the immune response of the animal. The aim of this study was evaluate the presence of CD3+, CD4+, CD8+ and goblet cells on intestines of broilers vaccinated and challenged with SE, supplemented with MOS. Were used three experimental groups: Control, diet based on corn and soybean; MOS 1 (1kg/Ton 1-21days and 0,5 kg/Ton 22-56 days); and MOS 2 (2kg/Ton 1-21days and 1kg/Ton 22-56 days). MOS supplementation in diet had significantly reduced the fecal shedding of SE by bird 14 days after challenge and ileum and cecum mucosa showed increase of CD3+ expression and reduction of number of goblet cell after vaccinated. The inverse relation occurs at 56 days, after SE challenge. Theses results showed a inversely relationship between CD3+ cells and number of goblet cells on intestinal mucosal suggesting that MOS on diet increase specific immune response by CD3+ cells and reduce the innate immune response related to mucus production by reducing the number of goblet cells. There was an increase of CD4+ and CD8+ cells at 56 days.

Keywords: celular immunity; goblet; MOS; T-cells

INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma das zoonoses mais difundidas em todo o mundo, sendo que as infecções em seres humanos estão muitas vezes associadas ao consumo de produtos derivados de aves (Caffer e Eigner, 1994; Fantasia e Filetici, 1994; Glòsnicka e Kunikowska, 1994; Poppe, 1994), como carne e ovos crus ou mal cozidos, contaminados com *Salmonella* sp. (Humphrey, 1994; Molbak e Neimann, 2002). A *Salmonella* Enteritidis (SE) é o segundo sorotipo mais relacionado a estas infecções nos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, 2005) e pode infectar a ave na ausência de uma doença clínica (Gast e Beard, 1990). Para combater estes patógenos, o sistema imunológico das aves faz uso de recursos como a imunidade inata, capaz de combater agentes inespecíficos, podendo ainda desenvolver modos específicos de defesa, através da imunidade celular e humoral (Kogut e Klasing, 2009).

A eliminação efetiva de agentes nocivos no trato gastrointestinal está relacionada a um tecido linfóide altamente especializado (GALT) responsável pela formação do epitélio característico que cobre o tecido linfóide. Nas aves, a maior parte do tecido que recobre a superfície intestinal é constituído por um epitélio regular, apenas algumas estruturas exclusivas, como as tonsilas cecais, placas de Peyer e divertículo de Meckel, apresentam este revestimento especializado (Befus et al., 1980).

De fato, o epitélio da mucosa não é apenas uma barreira física, mas também o desencadeador da resposta imune inata para *Salmonella*. O encontro de células epiteliais especializadas com microorganismos rapidamente estimula a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias que atraem células imunes inatas, como granulócitos e macrófagos, capazes de desencadear um amplo leque de novas reações imunes

(Van Immerseel et al., 2002). As células caliciformes, presentes na membrana das vilosidades do intestino, são responsáveis pela síntese e secreção de glicoproteínas de alto peso molecular, conhecidas como mucinas. A secreção de mucina é responsável pela manutenção da camada de muco que desempenha papel importante na lubrificação do trato intestinal, transporte de nutrientes entre o conteúdo luminal e revestimento epitelial (Baurhoo et al., 2009), proteção contra danos mecânicos e ácido e enzimas digestivas. Mais importante ainda, as células caliciformes e seus produtos representam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores por conter substâncias antimicrobianas e imunoglobulinas IgA (Sklan, 2005). A composição da dieta pode afetar o número relativo de células caliciformes e a composição química das mucinas secretadas, que por sua vez, podem alterar a susceptibilidade ou a resistência à colonização por patógenos (Fernandez et al., 2000). O contínuo processo de secreção de mucina juntamente com os movimentos peristálticos permite a excreção de patógenos presos ao intestino (Baurhoo et al, 2009).

Nos casos em que mecanismos imunes inatos não são suficientes para evitar a multiplicação bacteriana, um sistema imune adaptativo ou específico é utilizado na tentativa de erradicar os invasores. Mecanismos imunes adaptativos são divididos em imunidade celular mediada, que atua predominantemente através de células T, e imunidade humoral, que opera por meio de anticorpos específicos. No caso de infecções por *Salmonella* em aves, evidências recentes indicam que mecanismos de resposta imune humoral não desempenham um papel essencial na depuração da infecção primária ou na proteção a longo prazo (Beal et al., 2004). Por isso, grande esforço tem sido empreendido para explorar a defesa imune celular das aves nos diferentes órgãos, tais como o intestino, baço, fígado e sangue. Mudanças no

número, distribuição e proliferação de células T (Beal et al., 2004) e um tipo de hipersensibilidade com resposta retardada foram observadas por alguns pesquisadores (Hassan e Curtiss, 1994).

Aditivos alimentares que interagem com a resposta imune têm considerável potencial para reduzir a susceptibilidade das aves a doenças infecciosas. Neste contexto tem-se estudado a relação entre sistema imune e saúde animal frente ao uso de prebióticos como frutooligossacarídeos, transgalactoligossacarídeos e mananoligossacarídeos (MOS). Os MOS são derivados da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, e como os demais prebióticos, são ingredientes não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular o crescimento seletivo e/ou à atividade de um número limitado de bactérias da microbiota intestinal (Gibson e Roberfroid, 1995). O estudo de seu modo de ação e demais benefícios é de particular interesse para a avicultura, uma vez que os MOS não só alteram a microbiota intestinal (Spring et al., 2000; Fairchild et al., 2001), mas também apresentam propriedades imunomoduladoras (Savage et al., 1996; Shashidhara e Devegowda, 2003).

Os MOS agem reduzindo o crescimento de algumas bactérias intestinais, patogênicas ou não, através da redução do pH causada pelo aumento de ácidos graxos no ceco (Choi et al., 1994; Juskiewicz et al., 2004). Atuam ainda por representarem sítios alternativos para a ligação de bactérias Gram-negativas manose específicas fímbria tipo 1 (Ofek et al., 1977; Spring et al., 2000; Fairchild et al., 2001; Fernandez et al., 2002) evitando que o patógeno faça adesão nos enterócitos, o que dificulta a instalação de quadros infecciosos e, por conseqüência, reduz a colonização (Spring et al., 2000; Baurhoo et al., 2007a) e melhora a imunidade local do trato intestinal.

O ceco é conhecido como reservatório de *Salmonella*, porém o íleo representa um importante segmento intestinal a ser estudado por situar-se próximo ao ceco, sendo também freqüentemente colonizado por bactérias como a *Salmonella* (Thompson e Applegate, 2006). Segundo Berndt et al. (2007) a capacidade dos sorovares de *Salmonella* de entrar na mucosa cecal e a invasão de camadas inferiores afeta tanto o nível quanto a natureza da resposta imune no tecido. A SE possui alta capacidade invasiva e pode facilmente ser encontrada nas células da lâmina própria, aumentando assim o recrutamento de granulócitos, células CD8+ e interleucinas.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi quantificar os linfócitos T presentes na mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com mananoligossacarídeo (MOS), acompanhado de vacina e desafio com *Salmonella* Enteritidis.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Ambiente

Foram utilizados 45 frangos de corte machos Cobb® de um dia de idade, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 15 repetições, sendo cada ave uma repetição. A distribuição dos animais foi realizada com base no peso corporal, calculando-se, para isso média de peso do grupo e desvio padrão. As aves foram suplementadas via ração com mananoligossacarídeo (MOS), sendo o grupo controle alimentado com ração a base de milho e farelo de soja (ração controle), o grupo MOS 1 suplementado via ração controle com menor concentração de MOS (1kg/Ton 1-21dias e 0,5 kg/Ton 22-56 dias) e o grupo MOS 2 suplementado via ração controle com maior concentração de MOS (2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias)

As aves foram alojadas de 1 a 56 dias de vida em três boxes experimentais, sendo um box para cada tratamento. Os animais foram identificados individualmente através de anilhas fixadas na membrana da asa e submetidos semanalmente a pesagem individual. Foi oferecido água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental, sendo mantidas condições ambientais de perfeito conforto térmico para as aves. Esse experimento foi conduzido com a aprovação do Comitê de Ética Animal do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Protocolo n° 013/2009.

Vacinação

Aos 14 e 28 dias de vida, todas as aves foram imunizadas com vacina comercial inativada (Nobilis®Salenvac, Intervet UK Ltda.) contra *Salmonella* Enteritidis (SE) através de aplicação no tecido subcutâneo do pescoço. Na primeira dose foi administrado 0,1mL/ave e na segunda dose 0,5mL/ave, conforme recomendações do fabricante do produto.

Preparação do inóculo de SE e desafio das aves

Cultura contendo *Salmonella* Enteritidis (SE) e mantida sob refrigeração, cepa isolada de frangos de corte e identificada pelo Instituto Oswaldo Cruz, foi cultivada por 12 horas à 37°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e posteriormente plaqueada em meio Ágar Mueller Hinton e incubado por 24 horas a 37°C. Apenas uma colônia foi transferida para solução salina estéril 0,9% e homogeneizada para obter a turbidez de 0,5 na escala de MacFarland, correspondendo a uma concentração de 10⁸ UFC (Unidades Formadoras de Colônia). Para obter solução contendo 10⁵ UFC de SE, foram realizadas diluições decimais consecutivas. Aos 42 dias de idade, todas as aves foram desafiadas

através de inoculação com 1 mL de uma solução contendo 10^5 UFC de SE, através de uma seringa acoplada a uma sonda por via oroesofágica.

Análise Microbiológica

Suabes de cloaca de todos os animais foram coletados aos 44, 49 e 56 dias de vida das aves e as amostras processadas para contagem de *Salmonella*. Os suabes foram colocados em tubos contendo 2 mL de água peptonada 2% e incubados a 35°C por uma hora. Uma porção de 1 mL desta solução foi retirada e pipetada em um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) e assim sucessivamente até a diluição 10^{-2} e 10^{-3} . Foram retirados 100 µL de cada diluição e plaqueado em duplicata em meio XLD, espalhados com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h para posterior contagem das colônias (adaptado de Desmit et al., 1998). Os resultados foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia da Normativa nº6 publicada em 26 de agosto de 2003 (BRASIL - MAPA). Os tubos contendo os suabes e a água peptonada 2% foram incubados a 35°C por 24h. Nos casos das amostras em que não houve crescimento de colônias típicas de *Salmonella* após 24h de incubação, foram retirados 100 µL da solução de suabe em água peptonada 2% e adicionado em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, então incubado em estufa regulada a 42°C por 24h para confirmação da presença ou ausência.

Análises histológica e imunohistoquímica

Aos 7, 37 e 56 dias de idade, cinco aves de cada tratamento foram eutanasiadas através de deslocamento cervical e necropsiadas para colheita de amostras de íleo e cecos em solução de formalina tamponada 10% para avaliações

histológica e imunohistoquímica (CD3). Os mesmos segmentos intestinais foram coletados ao 56 dias e rapidamente congelados em nitrogênio líquido para análise imunohistoquímica (CD4 e CD8).

Para as análises histológicas, as amostras foram incluídas em parafina, seccionadas com 5µm de espessura e coradas com Hematoxilina & Eosina (HE) adicionada de coloração azul de algodão, sendo posteriormente analisadas quanto à presença de células calciformes em microscopia de luz com ampliação de 40X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA). Vinte e cinco vilos foram analisados em cada grupo experimental, para cada segmento intestinal, totalizando 75 vilos por segmento intestinal por grupo experimental (adaptado de Santin et al., 2001).

Para as análises de linfócitos CD3+, as amostras foram incluídas em parafina, seccionadas com 5µm de espessura e fixadas em lâminas carregadas positivamente. As seções foram desparafinadas em xilol a 60°C por 20 minutos e re-hidratadas em água e álcool. A recuperação antigênica foi realizada com Tampão Citrato pH 6,0 em banho-maria a 100°C por 10 minutos e o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% e proteína bloqueadora por 8 minutos. O anticorpo primário utilizado foi Anti-CD3 (CD3 Dako 1:750), incubado em refrigerador "overnight". Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação utilizou-se cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas.

Para as análises de linfócitos CD4+ e CD8+, as amostras foram incluídas em gel Tissue-Tek O. C. T. (Miles, Elkhart IN, US), congeladas em nitrogênio líquido,

seccionadas com 5µm de espessura em um aparelho criostato e fixadas em lâminas carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e proteína bloqueadora por 8 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech 1:100) e Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech 1:100), incubados por 90 minutos a 37°C. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação utilizou-se cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas.

Campos microscópicos com presença de células positivas foram quantificados em microscopia de luz com ampliação de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA). Foram analisados 10 vilos por segmento intestinal para cada grupo experimental, totalizando 30 vilos do íleo e 30 vilos do ceco, para cada marcador de superfície celular.

Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico Statistix for Windows Copyright (C) 2008. Os resultados de contagem de colônias foram transformados em Log 10 previamente a análise estatística. Os testes realizados foram o ANOVA ($P < 0.05$) e as médias diferentes submetidas ao teste Exato de Fischer.

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os valores de ganho de peso nos períodos de 1 a 21 dias, 1 a 42 dias, 1 a 49 dias e 1 a 56 dias de vida das aves. Nos períodos de 1 a 21 dias e 1 a 42 dias de idade, o grupo MOS 2 apresentou pior ganho de peso quando comparado aos outros grupos experimentais, porém não foi observada diferença estatística em outros períodos para análise de ganho de peso (dados não apresentados).

Tabela 1: Média e Desvio Padrão do Ganho de peso das aves nos períodos de 1 a 21 dias, 1 a 42 dias, 1 a 49 dias e 1 a 56 dias de vida das aves nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Ganho de peso (g)			
	1 a 21 dias	1 a 42 dias	1 a 49 dias	1 a 56 dias
Controle	886,3 ^a ± 37,04	3028,7 ^a ± 106,9	3758,5 ± 133,2	4267,9 ± 270,6
MOS 1	863,9 ^a ± 61,3	3017,6 ^a ± 127,9	3732,6 ± 136,9	4352,6 ± 192,9
MOS 2	799,7 ^b ± 62,6	2861,0 ^b ± 144,5	3646,0 ± 163,5	4324,3 ± 217,2
Valor de P	0,003	0,045	0,347	0,771

¹ 1kg/Ton 1-21dias e 0,5kg/Ton 22-56 dias; ² 2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das análises microbiológicas para contagem de SE. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais nas coletas realizadas aos 2 e 7 dias após desafio com SE, porém o grupo MOS 1 reduziu a excreção fecal de SE aos 14 dias após o desafio quando comparado aos outros grupos experimentais.

Tabela 2: Contagem de *Salmonella* Enteritidis, UFC/suabe Log 10, em suabes de cloaca coletados aos 2, 7 e 14 dias após desafio (AD) nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	2 dias AD	7 dias AD	14 dias AD
	(44 dias de idade)	(49 dias de idade)	(56 dias de idade)
UFC (Log)			
Controle	3,31	3,68	3,91 ^a
MOS 1	3,60	3,91	2,64 ^b
MOS 2	3,35	3,22	2,76 ^{ab}
Valor de P	0,811	0,102	0,027

¹ 1kg/Ton 1-21dias e 0,5kg/Ton 22-56 dias; ² 2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os valores da quantificação de células caliciformes no íleo e ceco das aves. No íleo, aos 37 dias, o grupo MOS 1 apresentou menor número de células caliciformes por vilão quando comparado com os demais grupos experimentais. Nos fragmentos de ceco foi observado, no grupo controle e MOS 2, uma redução no número de células caliciformes por vilão aos 37 dias e aumento deste número aos 56 dias ou 44 dias após desafio com SE. O grupo MOS 1 não apresenta esta tendência, visto que estas aves quase sempre apresentaram maior número de células caliciformes quando comparadas aos grupos controle e MOS 2.

Tabela 3: Média e Desvio Padrão da Contagem de células caliciformes no íleo das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Histologia, 40X).

Íleo			
Grupos	Número de células caliciformes/ vilão		
	7 dias	37 dias	56 dias
Controle	53,90 ^a ± 31,06	132,10 ^{ab} ± 51,89	122,45 ± 48,98
MOS 1	31,90 ^b ± 16,67	116,05 ^b ± 38,67	116,00 ± 39,94
MOS 2	34,25 ^b ± 21,33	163,15 ^a ± 46,15	94,95 ± 36,02
Valor de P	0,0087	0,0069	0,1051

¹ 1kg/Ton 1-21dias e 0,5kg/Ton 22-56 dias; ² 2kg/Ton 1-21dias e 1 kg/Ton 22-56 dias.
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

Tabela 4: Média e Desvio Padrão da Contagem de células caliciformes nos cecos das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Histologia, 40X).

Ceco			
Grupos	Número de células caliciformes/vilão		
	7 dias	37 dias	56 dias
Controle	10,70 ^a ± 6,17	2,35 ^b ± 1,92	5,05 ^{ab} ± 3,21
MOS 1	6,25 ^b ± 2,31	4,40 ^a ± 2,72	5,70 ^a ± 3,49
MOS 2	10,05 ^a ± 3,79	1,90 ^b ± 1,68	3,35 ^b ± 1,78
Valor de P	0,0043	0,0012	0,0393

¹ 1kg/Ton 1-21dias e 0,5kg/Ton 22-56 dias; ² 2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias.
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

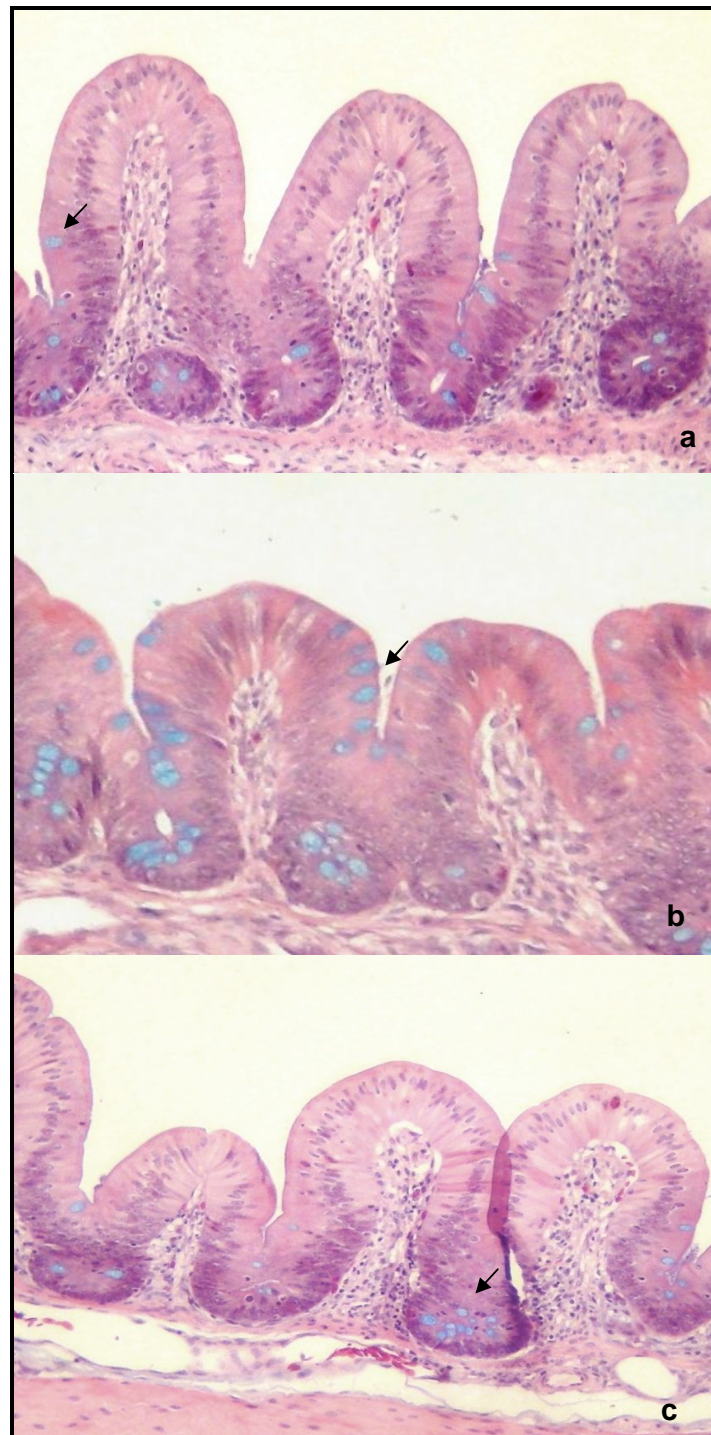


Figura 1: Fotomicrografia dos cecos das aves com 37 dias de vida, comparando os intestinos dos diferentes grupos experimentais (a- Controle; b- MOS 1; c- MOS 2) em relação a quantidade de células caliciformes (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Histologia, 40X).

O marcador de superfície celular CD3 é observado em células-T em diferentes estágios de maturação. Porém, a presença deste marcador não permite fazer a diferenciação em células-T auxiliares ou citotóxicas. Para este fim utilizam-se os marcadores CD4 e CD8, os quais identificam linfócitos T auxiliar e citotóxico, respectivamente. Neste estudo, como observado na Tabela 5, o grupo MOS 2 apresentou maior número de células CD3+ que o grupo controle e MOS 1 nos segmentos de íleo e ceco aos 7 dias e no íleo aos 37 dias, mas após o desafio com SE os grupos MOS 1 e MOS 2 apresentaram mais células CD3+ que o grupo controle nos segmentos de íleo e ceco. A contagem de células CD4+ e CD8+ no íleo, aos 56 dias, foi maior no grupo MOS 2. No ceco, neste mesmo período, os grupos suplementados MOS 1 e MOS 2 apresentaram maior contagem de células CD4+ quando comparados com o grupo controle e a contagem de células CD8+ foi maior no grupo MOS 2. No íleo, a relação CD4+:CD8+ demonstra maior proporção de células CD4+ nos grupos controle e MOS 1 e células CD8+ no grupo MOS 2. Nos cecos observou-se maior proporção de células CD8+ nos grupos controle e MOS 2.

Tabela 5: Média e Desvio Padrão da Contagem de células CD3+ no íleo e cecos das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Imunohistoquímica, 100X).

Grupos	Células CD3+					
	Íleo			Ceco		
	7 dias	37 dias	56 dias	7 dias	37 dias	56 dias
Controle	30,5 ^b ±7,6	80,5 ^b ±20,9	70,1 ^b ±26,3	5,5 ^b ±3,5	22,9±13,2	16,8 ^b ±6,8
MOS 1	30,0 ^b ±10,7	97,7 ^b ±15,2	107,0 ^a ±23,8	6,5 ^{ab} ±0,8	35,5±13,7	27,9 ^a ±10,8
MOS 2	47,1 ^a ±16,6	121,2 ^a ±24,8	91,9 ^{ab} ±44,9	11,7 ^a ±2,2	30,4±8,1	20,9 ^{ab} ±5,4
Valor de P	0,0056	0,0007	0,0586	0,0164	0,0775	0,0153

¹ 1kg/Ton 1-21dias e 0,5kg/Ton 22-56 dias; ² 2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

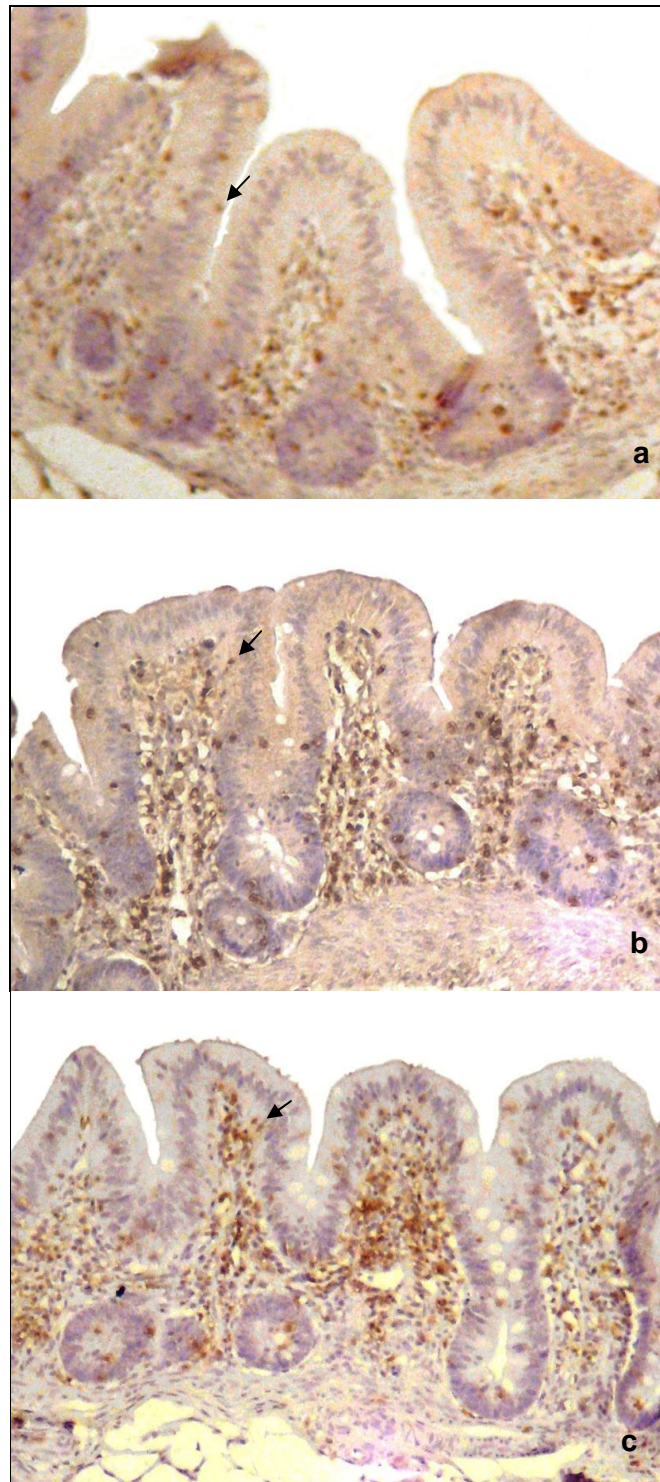


Figura 2: Fotomicrografia dos cecos de aves com 56 dias de vida, comparando os intestinos dos diferentes grupos experimentais (a- Controle; b- MOS 1; c- MOS 2) em relação a quantidade de células CD3+ (indicadas pelas setas) presentes na mucosa intestinal. (Imunohistoquímica, 40X).

Tabela 6: Média e Desvio Padrão da Contagem de células CD4+ e CD8+ no íleo e cecos das aves aos 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Imunohistoquímica, 100X).

Grupos	Células CD4+ e CD8+			
	Íleo		Ceco	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
Controle	24,4 ^c ± 10,13	13,7 ^c ± 4,72	15,6 ^b ± 6,02	27,8 ^b ± 8,08
MOS 1	34,9 ^b ± 9,89	29,8 ^b ± 8,61	30,4 ^a ± 6,33	25,7 ^b ± 5,56
MOS 2	43,6 ^a ± 9,15	58,5 ^a ± 15,57	33,2 ^a ± 7,76	40,4 ^a ± 8,24
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

¹ 1kg/Ton 1-21dias e 0,5kg/Ton 22-56 dias; ² 2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias.
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

Tabela 7: Relação de células CD4+:CD8+ no íleo e cecos das aves aos 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais (Imunohistoquímica, 100X).

Grupos	Relação de Células CD4+:CD8+	
	Íleo	Ceco
Controle	1,97 ± 1,08 ^a	0,58 ± 0,20 ^c
MOS 1	1,32 ± 0,58 ^b	1,31 ± 0,48 ^a
MOS 2	0,74 ± 0,23 ^c	0,85 ± 0,24 ^b
Valor de P	0,0002	<0,0001

¹ 1kg/Ton 1-21dias e 0,5kg/Ton 22-56 dias; ² 2kg/Ton 1-21dias e 1kg/Ton 22-56 dias.
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

A Figura 3 apresenta os valores da contagem de células CD3+ e da quantificação de células caliciformes por vilo no ceco das aves. Nestes podemos observar uma relação inversa entre o número de células caliciformes e células CD3+ na mucosa intestinal das aves, onde após a aplicação das doses vacinais houve um aumento do número de células CD3+ e redução do número de células caliciformes. Após 14 dias do desafio com SE (56 dias) a mucosa intestinal das aves apresentou aumento do número de células caliciformes e redução de células CD3+ quando comparado aos valores observados aos 37 dias.

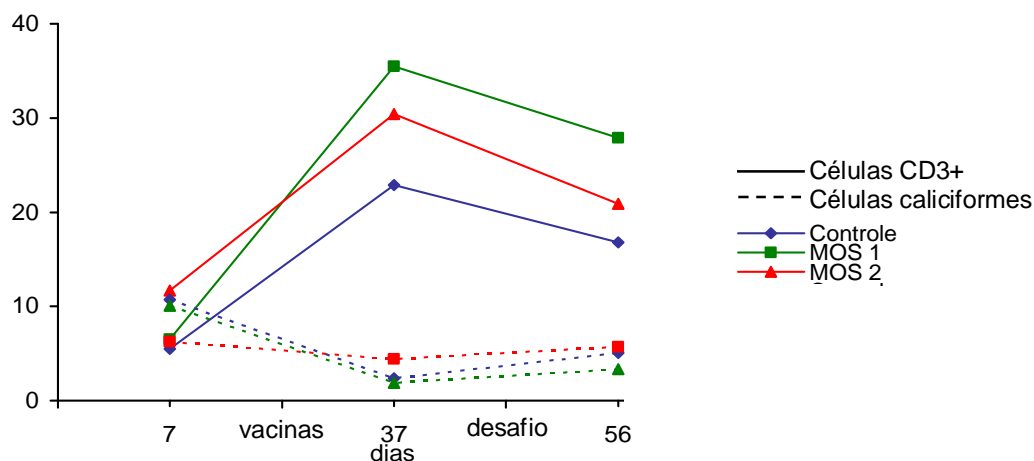


Figura 3: Quantificação de células CD3+ e células caliciformes nos cecos das aves aos 7, 37 e 56 dias de vida nos diferentes grupos experimentais.

DISCUSSÃO

Os uso de MOS na ração de aves pode melhorar o desempenho produtivo (Hooge et al., 2004; Baurhoo et al., 2007b) e o rendimento de carcaça (Demir et al., 2001) de frangos de corte, pelos seus efeitos positivos sobre a mucosa intestinal e sistema imune e por diminuir a colonização de bactérias patogênicas. Entretanto, não é incomum o relato de casos onde não houve influência do uso de MOS sobre parâmetros produtivos (Shashidhara e Devegowda, 2003; Morales-López et al., 2009 e Martínez et al. 2010), podendo ocorrer até mesmo redução no ganho de peso (Flemming et al., 2004). Essa discrepância nos resultados se dá, provavelmente, pelas diferenças nas dosagens do prebiótico, ingredientes utilizados nas formulações de rações, condições sanitárias de criação das aves e diferenças no delineamento experimental, entre outros fatores.

No presente estudo, os resultados de ganho de peso, referentes os períodos de 1 a 7 dias e 1 a 14 dias de idade, não mostram diferença significativa entre os

tratamentos, como também relatado em estudos de Santin et al. (2001) e Zhang et al. (2003). Porém, nos períodos de 1 a 21 dias e 1 a 42 dias de idade, as aves do grupo MOS 2 tiveram pior ganho de peso, dados estes que discordam de um estudo semelhante realizado por Ribeiro et al. (2007), onde não houve desafio vacinal. No presente estudo, a análise dos resultados de ganho de peso em comparação com a quantificação de células CD3+ fornece uma relação direta entre estes dois parâmetros, onde a redução no ganho de peso ocorre simultaneamente ao aumento na quantificação de células CD3+ no grupo MOS 2 (Tabela 1 e Tabela 5). Sugere-se então que houve uma interferência do processo de vacinação nestes resultados de ganho de peso, pois as doses vacinais foram aplicadas aos 14 e 28 dias de vida das aves. Segundo Klassing (1998) a resposta imune pode aumentar a necessidade de recursos orgânicos pelo animal e assim, afetar o desempenho das aves, como também sugerido por Dibner et al. (1998) e Kogut (2009). Os mecanismos de defesa contra um agente estranho, do ponto de vista nutricional, requerem substratos como aminoácidos e vitaminas que são necessários para apoiar a proliferação clonal dos linfócitos, o recrutamento de monócitos e heterófilos da medula óssea, a síntese de moléculas efetoras como imunoglobulinas, e moléculas de comunicação como citocinas.

O sistema imune inato das aves é capaz de reconhecer estruturas características de microorganismos patogênicos e que não estão presentes nas células de aves e mamíferos como lipopolissacarídeos e mananoligossacarídeos (Abbas, 2000). A ação protetora dos derivados de parede celular de levedura tem sido descrita como imunomodulação não específica devido ao envolvimento de diferentes vias, incluindo a ativação de macrófagos, estimulação de células-T,

estimulação do sistema reticulo endotelial, ativação de células NK, ativação de vias complementares clássicas e alternativas (Zekovic et al., 2007) e aumento da produção de anticorpos (Shashidhara e Devegowda, 2003). Observando-se estes dados pode-se sugerir que a suplementação com altos níveis de MOS pode aumentar o recrutamento de células imunes pelo trato intestinal das aves, elevando o gasto energético para a manutenção fisiológica do animal.

Nos resultados obtidos nas análises bacteriológicas, após 14 dias do desafio com SE, as aves suplementadas com menor nível de mananoligossacarídeo (MOS1) apresentaram redução na excreção fecal de SE. Frente a isto, o uso de níveis menores do prebiótico pode ser mais eficiente, pois não provoca perda no ganho de peso das aves e o número de células CD3+ não apresentou alteração significativa antes do desafio com SE (Tabela 5), onde a expressão de células CD3+ aumenta quando relacionada com a redução da excreção fecal de SE. Um estudo de Ribeiro et al. (2007), com pintos de 1 dia e desafiados ao terceiro dia, não encontrou diferença significativa na contagem de colônias positivas de SE em amostras de fezes coletadas 12 e 25 dias após o desafio, porém, Spring et al. (2000) obteve diferenças significativas na contagem de SE em amostras de fezes coletadas 7 dias após o desafio. Segundo Jin et al. (1997), a concentração do inóculo, variação entre cepas de *Salmonella* Enteritidis, propriedades e quantidades do prebiótico e variações na idade e saúde da ave podem levar a resultados discrepantes.

Diversos estudos demonstram a interferência provocada pelo uso dos MOS em aumentar a quantidade de células caliciformes nas vilosidades intestinais de frangos de corte e perus (Savage et al, 1997; Baurhoo et al, 2007b;. Solis de los Santos et al, 2007; Baurhoo et al., 2009), porém os valores encontrados no presente estudo são contrários a estes resultados. O exato mecanismo subjacente a esse

efeito ainda não está claramente definido e esta oposição de resultados pode ser explicada pela dose utilizada de MOS e variações existentes entre os diferentes segmentos intestinais. Um estudo de Savage et al. (1997) verificou aumento de células caliciformes no duodeno e jejuno, com um nível de inclusão de 0,33% de MOS e nenhuma variação significativa quando foi utilizado um nível de inclusão de 0,11%.

Com base nos resultados obtidos na quantificação de células caliciformes e CD3+, sugere-se que uma maior quantidade de MOS na ração provoca uma imunoestimulação, enquanto que a menor quantidade suplementada via ração provoca uma imunomodulação. Observou-se que existe uma relação inversa entre o número de células CD3+ e a expressão de células caliciformes na mucosa intestinal, uma vez que houve aumento de células CD3+ e redução do número de células caliciformes após a vacinação. Após 14 dias do desafio com SE (56 dias de idade) as aves apresentaram aumento no número de células caliciformes e redução de células CD3+ quando comparado aos dados referentes a 37 dias de idade. Nas aves do grupo suplementado com menor nível de mananoligossacarídeos (MOS 1) isto também ocorre, mas com pequena variabilidade, a qual pode ser benéfica para o desempenho animal. A camada de muco, produzida pelas células caliciformes, atua como um meio de proteção físico e biológico e também é um componente da resposta imune inata que é regulada em resposta à inflamação e infecção (Uni. et al, 2003).

A análise quantitativa de células CD4+ e CD8+, realizada aos 56 dias de idade das aves mostra um grande aumento destas células na mucosa intestinal dos grupos suplementados quando comparados ao grupo controle, o que sugere novamente uma forte ação imunogênica dos MOS. A proporção de células T CD4 +

e CD8 + pode ser utilizada para avaliar o estado imunológico das aves devido ao seu papel importante na imunidade celular (Lillehoj e Trout, 1994). Segundo Arstila (1994), as células T CD4+ estão envolvidas com a ativação de macrófagos e a modulação da resposta imune, enquanto que células T CD8+ desempenham funções relacionadas com a eliminação do antígeno (Zou et al., 2006). No presente estudo, a relação CD4+:CD8+ em comparação com a excreção de SE demonstra uma relação direta entre a presença da SE e um aumento no recrutamento de linfócitos T citotóxicos (Tabela 2 e Tabela 7). Berndt et al. (2006) também observou este aumento significativo de células CD8+ nos cecos de aves vacinadas e submetidas a infecção com *Salmonella* Enteritidis. Os resultados referentes aos grupos suplementados sugerem que um maior nível de MOS relaciona-se mais claramente com os processos fisiológicos da mucosa intestinal de frangos de corte, enquanto que menores níveis de MOS parecem ser mais eficientes no controle da excreção de SE. Especula-se que a presença que um grande aglomerado de MOS no lúmen intestinal predisponha a uma menor exposição dos sítios capazes de se ligar aos microorganismos, tornando o contato com a mucosa intestinal mais intenso. Uma menor quantidade de MOS permite que mais moléculas do prebiótico estejam em contato com a SE, diminuindo assim a excreção nas fezes. No íleo, estas verificações não aparecem de forma muito evidente, uma vez que este não é considerado um local de predileção para o estabelecimento de bactérias patogênicas como a SE.

A suplementação com MOS desencadeou um efeito dose-resposta nas aves com desafio microbiológico, pois houve uma maior contagem de linfócitos T no grupo MOS 2 quando comparado com o grupo MOS 1. O aumento significativo de células T CD4+ e CD8+ (Tabela 6) nos grupos suplementados, quando comparado

ao grupo controle, sugere que MOS pode aumentar a resposta celular, como também observado por Gao et al. (2009). O aumento de linfócitos T auxiliar e citotóxico em relação ao grupo controle demonstra melhora na eficiência do SI, o que indica que MOS pode melhorar a função imunológica e auxiliar na resposta da ave durante o desafio.

CONCLUSÃO

A suplementação com mananoligossacarídeos, (MOS 1: 1kg/Ton 1-21 dias e 0,5kg/Ton 22-56dias) na ração das aves foi capaz de diminuir a excreção fecal de SE, 14 dias após o desafio, quando comparadas ao grupo controle. Os resultados sugerem uma relação inversa entre a presença de células CD3+ e a expressão de células calciformes ou imunidade inata. Foi observada maior quantificação de células CD4+ e CD8+ e maior proporção de células CD8+ em relação as CD4+ no íleo e ceco nas aves suplementadas com alto nível de MOS (2kg/Ton 1-21 dias e 1kg/Ton 22-56dias) e desafiadas com SE aos 56 dias.

REFERENCIAS

- ABBAS, A.K. Cellular and molecular immunology. In _____. **Innate immunity**. Philadelphia: W. B.Saunders, p.270-290, 2000.
- ARSTILA, T.P.; VAINIO, O.; LASSILA, O. Central role of CD4+ T cells in avian immune response. **Poultry Science**, v.73, p.1019–1026, 1994.
- BAURHOO, B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C.A. Cecal populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**, v.86, p.2509-2516, 2007a.
- BAURHOO, B.; PHILIP, L.; RUIZ – FERIA, C.A. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.1070–1078, 2007b.
- BAURHOO, B.; GOLDFLUS, F.; ZHAO, X. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.8 (2), p.133-137, 2009.
- BEAL, R.K., POWERS, C.; WIGLEY, BARROW, P.A.; SMITH, A.L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Avian Pathology**, v.33, p.25–33, 2004.
- BEFUS, D. A.; JOHNSTON, N.; LESLIE, G.A.; BIENENSTOCK, J. Gutassociated lymphoid tissue in the chicken. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. **The Journal of Immunology**, v.125, p.2626–2632, 1980.
- BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v.75, n.12, p.5993-6007, 2007.
- BERNDT, A.; PIEPER, J.; METHNER, U. Circulating $\delta\gamma$ T cells in response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, n.7, v.74, p.3967-3978, 2006.
- BRASIL**, Instrução Normativa nº6 de 26 de agosto de 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. 2003.
- CAFFER, M. I. e EIGUER, T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.15–19, 1994.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2004. US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- CHOI, K.H.; NAMKUNG, H.; PAIK, I.K. Effects of dietary fructooligosaccharides on suppression of intestinal colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler chicken. **Korean Journal of Animal Science**, v.36, p.271-284, 1994.
- DEMIR, E.; SEKEROGLU, A.; SARICA, S. Comparison of the effects of flavomycin, mannanoligosaccharides and probiotic addition to broiler diets. **British Poultry Science**, v. 42, Suppl. 1, p. S89-S90, 2001.

- DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; MAST, J.; GODDEERIS, B. M.; KASPERS, B.; HALSEBROUCK, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type four infection in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 63, p. 355-367, 1998.
- DIBNER, J.J.; KNIGHT, C.D.; KITCHEL, M.L.; ATWELL, C.A.; DOWNS, A.C.; IVEY, F.J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.7, p.425-436, 1998.
- FAIRCHILD, A. S.; GRIMES, J.L.; JONES, F.T.; WINELAND, M.J.; EDENS, F.W.; SEFTON, A.E. Effects of hen age, Bio-Mos, and Flavomycin on poultry susceptibility to oral *Escherichia coli* challenge. **Poultry Science**, v.80, p.562-571, 2001.
- FANTASIA, M e FILETICI, E. *Salmonella enteritidis* in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.7-13, 1994.
- FERNANDEZ, F.; SHARMA, R.; HINTON, M.; BEDFORD, M.R. Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, p.1793-1801, 2000.
- FERNANDEZ, F.; HINTON, M.; VAN GILS, B. Dietary mannan oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. **Avian Pathology**, v.31, p.49-58, 2002.
- FLEMMING, J.S.; FREITAS, J.R.S; FONTOURA, P.; MONTANHIMI NETO, R.; ARRUDA, J.S. Use of mannanoligosaccharides in broiler feeding. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, p.159-161, 2004.
- GAO, J; ZHANG, H.J.; WU, S.G.; YU, S.H.; YOON, I.; MOORE, D.; GAO, Y.P.; YAN, H.J.; QI, G.H. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. **Poultry Science**, v.88, p.2141-2151, 2009.
- GAST, R.K. e BEARD, C.W. Production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Diseases**, v. 34, p.438-446, 1990.
- GIBSON, G.R. e ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1012, 1995.
- GLÒSNICKA, R. e KUNIKOWSKA, D. The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.21-30, 1994.
- HASSAN, J. O.; CURTISS, R. Virulent *Salmonella typhimurium* induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. **Infection and Immunity**, v.62, p. 2027-2036, 1994
- HOOGE, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannanoligosaccharides, 1993-2003. **International Journal of Poultry Science**, v.3, p.163-174, 2004.
- HUMPHREY, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.31-40, 1994.

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

JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z.; JANKOWSKI, J. Selected parameters of gastrointestinal tract metabolism of turkeys fed diets with flavomycin and different inulin content. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 2, p. 177-185, 2004.

KLASING K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, n.8, p.1119-1125, 1998.

KOGUT, M. H. e KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, p.103–110, 2009.

LILLEHOJ, H. S. e TROUT, J.M. CD8+ T cell-coccidia interactions. **Parasitology Today**, v.10, p.10–14, 1994.

MARTÍNEZ, B.F.; CONTRERAS, A.A.; GONZÁLEZ, E.A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls in diets for two genetic strains of laying hens reared in floor and cages. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.2, p.105-108, 2010.

MOLBAK, K. e NEIMANN, J. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella enteritidis*, Denmark, 1997 – 1999. **American Journal of Epidemiology**, v.156, p.654–661, 2002.

MORALES-LÓPEZ, R.; AUCLAIR, E.; GARCÍA, F. ; ESTEVE-GARCIA, E.; BRUFAU, J. Use of yeast cell walls; β -1,3 / β -1,6 glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets. **Poultry Science**, v.88, p.601-607, 2009.

OFEK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature**, v.265, p.623–625, 1977.

POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.1–5, 1994.

RIBEIRO, A.M.L.; VOGT, L.K.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M.; LABRES, R.V.; SREACK, A.F.; BESSA, M.C. Effects of prebiotics and probiotics on the colonization and immune response of broiler chickens challenge with *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.3, p.193-200, 2007.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diet containing *Saccharomices Cerevisiae* cell wall. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.10, p.236–244, 2001.

SAVAGE, T.F.; COTTER, P.F.; ZAKRZEWSKA, E.I. The effect of feeding mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, v.75(Suppl. 1), p.143, 1996.

SAVAGE, T.F.; ZAKRZEWSKA, E.I.; ANDREASEN, J.R. The effects of feeding mannan oligosaccharide supplemented diets to poults on performance and the morphology of the small intestine. **Poultry Science**, v.76 (Suppl. 1), p.139, 1997.

SHASHIDHARA, R.G. e DEVEGOWDA, G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poultry Science**, v.82, p.1319-1325, 2003.

SKLAN, D. Development of defense mechanisms in the digestive tract of the chick. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.14, p.437–443, 2005.

SOLIS DE LOS SANTOS, F.; DONOGHUE, A.M.; FARNELL, M.B.; FARNELL, G.R.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; DONOGHUE, D.J. Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poults supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (Alphamune). **Poultry Science**, v.86, p.921-930, 2007.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharide on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, n.2, p.205-211, 2000.

THOMPSON, K.L.; APPLGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. **Poultry Science**, v.85, p.1535-1540, 2006.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and Posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p.320-327, 2003.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The effect of vaccination with a *Salmonella enteritidis* aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. **Vaccine**, v.20, p.3034-3041, 2002.

ZEKOVIC, D.B.; KWIATKOWSKI, S.; VRVIC, M.M.; JAKOVLJEVIC, D.; MORAN, C.A. Natural and modified (1/3)- β -D-Glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, p.205-230, 2005.

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

ZOU, F.C.; JIANG, Y.P.; NIE, K.; SHANG, Y.X.; LI, H.L. Dynamic changes of CD4+ and CD8 T lymphocyte subpopulations in blood of chicks infected with *Eimeria tenella*. **Poultry Husbandry and Disease Control**, v.1, p.4-7, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mananoligossacarídeos (MOS) são prebióticos de importante utilização para a manutenção da saúde animal, principalmente na resposta imunológica. Seus efeitos dependem da dose a ser utilizada e podem ser influenciados pela presença ou ausência de um desafio sanitário.

No presente estudo, a suplementação de MOS na dieta, a base de milho e farelo de soja, provocou alteração na resposta imune da mucosa intestinal de frangos de corte vacinados e desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Sugere-se que a suplementação com menores níveis de MOS propicia um controle mais efetivo de microorganismos patogênicos, enquanto que maiores níveis de suplementação parecem interagir de maneira mais evidente com a resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte.

Frente a isso, recomenda-se constante estudo sobre os níveis de MOS utilizados na ração de frangos de corte e suas ações nas respostas fisiológicas e imunológicas da ave.