

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIDIANE BOARETO SCAPINI

SUPLEMENTAÇÃO DE β -MANANASE EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE
CRIADOS EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E COMERCIAIS



PALOTINA

2015

LIDIANE BOARETO SCAPINI

SUPLEMENTAÇÃO DE β -MANANASE EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE
CRIADOS EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E COMERCIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal, linha de pesquisa em Nutrição, Manejo Animal e Forragicultura, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Jovanir Inês Muller Fernandes

PALOTINA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S284 Scapini, Lidiane Boareto
Suplementação de β -Mananase em dietas para frangos de corte criados em condições experimentais e comerciais / Lidiane Boareto Scapini. - Palotina, 2015
126 p.

Orientadora: Jovanir Inês Muller Fernandes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. β -Mananase. 2. Eimeria. 3. Farelo de soja. 4. Microbiota intestinal. 5. Resposta imune. I. Fernandes, Jovanir Inês Muller. II. Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL
Código CAPES: 40001016077P8

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LIDIANE BOARETO SCAPINI**, intitulada: "**SUPLEMENTAÇÃO DE β -MANANASE EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE CRIADOS EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E COMERCIAIS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua *aprovação*, completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em CIÊNCIA ANIMAL**.

Palotina, 02 de Outubro de 2015.

Prof. JOVANIR INES MULLER FERNANDES
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof. ELISABETE TAKIUCHI

Prof. CINTHIA EYNG

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lidiane Boareto Scapini, filha de Eliane Aparecida Boareto Scapini e Pedro Albino Scapini, nasceu em Joaçaba, Santa Catarina, dia 11 de fevereiro de 1990.

Iniciou o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina em março de 2008, concluído em dezembro de 2012.

Em março de 2013 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

Em outubro de 2014 foi contratada pela empresa Globoaves Agroavícola Ltda, em Cascavel, Paraná, onde atua na área de Nutrição Animal.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

À Deus, por sempre estar a minha frente.

Aos meus pais Pedro e Eliane pelo imenso amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo em minha vida. Por sempre guiar meus passos.

Aos meus pais, Pedro e Eliane pela força e incentivo incondicional em todos os momentos. À minha irmã Uliana por todo apoio e carinho. Agradeço a esta família por ser tudo em minha vida.

À Profa. Jovanir, por todas as oportunidades proporcionadas. Agradeço pela valiosa orientação, pelos conhecimentos repassados, pela paciência e por esta chance. Obrigada por permitir caminhar ao seu lado por estes anos.

A Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pela oportunidade de realização deste sonho.

Ao Vinicius e a Elanco, pelo fornecimento da β -mananase e auxílio nas análises para realização dos experimentos.

À Mayra pelo forte laço de amizade formado. Obrigada por toda ajuda, conselhos e paciência. A Dayane, Álvaro, Ricardo, Tom e Isabelle, pela amizade e auxílio na condução dos experimentos.

Aos amigos e colegas do LEA, Daiane, Mauricio, Alessandro, Luis, Jonas, Cassiano, Heloisa, Anete, Joice, Adrieli, Rafaela e Patricia pelo companheirismo e ajuda incansável.

Ao Cristiano Bortoluzzi, pela amizade de longa data e pela fundamental ajuda em todos os processos desta dissertação.

Ao Prof. Nelson Fernandes e à Adriana Pedroso, por toda ajuda nas análises e interpretação dos resultados da microbiota intestinal.

À Franciele e ao Ivânio por toda dedicação e princípios repassados e acima de tudo, pela compreensão nos momentos de ausência.

A empresa comercial por permitir que tivéssemos acesso às condições necessárias para realização do experimento.

Estendo meus agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para realização desta dissertação.

RESUMO

Foram realizados três experimentos com o objetivo de estudar o efeito da suplementação de β -mananase em três situações distintas: aumento da inclusão de fibra bruta na dieta, desafio experimental com *Eimeria* sp. e em condições de criação comercial sobre o desempenho zootécnico, qualidade intestinal, perfil imunológico e caracterização da microbiota intestinal de frangos de corte.

Experimento I: o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de β -mananase e fibra sobre o desempenho produtivo, a morfometria intestinal e o rendimento de carcaça. Foram alojados 1440 pintinhos machos distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (sem e com enzima e nível baixo e moderado de fibra). A enzima β -mananase foi incluída na dose de 400g/ton e a fibra na quantidade de 3,0 e 4,5%, respectivamente. Aos 21 dias, houve interação significativa ($p < 0,05$) entre a inclusão de enzima e fibra sobre a conversão alimentar. Dietas com nível moderado de fibra e suplementadas com a enzima apresentaram resultado semelhante a dietas com baixa fibra e sem enzimas. Os melhores resultados para ganho de peso e consumo de ração de 1 a 42 dias de idade foram encontrados nas aves que receberam dieta com nível moderado de fibra ($p < 0,05$) independente da suplementação enzimática. Aos 21 dias a morfometria intestinal do duodeno, jejuno e íleo (comprimento do vilo, profundidade da cripta, relação vilo:cripta e área de absorção) não foi alterada pelos tratamentos, enquanto que aos 42 dias as aves que não receberam a suplementação com a β -mananase, apresentaram um maior comprimento de vilo e conseqüentemente, uma maior área de absorção ($p < 0,05$). Observou-se ainda aumento ($p < 0,05$) dos pesos absoluto e relativo do intestino a partir de dietas com nível moderado de fibra e também, do fígado ($p < 0,05$) em função da adição de enzima ou fibra aos 21 dias de idade. Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre fibra e enzima para os pesos absoluto e relativo do fígado aos 42 dias. Níveis moderados de fibra sem a suplementação enzimática resultaram nos maiores valores para peso de fígado. O rendimento de carcaça aos 42 dias de idade das aves não foi influenciado pelo nível de fibra das dietas e a β -mananase. Porém, houve interação significativa ($p < 0,05$) para a gordura abdominal, onde dietas com nível moderado de fibra acrescidas da enzima resultaram em menor percentual de gordura na carcaça. Não foi encontrada diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na qualidade da cama (umidade e pH) com a inclusão da enzima nas dietas. O uso de β -mananase em dietas com maior concentração de fibra melhora a conversão alimentar de frangos de corte de 1 a 21 dias e pode ser uma importante estratégia nutricional e econômica em situações de indisponibilidade de matéria prima de melhor qualidade. Dietas com níveis moderados de fibra resultaram em maior ganho de peso aos 42 dias.

Experimento II: o objetivo do trabalho foi estudar o efeito da suplementação de β -mananase em dietas de frangos de corte desafiados com *Eimeria* sp. sobre o desempenho zootécnico, a morfometria intestinal, o perfil imunológico e a microbiota intestinal. Foram alojadas 320 pintinhos machos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (sem e com enzima e sem e com desafio). A enzima β -mananase foi incluída na dose de 400g/ton e as aves foram desafiadas com vacina contra coccidiose aos 14 dias de idade. O consumo de ração, uma semana após o desafio experimental, foi maior ($p < 0,05$) nas aves que não receberam a suplementação enzimática. No período de 1 a 21 dias de idade, o peso vivo e o ganho de peso foram maiores ($p < 0,05$) para as aves que não foram suplementadas. De 1 a 42 dias, a pior conversão alimentar foi encontrada nas aves que não receberam a β -mananase. Uma semana após o desafio, as aves que consumiram dietas controle e foram desafiadas apresentaram maior proporção ($p < 0,05$) de populações de linfócitos T CD8 ativados. Nesta mesma idade, observou-se maior profundidade de cripta, menor relação vilo:cripta e maior número de células calciformes nas aves desafiadas. Entretanto, aos 42 dias, as aves desafiadas apresentaram maior relação vilo:cripta, menor número de células calciformes. Já, as aves que receberam a suplementação enzimática apresentaram uma menor profundidade de cripta ($p < 0,05$), o que resultou na melhor relação vilo:cripta. Independente da presença da *Eimeria* sp., a enzima aumentou ($p < 0,05$) o número de espécies e a diversidade no intestino delgado, em comparação com o tratamento controle, sendo que no ceco apenas aumentou ($p < 0,05$) a diversidade. A melhor compreensão sobre a interação entre os compostos vegetais não-digeríveis, seus metabólitos intestinais, a microbiota intestinal e o hospedeiro abrirá novas possibilidades de produzir novos aditivos nutricionalmente otimizados que promovem a saúde do hospedeiro, através da manipulação da comunidade microbiana do intestino.

Experimento III: o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da adição de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja sobre a morfometria intestinal, perfil imunológico, ocorrência de calos de pés, rendimento de carcaça e a caracterização da microbiota intestinal de frangos de corte criados em granjas comerciais. Foram utilizados 4 aviários *dark house*, e em cada um foram alojados 34 mil pintos de 1 dia de idade da linhagem Cobb Slow. Os tratamentos consistiram na inclusão ou não da enzima β -mananase, sendo a mesma dieta para cada 2 aviários, compostas a base de milho e farelo de soja.

Aos 21 e 42 dias de idade das aves, 16 aves/tratamento foram capturadas de forma aleatória para análise histomorfométrica do intestino (altura e largura dos vilos e a profundidade e largura das criptas e contagem de células caliciformes.). O rendimento de carcaça de cortes comerciais de 40 aves/tratamento foi determinado aos 46 dias de idade das aves em um abatedouro comercial. Também foram coletados 3600 pés/tratamento para a avaliação de ocorrência de calos de pés. Não houve efeito significativo da adição de β -mananase sobre nenhuma das medidas morfométricas de intestino, rendimento de carcaça ou perfil imunológico. A suplementação das dietas com enzima resultou em maior grau de laves com lesão leve, em comparação com o grau médio e grave. A avaliação da microbiota intestinal mostrou a ocorrência de espécies distintas não somente entre os tratamentos, mas pouco compartilhada entre os aviários da mesma granja. A inclusão de β -mananase não trouxe melhorias nas respostas produtivas de frangos de corte criados em condições comerciais.

Palavras-Chave: β -mananase, *Eimeria*, farelo de soja, microbiota intestinal, resposta imune

ABSTRACT

Three experiments to study the effect of β -mannanase supplementation in different situations were made: increase in inclusion of crude fiber in the diet, experimental challenge with *Eimeria* sp. and in commercial breeding conditions upon the performance, quality intestinal, immune profile and characterization of intestinal microbiota of broilers. Experiment I: the aim of this study was to assess the effect of β -mannanase and fiber on performance, gut morphometry and carcass yield. 1440 male chicks were housed and placed following a completely randomized design in a factorial scheme 2 x 2 (with and without enzyme and low and moderate levels of fiber). β -mannanase was added in a dose of 400g/ton; fiber levels of 3,0 and 4,5%, respectively. At 21 days of age, there was a significant interaction ($p < 0,05$) between the enzyme and the fiber on feed conversion; diets with moderate level of fiber and enzyme inclusion showed similar result to those diets with low percentage of fiber and without enzyme. Fowls that received moderate level of fiber ($p < 0,05$) obtained the best results for weight gain and feed intake from 1 to 42 days of age, regardless the enzyme addition. In addition, while at 21 days of age the gut morphometry of duodenum, jejunum and ileum (villus length, crypt depth, villus: crypt ratio and absorption surface) did not suffer any change by the treatments, at 42 days-old the fowls which did not receive β -mannanase supplementation had higher villus length. As a result, a larger absorption surface was seen ($p < 0,05$). There was also an increase ($p < 0,05$) of absolute and relative gut weight of those birds that underwent treatment with moderate fiber level; as well as the liver, due to the enzyme or fiber inclusion at 21 days of age. A significant interaction ($p < 0,05$) could be observed between fiber and enzyme on relative and absolute weights of the liver at 42 days of age; furthermore, moderate levels of fiber without the enzyme contributed to heavier livers. The fiber level in diets containing β -mannanase did not influence carcass yield at 42 days of age. However, there was a significant interaction ($p < 0,05$) in diets with moderate level of fiber and β -mannanase on abdominal fat pad, which influenced on a lower amount of fat in the carcass. Diets with moderate levels of fiber reflected in higher weight gain at 42 days of age. Regarding litter quality (pH and moisture), no statistical differences were found ($p > 0,05$) when adding the enzyme. Indeed, the presence of β -mannanase in diets with higher levels of fiber improved feed conversion of broilers from day 1 to day 21. This feature could be an important economical and nutritional strategy when lacking quality products. Experiment II: the aim of this study was to access the effect of β -mannanase addition in diets of *Eimeria*-challenged broilers on performance, intestinal morphometry, immunological profile and gut microbiota. There were housed 320 male chicks following a completely randomized design in a factorial scheme 2 x 2 (with and without enzyme and with and without the challenge). The enzyme β -mannanase was added according to the dose of 400g/ton and the birds were challenged with vaccine against coccidiosis at 14 days of age. One week after the challenge, feed intake was higher ($p < 0,05$) in those birds that did not receive enzymatic supplementation. From 1 to 21 days of age, the live weight and the weight gain showed higher numbers ($p < 0,05$) on birds that were not supplemented. In terms of feed conversion ratio, animals that did not receive β -mannanase showed the worst result from 1 to 42 days. Challenged fowls fed with control diet presented a better proportion ($p < 0,05$) of T CD8 activated lymphocytes one week after the challenge implementation. In addition, at this same age, crypt depth was greater, lower villus: crypt proportion and higher number of goblet cells in challenged birds. However, at 42 days of age, challenged birds showed greater villus: crypt proportion and less goblet cells while birds that received enzymatic supplementation presented lower crypt depth ($p < 0,05$), which reflects in a greater villus: crypt proportion. Regardless the *Eimeria* sp., the enzyme increased ($p < 0,05$) the species number and diversity into the small intestine when comparing to the control; nonetheless, in the cecum only diversity increased ($p < 0,05$). In summary, a better understanding about the interaction between non-digestible vegetable components, its intestinal metabolites and microbiota and host will reveal new options to produce new nutritionally optimized additives. This feature could improve the host's health through the manipulation of the gut microbial community. Experiment III: the aim of this study was to access the effect of β -mannanase addition in corn and soybean meal-based diets over gut morphometry, immunological profile, bumblefoot, carcass yield and description of gut microbiota of broilers raised in commercial barns. There were four dark house barns; on each of them, 34 thousand Cobb Slow chicks (1 day-old) were housed. The treatments were with and without β -mannanase, and every two barns received the same diet, which was made of corn and soybean meal. At 21 and 42 days of age, sixteen fowls per treatment were randomly taken in order to analyze intestinal histomorphometry (height and width of the villi, depth and width of the crypts and goblet cell count). The carcass yield of commercial cuts from 40 fowls/treatment was performed at 46 days of age in a commercial slaughterhouse. 3600 feet/treatment were also collected for bumblefoot evaluation. There was no significant effect of β -mannanase on

morphometric measures, carcass yield or immunological profile. The enzyme supplementation reflected in a higher number of birds with mild lesion in comparison with medium and severe. The evaluation of the gut microbiota showed the occurrence of different species not only between treatments, but among poultry barns in the same farm as well. The inclusion of β -mannanase did not bring improvements in productive responses of broiler chickens raised on commercial terms.

Keywords: β -mannanase, *Eimeria*, soybean meal, gut microbiota, immune response

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACP – análise de componentes principais
- AGCC – ácidos graxos de cadeia curta
- BALT – “*bronchio associated lymphoid tissues*”
- β - beta
- CD8+ - linfócitos T citotóxicos
- DNA – ácido desoxiribonucléico
- GALT – “*gut associated lymphoid tissues*”
- IgA – imunoglobulina A
- IgG – imunoglobulina G
- IgM – imunoglobulina M
- IN – instrução normativa
- MHC I – complexo principal de histocompatibilidade classe I
- MHC II – complexo principal de histocompatibilidade classe II
- OOPG – contagem de oocistos por grama de fezes
- OTUs – unidades taxonômicas ou espécies
- PAS – ácido periódico de Schiff
- PCR – reação em cadeia pela polimerase
- PCR-DGGE – reação em cadeia pela polimerase e eletroforese em gel com gradiente desnaturante
- pH – potencial hidrogeniônico
- PNA – polissacarídeos não amiláceos
- rDNA – DNA ribossômico
- RNA – ácido ribonucléico
- SPF – specific pathogen free
- Th-CD4+ - linfócitos T auxiliares
- T-RFLP – polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Página
Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) e crescimento/abate (22 a 42 dias).....	46
Tabela 2. Desempenho produtivo de 1 a 7 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	50
Tabela 3. Desempenho produtivo de 1 a 21 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	50
Tabela 4. Desempenho produtivo de 1 a 42 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	50
Tabela 5. Desdobramento da interação entre fibra x enzima para a conversão alimentar aos 21 dias de idade de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	50
Tabela 6. Morfometria do intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	51
Tabela 7. Morfometria do intestino delgado de frangos de corte aos 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	52
Tabela 8. Peso relativo de órgãos de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	53
Tabela 9. Desdobramento das interações do peso relativo do fígado aos 42 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	53
Tabela 10. Rendimento de carcaça de frangos de corte aos 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	54
Tabela 11. Desdobramento da interação do rendimento de gordura aos 42 dias de idade de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	54
Tabela 12. Matéria seca (MS) e pH da cama de frangos de corte aos 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase.....	55
Capítulo 2	Página
Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) e crescimento/abate (22 a 42 dias).....	63
Tabela 2. Desempenho produtivo de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase.....	70

Tabela 3. Contagem de oocistos em frangos de corte alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....	70
Tabela 4. Desempenho produtivo de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....	72
Tabela 5. Populações de linfócitos T circulantes de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....	76
Tabela 6. Pesos relativos da bolsa cloacal, timo e baço de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....	78
Tabela 7. Medidas morfométricas da bolsa cloacal, timo e baço de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....	79
Tabela 8. Medidas morfométricas da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....	81

Capítulo 3

Página

Tabela 1. Peso vivo, peso absoluto e relativo da bolsa cloacal, baço e timo de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais.....	107
Tabela 21. Medidas morfométricas da bolsa cloacal, baço e timo de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase criados em condições comerciais.....	107
Tabela 32. Comprimento (C) e largura de vilo (L), profundidade (P) e largura (L) de cripta, área de absorção e contagem de células caliciformes (Cels./10mm) da mucosa do jejuno de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais.....	108
Tabela 43. Perfil imunológico celular de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais.....	111
Tabela 5. Número de OTUs (Notus) e número de sequências (Nseq) compartilhadas entre as amostras no genoma microbiano e sua relativa porcentagem observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco e intestino de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação.....	120
Tabela 4. Frequência de score de lesões de pés de frangos de corte ao abate suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais.....	121
Tabela 7. Peso vivo e rendimento da carcaça e de cortes comerciais de frangos de corte ao abate suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais.....	123

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Página
Figura 1. Número de 16S rDNA OTUs (97% similaridade) e índices de diversidade observados em amostras coletadas do ceco (A) e intestino delgado (B) de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiados com <i>Eimeria</i> sp.....	83
Figura 1. Distribuição dos filotaxos de bactérias observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de ceco coletados de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiadas com <i>Eimeria</i> sp.....	84
Figura 3. Distribuição dos filotaxos de bactérias observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de intestino delgado coletados de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiadas com <i>Eimeria</i> sp.....	84
Figura 4. Distribuição dos principais gêneros de bactérias observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de ceco coletados de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiados com <i>Eimeria</i> sp.....	86
Figura 5. Distribuição dos principais gêneros de bactérias na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de intestino delgado de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiados com <i>Eimeria</i> sp.....	86
Figura 6. O diagrama de Venn mostra quais são as espécies comuns e exclusivas observadas entre amostras do ceco (A - B) e intestino delgado (C - D) coletadas de frangos aos 21 dias de idade (A - C) e 42 dias de idade (B - D).....	88
Figura 7. Análise do componente principal (ACP) de amostras do intestino mostra a presença (painel A, pontos negros) e ausência (painel A, pontos brancos) de <i>Eimeria</i> sp., e a presença (painel B, pontos negros) ou ausência (painel B, pontos brancos) da enzima em dietas para frangos de corte. Os dois componentes principais capturaram 36,50% (ACP1) e 21,29% (ACP2) de variância, respectivamente.....	88
Figura 8. As 3 principais espécies bacterianas responsáveis por modificações na microbiota do intestino delgado (Otu6, Otu12, e Otu14) e cecal (Otu342, Otu462, and Otu 578) microbiota de frangos de corte inoculados com <i>Eimeria</i> sp. em comparação com o grupo não inoculado.....	89
Figura 9. As 3 principais espécies bacterianas responsáveis por modificações na microbiota do intestino delgado (Otu6, Otu14, e Otu373) e cecal (Otu108, Otu211, e Otu 339) de frangos de corte suplementados com a enzima em comparação com o grupo não suplementado.....	90
Capítulo 3	Página
Figura 1. Curvas de rarefação – 97% de similaridade observada na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco e intestino de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação.....	114

Figura 22. Número de gêneros, de OTUs e índice de diversidade observado na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco e intestino de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H1 e H2: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação.....	115
Figura 33. Distribuição de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco de frangos de corte aos 21 dias de idade (A) e 42 dias de idade (B) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação.....	116
Figura 4. Distribuição média de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade (C) e 42 dias de idade (D) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação.....	117
Figura 5. Distribuição de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco de frangos de corte aos 21 dias de idade (A e C) e 42 dias de idade (B e D) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação.....	118
Figura 6. Distribuição de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade (E e G) e 42 dias de idade (F e H) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação.....	119

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
REVISÃO DE LITERATURA	23
1. ENZIMAS EM DIETAS A BASE DE MILHO E FARELO DE SOJA.....	23
2. β -MANANOS.....	26
3. RELAÇÃO ENTRE NUTRIÇÃO E MICROBIOTA INTESTINAL	27
4. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA À MUCOSA DO INTESTINO DELGADO E DO CECO DE FRANGOS DE CORTE .	30
5. SISTEMA IMUNE INTESTINAL E A DEFESA CELULAR E HUMORAL	31
REFERÊNCIAS.....	34
OBJETIVOS	40
1. OBJETIVOS GERAIS	40
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
CAPÍTULO I - EFEITO DA ADIÇÃO DE β -MANANASE E FIBRA EM DIETAS SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E RENDIMENTO DE CARCAÇA DE FRANGOS DE CORTE.....	41
RESUMO.....	41
Palavras-chave.....	41
CHAPTER I - EFFECT OF β -MANNANASE AND FIBER ADDITION IN DIETS OVER PERFORMANCE, GUT MORPHOMETRY AND CARCASS YIELD OF BROILERS	41
ABSTRACT	41
Keywords.....	42
Introdução	42
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussão	48
Conclusão	55
Referências	55
CAPÍTULO II - SUPLEMENTAÇÃO DE β -MANANASE EM DIETAS CONVENCIONAIS E A CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>Eimeria</i> sp. ...	58
RESUMO.....	58
Palavras-chave.....	58
CHAPTER II – β -MANANASE SUPPLEMENTATION IN CONVENTIONAL DIETS AND THE DESCRIPTION OF GUT MICROBIOTA AND IMMUNE RESPONSE OF EIMERIA-CHALLENGED BROILERS	58
ABSTRACT	58
Keywords.....	59
Introdução	59
Material e Métodos.....	61
Resultados e Discussão	69
Conclusão	90
Referências	91
CAPÍTULO III - SUPLEMENTAÇÃO DE β -MANANASE EM DIETAS CONVENCIONAIS E A CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS EM CONDIÇÕES COMERCIAIS.....	96
RESUMO.....	96

Palavras-chave.....	96
CHAPTER III – β -MANANASE SUPPLEMENTATION IN CONVENTIONAL DIETS AND THE DESCRIPTION OF GUT MICROBIOME AND IMMUNE RESPONSE OF BROILERS REARED FOLLOWING COMMERCIAL CONDITIONS	96
ABSTRACT	96
Keywords.....	96
Introdução	97
Material e Métodos.....	100
Resultados e Discussão	105
Conclusão	124
Referências	124
CONSIDERAÇÕES GERAIS	128

INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da população mundial nos últimos anos e perspectivas de crescimento para os próximos, trás indagações quanto a quantidade de alimento disponível e a capacidade de atender esta demanda. Hoje, em alguns países, já nos deparamos com a fome e a competição por alimentos. Além disso, há crescentes investimentos no ramo de biocombustíveis. Desse modo, a quantidade de matéria prima disponível para nutrição animal diminui com o avanço dos seguimentos relatados acima.

Em virtude da crescente demanda de proteína animal, criação de legislações restritivas quanto ao uso de antibióticos melhoradores de desempenho e alternativas em relação à disponibilidade de matérias primas, a nutrição animal vem adquirindo um espaço inovador dentro da cadeia avícola através do uso de subprodutos, enzimas, probióticos e prebióticos, visando uma melhor digestibilidade desses novos ingredientes e uma colonização benéfica do trato gastrointestinal.

Ingredientes de origem vegetal são utilizados em grande escala na nutrição animal, principalmente farelo de soja, farelo de trigo, aveia, cevada, entre outros, mas possuem uma alta quantidade de polissacarídeos não amiláceos (PNAs) na sua parede celular e fibra (PNAs mais lignina) (BACH KNUDSEN, 1997). A lignina dificulta a degradação das fibras pela microbiota dos animais não ruminantes em decorrência da forte ligação com as microfibrilas de celulose e outros polissacarídeos (KNUDSEN, 2014).

Uma das propriedades antinutricionais dos PNAs é a capacidade de ligar-se a água, resultando em um aumento da viscosidade do conteúdo intestinal interferindo na microbiota intestinal e nas funções fisiológicas do intestino. Além disso, em um ambiente viscoso, os nutrientes como as gorduras, amido e proteínas, se tornam menos acessíveis e disponíveis às enzimas endógenas, pois além da viscosidade podem estar englobadas por PNAs. Estas alterações resultam em menor digestibilidade destes nutrientes e a viscosidade elevada aumenta a umidade das fezes (LEE et al., 2003) levando a uma piora na qualidade da cama e conseqüentemente, uma maior probabilidade na incidência de pododermatites e aumento na emissão de amônia.

O farelo de soja, principal fonte de proteína utilizada nas dietas para aves possui polissacarídeos na sua composição, entre eles, β -mananos ou β -galactomananos (HSIAO et al., 2006). Estes, considerados PNAs, não são degradados pelas enzimas endógenas levando a um aumento na viscosidade da digesta intestinal. Em adição, estes PNAs são detectados pelas células do sistema imune presentes na mucosa intestinal, o qual recrutam células de defesa, gerando uma resposta imune gerando desperdício energético.

As enzimas necessárias para a degradação dos PNAs não são sintetizadas pelos animais não ruminantes, sendo assim, são suplementadas a dieta como as xilanases, glucanases, celulasas, β -mananases, entre outras. As enzimas exógenas são similares àquelas produzidas pela microbiota intestinal e têm como objetivo fracionar os PNAs, sendo os produtos utilizados como prebiótico tanto para a flora benéfica quanto para a patogênica. Sendo assim, a utilização de enzimas exógenas pode fornecer substrato como fonte de energia e concomitantemente minimizar as propriedades antinutricionais (BRITO et al., 2006).

O uso de enzimas exógenas, especificamente com ação em PNAs e fitatos, extraem das matérias primas compostos que não sofrem ação pelas enzimas endógenas não específicas. O primeiro efeito da ação enzimática sobre uma dieta com baixa digestibilidade é a taxa de aproveitamento do hospedeiro sobre os nutrientes e em seguida, as consequências que o fornecimento de substratos terá sobre a microbiota (BEDFORD, 2000). O fornecimento desses substratos, considerados “prebióticos”, poderá promover o desenvolvimento de grupos de bactérias alterando o bioma intestinal (SLOMINSKI, 2011).

O desempenho dos animais está diretamente relacionado com a qualidade do ambiente intestinal. Assim, a ação enzimática tem relação direta com a população microbiana do intestino. Por vezes, a quebra enzimática poderá liberar substâncias desfavoráveis no ambiente intestinal, promovendo um desequilíbrio da microbiota.

Basicamente, a atividade das enzimas sobre a viscosidade e a parede celular dos carboidratos produz açúcares e oligômeros utilizados preferencialmente por certas espécies de bactérias no íleo e no ceco (BEDFORD, 2000). Esta melhora em digestibilidade impacta no fornecimento de substâncias antes não presentes no lúmen intestinal, o que poderá intervir na colonização do mesmo por microorganismos mais específicos àquelas substâncias.

A microbiota é capaz de regular a eficiência absorptiva, a maturação intestinal, a resposta imune, o tempo de permanência do bolo alimentar no trato e o aproveitamento de alguns nutrientes poucos digestíveis pelas enzimas endógenas do animal (AMIT-ROMACH et al., 2015). A mucosa intestinal é o maior sistema de defesa imune do hospedeiro e esta em constante ativação, seja pela própria população microbiana, seja pela mudança na dieta. Uma população microbiana estável pode proteger o hospedeiro contra colonização de patógenos pela competição por sítios de ligação do epitélio intestinal e dos nutrientes, fortalecimento da resposta imune e produção de bacteriocinas (SONG et al., 2014). Determinada microbiota está relacionada com a melhor conversão alimentar, isso pode estar ligado inclusive a uma mucosa intestinal menos reativa, com menos gasto metabólico para manutenção (STANLEY et al., 2012).

Além das mudanças nos ingredientes das dietas, desafios sanitários, como a coccidiose, também provocam alterações na microbiota intestinal dos animais. As lesões intestinais provocadas pelas eimerias liberam na luz intestinal substâncias oriundas da destruição das vilosidades que serão utilizadas pelas bactérias e, esta danificação das vilosidades resulta em má absorção, conseqüentemente, maior quantidade de nutrientes na luz intestinal disponível para os microorganismos.

Aprender a manipular a microbiota intestinal, e mesmo recuperá-la, após episódios de disbiose, reduz perdas em relação ao aproveitamento dos nutrientes da dieta. Aves que possuem uma microbiota estabelecida e em simbiose, a qual irá exercer função de exclusão competitiva para com as bactérias nocivas, são animais com boa capacidade absorptiva e conseqüentemente, bom desempenho. Um dos maiores desafios da pesquisa é conhecer a microbiota e usar esse conhecimento para aumentar a eficiência de conversão de alimentos em carne, garantindo a sustentabilidade mundial.

REVISÃO DE LITERATURA

1. ENZIMAS EM DIETAS A BASE DE MILHO E FARELO DE SOJA

As enzimas vêm ocupando espaço significativo na nutrição de frangos de corte. Essa expansão, desde os últimos anos, é devido aos benefícios oferecidos pela suplementação enzimática na fisiologia da digestão, na redução de problemas digestivos e dos efeitos provocados pelos fatores antinutricionais presentes em alguns tipos de alimentos.

De acordo com a Instrução Normativa (IN) Nº 13 de 2004 do MAPA (Brasil, 2004) as enzimas exógenas são classificadas como aditivos zootécnicos, pertencentes ao grupo funcional dos aditivos zootécnicos digestivos. Enzimas são proteínas com estrutura tridimensional que aceleram os processos químicos, sem serem, elas próprias, alteradas neste processo (CHAMPE e HARVERY, 1989). Segundo Angel e Sorbara (2014), as enzimas controlam sequências de reações químicas em sistemas biológicos, mas não são desativadas durante as reações, elas catalisam e então retornam ao seu estado original quando a reação esta completa, sendo necessária uma pequena concentração de enzimas comparada com a concentração de substrato.

Na alimentação de não ruminantes é preconizada de forma suplementar a ação das enzimas endógenas (amilases, proteases e lipases), ou de forma aditiva, visando reduzir os fatores antinutricionais de alguns ingredientes, bem como melhorar a disponibilidade dos nutrientes, principalmente aqueles encapsulados dentro da parede celular e/ou ligados em estrutura química que as enzimas endógenas do animal não conseguem degradar eficientemente, como no caso das β -glucanases, α -galactosidases, pentosanases e fitases (DOURADO et al., 2014).

A ação catalítica das enzimas depende de uma série de fatores, tais como: concentração do substrato e da enzima, temperatura, variação do potencial hidrogeniônico (pH), umidade e da presença de coenzimas e inibidores no local em que ocorrerá a reação (pois a concentração e a atividade da enzima são dependentes da presença e/ou quantidade de substrato) (DOURADO et al., 2014; ANGEL e SORBARA, 2014).

No Brasil, a maioria das dietas são constituídas por ingredientes altamente digestíveis, como o milho e o farelo de soja. Entretanto, ainda são passíveis de melhoria a partir do uso de enzimas exógenas (DOURADO et al., 2014).

Dietas vegetais contemplam uma porcentagem significativa de fibra bruta nas dietas. Uma dieta fibrosa deriva principalmente da parede celular de plantas que consistem em uma série de polissacarídeos, frequentemente associados e/ou substituídos por proteínas e compostos fenólicos em algumas células, juntos com a lignina (SELVENDRAN, 1984).

Os blocos da parede celular são formados por polissacarídeos, pentoses (arabinose e xilose), hexoses (glicose, galactose e manose), 6-deoxihexose, ramnose e fucose, e ácido urônico glucurônico e ácido galacturônico (Knudesen, 2001). Os principais polissacarídeos da parede celular das plantas são celulose, arabinoxilanos, misturados com ligações beta (β) (1-3)(1-4)-D-glucano (β -glucanos), xiloglucanos, ramnogalacturanos, arabinogalactanos (SELDENDRAN, 1984).

Os carboidratos, os quais incluem os açúcares de baixo peso molecular, amido, paredes celulares e PNAs são as mais importantes fontes de energia para animais não ruminantes e ruminantes (KNUDESEN, 1997).

O milho possui 5,32% de pentosanas totais, 3,12% de celulose, 1,00% de pectina e 9,34% de polissacarídeos não amiláceos totais, enquanto o farelo de soja possui 4,21% de pentosanas totais, 5,75% de celulose, 6,16% de pectinas e 29,02% de PNAs (DOURADO et al., 2014). Devido conter em sua composição PNAs, os compostos vegetais acabam possuindo caráter imunodepressor, inibindo a absorção de nutrientes em monogástricos (PETTEY et al., 2002; CHOCT, 2010).

A utilização de enzimas está relacionada à redução da viscosidade da digesta, que aumenta a depolimerização de arabinoxilanas em componentes de menor peso molecular ou a liberação dos nutrientes encapsulados nas estruturas da parede celular, pelo maior contato com as enzimas endógenas permitindo um acesso mais rápido das enzimas pancreáticas para o conteúdo interno (BEDFORD e COWIESON, 2012; DOURADO et al., 2012).

O uso de enzimas que degradam os PNAs influenciam na microbiota intestinal por dois mecanismos, remoção do amido e da proteína do processo de fermentação através da aceleração da digestão, e o fornecimento de oligossacarídeos solúveis, como resultado da depolimerização da fibra insolúvel (CHOC et al., 1996; BEDFORD, 1996; DOURADO et al., 2014).

A ação enzimática também previne distúrbios digestórios resultantes da presença de material não digerido no trato gastrointestinal dos monogástricos, pois os PNAs servem de substrato para bactérias patogênicas, além de reduzir a tensão superficial de oxigênio na mucosa intestinal, decorrente do aumento da viscosidade, o que favorece a proliferação de bactérias anaeróbias, como o *Clostridium perfringens* (DOURADO et al., 2014).

O modo de ação é diferente entre os PNAs solúveis e insolúveis e vai depender da quantidade presente no alimento, podendo ser considerado nutriente diluente ou fator antinutritivo, de acordo com sua solubilidade.

A soja possui alto conteúdo de proteína e energia, excelente qualidade e quantidade de aminoácidos, bem como alta disponibilidade dos mesmos (STEIN et al., 2008). Sua utilização “*in natura*” para animais não ruminantes é impossibilitada pela quantidade considerável de fatores antinutricionais. No processamento da soja, são produzidos vários ingredientes com aplicação em nutrição animal, entre os quais: farelo de soja, óleo degomado, lecitinas, a borra, a casca e o concentrado proteico. O farelo de soja tem uma menor predição de energia metabolizável do que a energia bruta em frangos de corte devido a baixa digestibilidade dos oligossacarídeos que levam a uma grande perda de energia e também uma possível diluição com os outros ingredientes da dieta (STEIN et al., 2008).

A remoção dos oligossacarídeos do farelo de soja pode melhorar a fermentação da fibra, bem como estender a digestão para liberação de outros nutrientes, em decorrência do menor tempo de trânsito (CHEN et al., 2013). Os principais fatores antinutricionais encontrados na soja são: inibidores de tripsina e quimiotripsina, lectinas, glicina e β -conglucina, lipase e lipoxigenase e PNAs (BELLAVAR, 1999).

Uma baixa concentração de oligossacarídeos será benéfica para a indústria de frangos de corte, pois isto pode aumentar a digestibilidade da energia da dieta.

As carboidrases endógenas produzidas são específicas para carboidratos com ligações alfa, como o amido, não atuando sobre carboidratos fibrosos com ligações β e oligossacarídeos contendo galactose, encontrado em várias leguminosas (DOURADO et al., 2014).

2. β -MANANOS

β -mananos, também conhecidos como β -galactomananos, são encontrados nos ingredientes das dietas de frangos de corte (HSIAO et al., 2006). O farelo de soja, principal fonte de proteína na maioria dos países é um ingrediente que possui uma quantidade considerável de β -mananos (STEIN et al., 2008).

Este polissacarídeo repete unidades de manose, com galactose ou glicose ou ambos, possuem várias configurações. Podem ser encontrados na superfície de fungos, bactérias e vírus (HSIAO et al., 2008). Assim, os β -mananos são capazes de estimular o sistema imune inato o qual responderá com a proliferação de macrófagos e monócitos, e aumento na produção de citocinas, levando a um gasto de energia pelo animal e aumento da resposta inflamatória.

Do mesmo modo, as células dendríticas que têm muitos receptores de superfície, incluindo sítios de ligação para mananos, são conhecidas por abrirem as junções entre as células epiteliais e estenderem para dentro das células, pequenas quantidade de antígenos (HSIAO et al., 2008).

A incapacidade na digestão da fibra, além de reduzir o valor energético do alimento, pode prejudicar a utilização de todos os outros nutrientes. Isto ocorre principalmente quando o tipo de fibra do alimento é solúvel, tendo grande capacidade de absorver água e gelatinizar a ingesta no trato intestinal (CHOCT, 2010).

Os efeitos negativos dos β -mananos são devidos, principalmente, ao aumento da viscosidade intestinal. Este aumento da viscosidade do quimo intestinal diminui a velocidade de passagem dos alimentos ao longo do trato digestivo, dificulta a dispersão e ação das enzimas endógenas e interfere negativamente na difusão ou transporte dos nutrientes pelos enterócitos (CHOCT et al., 2004).

Ainda, os β -mananos estão envolvidos no menor aproveitamento das gorduras dietéticas, devido à diminuição na emulsificação e conjugação dos sais biliares com estes compostos (CAMPBELL et al., 1983), na menor absorção de glicose (NUNES e MALMLOF, 1992), entre outros.

Dietas altamente viscosas podem ser tão prejudiciais para a digestão que quantidades significativas de amido e/ou proteína seguem ao intestino grosso, estimulam a atividade de bactérias sacarolíticas e mais tarde, na ausência de fonte

de carboidratos, estimulam a atividade de bactérias putrefativas (BEDFORD e COWIESON, 2012).

Recentemente, tem se documentado estudos com a utilização da enzima β -mananase, com dietas a base de milho e farelo de soja, resultando em efeitos positivos em frangos de corte (LEE et al., 2003; DASKIRAN et al., 2004; JACKSON et al., 2004; LEE et al., 2005), em suínos (PETTEY et al., 2002) e em perus (ODETALLAH et al., 2002).

3. RELAÇÃO ENTRE NUTRIÇÃO E MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota é capaz de regular a eficiência absorptiva, a maturação intestinal, a resposta imune, o tempo de permanência do bolo alimentar no trato gastrointestinal e o aproveitamento de alguns nutrientes pouco digestíveis pelas enzimas endógenas do animal (AMIT-ROMACH et al., 2004).

A concentração bacteriana no duodeno é baixa comparada com as demais regiões do intestino das aves em decorrência, principalmente, do baixo pH. Nele há predominância de *Lactobacillus*, podendo incluir alguns *Clostridiales* e enterobactérias em menor número. No jejuno, as populações bacterianas são predominantemente fermentadores de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*) além de alguns *Clostridiales*, *Bacteroidetes* e *Ruminococcus*, este último encontrado pela presença de carboidratos estruturais. Stanley et al. (2012) encontraram predominância de *Lactobacillus* no jejuno de frangos de corte. Já no íleo, em condições de pH mais neutras, o número de cópias bacterianas é maior. Nesta região, as comunidades são dominadas por bactérias ácido lácticas, principalmente *Lactobacillus*, podendo encontrar enterobactérias e *Clostridium* em maior ou menor número dependendo das condições dietéticas do animal (GONG et al., 2007).

Os cecos das aves, considerados pequenas câmaras de fermentação bacteriana, com produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e vitaminas, são os principais locais para proliferação bacteriana, inclusive por cepas patogênicas. É o único local onde é possível aproveitar parte dos carboidratos estruturais dietéticos não degradáveis pelas enzimas do animal (MACARI et al., 2014). Diferentes espécies de Clostrídeos são os principais habitantes do ceco,

incluindo o *Clostridium perfringens*, além de *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* e *Eubacterium*, seguidos pelos *Bacteroides* (GONG et al., 2002; WISE e SIRAGUSA, 2007 apud MACARI et al., 2014). Também podem ser encontradas espécies de enterobactérias e actinobactérias, além de pequenas proporções de *Lactobacillus* (MACARI et al., 2014). Stanley et al. (2012) encontraram, principalmente, quatro grandes gêneros nos cecos de frangos de corte, *Lactobacillus* (24,38%), *Clostridium* (20,13%), *Bacteroides* (15,83%) e um grupo de bactérias desconhecidas (18,95%), discordando dos relatos acima.

De acordo com Bedford e Cowieson (2012) a energia extraída da microbiota pode ser usada pelo hospedeiro ou então ser perdida. Ainda segundo esses autores, esta energia pode ser derivada da fermentação do amido ou da proteína, ou ainda, da fermentação da fibra, particularmente este último, pela fermentação no intestino grosso ou no ceco, que normalmente seria indigestível para o hospedeiro.

Lignina, componente indigestível da parede celular, parece estar envolvida na inibição do desenvolvimento de bactérias entéricas patogênicas (BAURHOO et al., 2007). Não se sabe claramente, mas sugere-se que os compostos fenólicos da lignina causam danos na membrana celular e lise de bactérias (FAHEY e JUNG, 1983).

Pela perturbação da microbiota normal, protetora, e alterações na morfologia intestinal, agentes que causam estresse criam oportunidade para colonização de patógenos no intestino (BURKHOLDER et al., 2008). Estas mudanças podem alterar a produção e composição do muco, levando a alterações em morfologia do intestino.

De acordo com Bedford e Cowieson (2012) enzimas que atuam sobre os PNAs da dieta aumentam a produção de mucina pelos frangos de corte. O mecanismo pelo qual isto acontece ainda é desconhecido, mas sugere-se que o crescimento de bactérias que promovem a produção de mucina pode estar relacionado, seja como resultado da produção de metabólitos específicos ou interação com o sistema imune.

A composição da microbiota intestinal tem uma relação muito estreita com mudanças nos componentes da dieta. Segundo Macari et al. (2014), as bactérias presentes dependem dos componentes dietéticos, normalmente aqueles resistentes ao processo digestivo ou absorvidos lentamente e pouco aproveitados pelo animal, para obter energia para reprodução e crescimento. Uma vez que as espécies diferem entre si por preferências de substrato, estes fatores de variação da dieta são

moduladores de estrutura e distribuição das espécies da comunidade microbiana do trato gastrointestinal (APAJALAHITI et al., 2004). Por outro lado, não só a dieta modula a microbiota, uma microbiota equilibrada pode auxiliar na estabilidade nas funções de digestão e absorção dos nutrientes.

Bactérias comensais competem por substratos disponíveis liberados da fermentação de frações fibrosas do alimento e estabelecem um metabolismo com preferências espécie-específicas (CERF-BENSUSSAN e GABORIAU-ROUTHIAU, 2010). Torok et al. (2008), fornecendo dieta baseada em cevada com ou sem a inclusão de enzimas para frangos de corte, mostraram que a inclusão de enzima modificou 73% e 66% o perfil microbiano no íleo e nos cecos, respectivamente.

Santos Jr. et al. (2008) avaliaram a inclusão de trigo ou milho associados ou não com enzimas na dieta de perus. A análise microbiana através da reação em cadeia pela polimerase e eletroforese com gradiente desnaturante (PCR-DGGE) mostrou que o consumo de dietas com trigo resultou em uma comunidade mais diversificada que o milho, e que cepas de *Salmonella* foram encontradas apenas em animais recebendo a dieta a base de milho. Já a inclusão de milho não alterou as contagens de *E. coli*, *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* nos cecos (BAURHOO et al., 2011).

Entretanto, alterações na comunidade bacteriana intestinal também podem ser causadas por uma simples cepa de bactéria ou protozoário, o que causa um desequilíbrio na estrutura do bioma intestinal resultando em disbiose. Surtos de coccidiose atuam como fatores condicionantes de enterite necrótica pela destruição maciça da mucosa. Os tecidos intestinais danificados e as mudanças nas funções do trato intestinal causadas por ela podem desestruturar as barreiras naturais de defesa e permitir a colonização por vários agentes patogênicos, tais como *Clostridium perfringens* ou *Salmonella* spp. (CHAPMAN, 2014).

Muitos estudos consolidam ainda as interrelações entre nutrição, coccidiose e microbiota intestinal, tanto o impacto da coccidiose na digestão da dieta, quanto em ingredientes que influenciam na patogênese desta doença e por último o efeito conjunto sobre a microbiota intestinal. Num estudo clássico comparativo da eficiência de um ionóforo contra infecção por *Eimeria tenella*, Williams (1982) observou que a infecção foi mais severa nas aves recebendo dieta a base de trigo do que na dieta a base de milho, independente da presença ou não do ionóforo. A principal explicação para a diferença na severidade da infecção pela *E. tenella* é a

alteração causada pelos alimentos no ambiente intestinal, principalmente na população de microrganismos e seu pH.

4. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA À MUCOSA DO INTESTINO DELGADO E DO CECO DE FRANGOS DE CORTE

Estudar a complexa comunidade de micro organismos do trato intestinal é um desafio para os pesquisadores. A difícil tarefa de isolar e identificar as espécies bacterianas requer um trabalho minucioso.

Existem várias técnicas para identificação da população microbiana, desde técnicas simples, como o cultivo em placas, até mesmo, as mais complexas, como o sequenciamento molecular.

As técnicas normais de cultivo limitam o entendimento da microbiota (PEDROSO et al., 2012), sendo assim, o estudo da ecologia intestinal através de técnicas moleculares tem se mostrado eficiente para conhecer e entender o ecossistema intestinal. As alterações na microbiota de diferentes segmentos do trato digestório em função de ingredientes, aditivos, tipos de cama, idades e infecções foram avaliadas em trabalhos mais recentes usando as técnicas de PCR em tempo real, DGGE e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (T-RFLP) (Bortoluzzi, 2013). As técnicas baseadas na similaridade do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou do ácido ribonucleico (RNA) de genes selecionados na comunidade microbiana têm sido utilizadas com sucesso para caracterizar o ecossistema intestinal (PEDROSO, 2011).

Baurhoo et al. (2007) em estudo da população microbiana do ceco das aves tratadas com lignina e manano oligossacarídeos, utilizaram ensaios de cultivo de placas para microrganismos específicos, *Lactobacilos*, *Bifidobacterias*, *E. coli* e *Salmonella*, e posterior, contagem das colônias. Deste mesmo modo, Cengiz et al. (2015) estudaram a população de *Salmonella* e *lactobacilos* em frangos suplementados com probiótico alojados em alta densidade.

Pela dificuldade de cultivo em placas das populações anaeróbias do trato gastrointestinal, há entraves em analisá-las pelo método convencional. Assim, técnicas de genética molecular são utilizadas para esta finalidade.

O microarranjo molecular, ou em inglês, microarray, é uma tecnologia que busca detectar e quantificar os ácidos nucleicos. Hoeven-Hangoor et al. (2013) utilizaram esta tecnologia para caracterização da microbiota intestinal de aves recebendo diferentes dietas com ácidos graxos de cadeia média, PNAs e amido. Após técnicas para purificação do material ileal, o DNA foi amplificado por PCR e então, analisado pelo microarray.

Outra técnica, baseada em Lu et al. (2003) é a extração do material genético microbiano por kits de isolamento de DNA e após, amplificação por reação em cadeia pela polimerase (PCR) da região V4 do gene 16S do DNA ribossômico (rDNA) e o sequenciamento através de um software, MiSeq Reporter. Esta técnica de determinação da ordem das bases nitrogenadas do DNA garante a especificação dos microorganismos estudados.

O entendimento e monitoramento do microbioma intestinal de frangos de corte é necessário para o desenvolvimento de metodologias ou produtos que consigam modular as comunidades microbianas intestinais, com o objetivo de melhorar o desempenho produtivo das aves, diminuir impactos ambientais da produção e também garantir maior segurança alimentar para o consumidor final dos produtos (OVIEDO-RONDÓN, 2009; MACARI et al, 2014). O primeiro passo para o entendimento de um ecossistema é caracterizar corretamente seus membros e, depois, elucidar seu papel e função neste ecossistema. Além disso, entender as relações entre microbiota e seu hospedeiro é imprescindível para elucidar a origem e mecanismo de infecções oportunistas e a propagação de organismos resistentes a antibióticos e promotores de crescimento (OVIEDO-RONDÓN, 2009).

5. SISTEMA IMUNE INTESTINAL E A DEFESA CELULAR E HUMORAL

A respeito do sistema imunológico das aves, a diferença com as outras espécies é muito clara pela precocidade na formação e maturação do sistema imune, uma vez que as células da resposta adaptativa são oriundas de órgãos primários, como o timo e a bolsa cloacal. A receptividade do timo embrionário, por volta dos seis dias de incubação, e da bolsa, por volta dos dez, permite a formação destes linfócitos, que na vida embrionária são morfologicamente iguais aos das aves pós-nascimento, mas que ainda têm funcionalidade limitada (Caron, 2008).

A imunidade inata é responsável pela primeira defesa do organismo contra um invasor. É constituída de barreiras físicas e químicas (mucosas, cílios, secreções, enzimas, etc) e de componentes celulares (KREUTZ, 2007). As principais células envolvidas na resposta inata das aves são os heterófilos e os macrófagos. Os heterófilos estão presentes na inflamação e na resposta imunológica realizam a fagocitose, considerada a primeira linha de defesa celular, combatendo, principalmente, bactérias e fungos tendo menor função no caso de infecções virais (MORGULIS, 2002; RITCHIE, 1995) Os monócitos e os macrófagos também participam da primeira linha de defesa e possuem um papel extremamente importante tanto na resposta inata como adaptativa. Essas células participam do processo de identificação e apresentação de antígenos e podem também destruir esses micro organismos invasores através da produção de citocinas imunoregulatórias ou metabólitos que servem como sinal de estímulo para o sistema imunológico agir contra o organismo invasor (ERF, 2004; QURESHI, 2003; RITCHIE, 1995).

A imunidade adquirida é uma resposta específica capaz de atuar contra grandes variedades de agentes agressores e reproduzir memória imunológica para um contato secundário com o mesmo agente (KREUTZ, 2007). As respostas imunológicas são mediadores citológicos e funcionais, que o sistema imune das aves se divide em dois segmentos básicos: imunidade humoral e imunidade celular; as duas são mediadas diretamente pelos linfócitos B e T, respectivamente, sendo que neste último caso, atuam populações de linfócitos, os T citotóxicos (CD8+) e os T auxiliares (CD4+), que por sua vez se subdividem em duas subpopulações de células T auxiliares: Th1 e Th2. Ainda, foi verificado que tais subpopulações de linfócitos T auxiliares são distinguidas em função do perfil de citocinas por eles sintetizadas e secretadas.

A união do linfócito CD4+ e o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) ocorrem no caso de patógenos extracelulares como bactérias, enquanto que o linfócito CD8 + complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I) em organismos intracelulares, sendo mais importantes contra os vírus (COLISSON et al., 2000; KREUTZ, 2007; TIZARD, 1998). A população de linfócitos citotóxicos tem a molécula CD8 composta de um dímero de moléculas α e β , podendo ser expressos na forma CD8 $\alpha\alpha$ ou CD8 $\alpha\beta$ (Tregaskes et al., 1995).

As populações de linfócitos do sangue periférico mostram-se como bons marcadores para avaliar a imunocompetência desses animais (BEIRÃO, 2011). É conhecido que a razão CD4/CD8 é muito mais reduzida em aves criadas comercialmente do que naquelas criadas em ambientes controlados ou livre de patógenos específicos (SPF), o que pode indicar menor imunocompetência, visto que o desenvolvimento de linfócitos CD8+ pode ser estimulado por infecções (EWALD et al., 1996).

Assim como em outras espécies, os primeiros sítios de desafio antigênico nas aves são as mucosas, especialmente as do trato digestório e respiratório. Esses sítios possuem tecidos linfóides especiais associados a mucosas, denominados “*gut associated lymphoid tissues*” (GALT) e “*bronchio associated lymphoid tissues*” (BALT), nos quais são geradas as respostas imunes humorais e celulares para a proteção das superfícies mucosas, em especial a produção de imunoglobulina A (IgA). Em nível sérico, a ave ainda apresenta imunoglobulina M (IgM), que é o primeiro isótipo de anticorpo a aparecer após um estímulo antigênico. As imunoglobulinas G (IgG) aparecem posteriormente e são mais específicas, e esta maior especificidade dos anticorpos IgG depende da interação do linfócito B com linfócitos Th-CD4+, que atuam no sentido de promover uma maturação da afinidade de tais anticorpos, sendo que esse tipo de interação entre linfócitos B e Th-CD4+ é também verificada com a produção de anticorpos com maior especificidade do isótipo IgA.

As estruturas linfóides encontradas no trato gastrintestinal representam parte importante do sistema imunológico, principalmente devido ao fato de existirem inúmeros patógenos que podem estar presentes na luz do tubo digestivo. Para o frango, essa porção do sistema imunológico representa papel fundamental, já que patógenos de importância econômica multiplicam-se no epitélio intestinal (MORGULIS, 2002). O sistema imune do lúmen intestinal apresenta uma grande quantidade de células linfóides e GALT, já que imediatamente após nascimento e durante toda a vida das aves, ele é exposto a uma grande quantidade de agentes infecciosos e parasitários, além de outros agentes estranhos e imunogênicos. A exposição a estes agentes influencia na formação, quantidade e distribuição do GALT no intestino e na regulação da resposta imune.

O estado imunológico tem papel primordial na manutenção da homeostasia e no combate a desafios contra agentes patogênicos, fatores estes determinantes

para a manutenção da sanidade animal. Quando essa homeostase é quebrada, a resposta imunológica consome grande parte dos recursos orgânicos (energia e nutrientes) (KLASING e KOVER, 1997).

A maior superfície de contato do organismo com o meio externo são as mucosas. A mucosa do tubo digestivo apresenta uma área cerca de 150 a 200 m², em um ser humano adulto (MOOG, 1981). Os tecidos intestinais representam cerca de apenas 5% do peso corporal, mas consomem entre 15 e 30% de todo aporte de oxigênio e proteínas do organismo (GASKINS, 2001), além de cerca de 20% da energia bruta consumida, devido a alta taxa de renovação e intensa atividade metabólica das células. Neste sentido, o intestino não é mais reconhecido apenas pela sua importante função associada aos processos de digestão e absorção, mas também pelo importante papel imunológico na defesa contra as agressões do meio externo (GUARNER, 2006). O epitélio intestinal possui a capacidade de impedir que substâncias indesejáveis como microrganismos e toxinas presentes no lúmen intestinal atravessem a mucosa e atinjam tecidos e órgãos.

A mucosa intestinal é o local de maior contato entre o organismo e o ambiente externo e se constitui, por isso, num importante local de interações entre estes dois meios. A camada de muco limita a capacidade adesiva de bactérias patogênicas e possui carboidratos complexos que podem servir de alimento para as bactérias benéficas (DAI et al., 2000). Ainda, a mucosa intestinal é também constituída por tecido linfoide que representa o maior “pool” de células de defesa do organismo (células B do sistema imune, produtos de IgA, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, linfócitos intraepiteliais) que promove uma resposta inflamatória local, evitando a invasão de tecidos por organismos patogênicos (SANSONETTI, 2006).

REFERÊNCIAS

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v. 83, p. 1093-1098, 2004.

ANGEL, R.; SORBARA, J.O.B. Why is it importante to understand substrates if we are to optimize exogenous enzyme efficacy? **Poultry Science**, v. 93, p. 2375-2379, 2014.

APAJALAHTI, J.H.A.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poult. Sci. J.*, v.60, p.223-232, 2004.

BAURHOO, B.; PHILLIP, L.; RUIZ-FERIA, C.A. Effects of purified lignina and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, p. 1070-1078, 2007.

BAURHOO, N.; BAURHOO, B.; MUSTAFA, A.F.; ZHAO, X. Comparison of corn-based and Canadian pearl millet-based diets on performance, digestibility, villus morphology, and digestive microbial populations in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 579-586, 2011.

BEDFORD, M.R. Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 5, p. 86-95, 1996.

BEDFORD, M.R.; COWIESON, A.J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. **Animal Feed Science Technolgy**, v. 173, p. 76-85, 2012.

BEIRÃO, B.C.B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BELLAVER, C.; SNIZEK JR, P.N. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves, 1999, Londrina. **Anais ... Londrina: EMBRAPA**, 1999. p. 183-199.

BORTOLUZZI, C. **Desempenho produtivo e microbiota intestinal de frangos de corte suplementados com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulos*) após desafio com *Eimeria acervulina* e *E. tenella***. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**. 01 de dezembro de 2004, Seção 3, p. 97.

BULKHOLDER, K.M.; THOMPSON, K.L.; EINSTEIN, M.E.; APPLGATE, T.J.; PATTERSON, J.A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. **Poultry Science**, v. 87, p. 1734-1741, 2008.

CAMPBELL, G.L.; CLASSEN, H.L.; GOLDSMITH, K.A. Effect of fat retention on the rachitogenic effect of rye fed to broiler chicks. **Poultry Science**, v. 62, p. 2218-2213, 1983.

CARON, L. F. O sistema imune das aves e a resposta às vacinações. In: CURSO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2008, Jaguariúna. **Anais ... Jaguariúna**.

CENGIZ, O.; KOKSAL, B.H.; TATLI, O.; SEVIM, O.; AHSAN U.; UNER, A.G.; ULUTAS, P.A.; BEYAZ, D.; BUYUKYORUK, S.; YAKAN, A.; ONOL, A.G. Effect of dietary probiotic and high stocking density on the performance, carcass yield, gut microflora, and stress indicators of broilers. **Poultry Science**, v. 0, p. 1-9, 2015.

CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 735–744, 2010.

CHAPMAN, H.D. Milestones in avian coccidiosis research: a review. **Poultry Science**, v. 93, p. 501-511, 2014.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: **Bioquímica Ilustrada**, 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. p. 53-66.

CHEN, X.; PARSONS, C.M.; BAJJALIEH, N. Nutritional evaluation of new reduced oligosaccharide soybean meal in poultry. **Poultry Science**, v. 92, p. 1830-1836, 2013.

CHOCT, M.; HUGHES, R.J.; WANG, J.; BEDFORD, M.R.; MORGAN, A.J.; ANNISON, G. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. **British Poultry Science**, v. 37, p. 609-621, 1996.

CHOCT, M.; KOCHER, A.; WATERS, D.L.E.; PETERSSON, D.; ROSS, G. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 53-61, 2004.

CHOCT, M. **Feed polysaccharides: nutritional roles and effect of enzymes**. In: IV Congresso Latino Americano de Nutrição Animal - IV CLANA CBNA/AMENA. Estância de São Pedro, 2010.

COLLISSON, E.W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S.H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental Comparative Immunology**, v. 24, p. 187-200, 2000.

DAI, D.; NANTHKUMAR, N.N.; NEWBURG, D.S.; WALKER, W.A. Role of Oligosaccharides and Glycoconjugates in Intestinal Host Defense. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 30, p. 23-33, 2000.

DASKIRAN, M.; TEETER, R.G.; FODGE, D.; HSIAO, H.Y. An evaluation of endo- β -D-mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in β -mannan content. **Poultry Science**, v. 83, p. 662-668, 2004.

DOURADO, L.R.B.; BARBOSA, N.A.A.; SAKOMURA, N.K. Enzimas na nutrição de monogástricos. IN: SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; FERNANDES, J.B.K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. p. 468-481.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, v. 83, p. 580-590, 2004.

EWALD, S.J., LIEN, Y.Y., LI, L.; JOHNSON, L.W. B-haplotype control of CD4/ CD8 subsets and TCRV beta usage in chicken T lymphocytes. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 53, p. 285-301, 1996.

FAHEY, G.C., JUNG, H.G. Lignin as a marker in digestion studies: a review. **Journal Animal Science**, v. 57, p. 220-225, 1983.

GASKINS, H. R. Intestinal bacteria and the influence on swine growth. IN: LEWIS, A.J.; SOUTHERN, L.L. **Swine Nutrition**. New York: CRC Press, 2001. p. 583-606.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R.J.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; YANG, C.; HAN, Y. 16S rDNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 147-157, 2007.

GUARNER, F. Enteric flora in health and disease. **Digestion**, v. 73, n. 1, p. 5-12, 2006.

HOEVEN-HANGOOR, E.; VOSSEN, J.M.B.M.; SCHUREN, F.H.J.; VERSTEGEN, M.W.A.; OLIVEIRA, J.E.; MONTIJN, R.C.; HENDRIKS, W.H. Ileal microbiota composition of broilers fed various commercial diet compositions. **Poultry Science**, v. 92, p. 2713-2723, 2013.

HSIAO, H.-Y.; ANDERSON, D.M.; DALE, N.M. Levels of β -mannan in soybean meal. **Poultry Science**, v. 85, p. 1430-1432, 2006.

JACKSON, M.E.; GERONIAN, K.; KNOX, A.; MCNAB, J.; MCCARTNEY, E. A dose-response study with the feed enzyme β -mannanase in broilers provided with corn-soybean meal based diets in the absence of antibiotic growth promoter. **Poultry Science**, v. 83, p. 1992-1996, 2004.

KLASING, K.; KOVER, D. Leukocytic cytokines regulate growth rate and composition following activation of the immune system. **Journal Animal Science**, v. 75, n. 2, p.58-67, 1997.

KNUDESEN, K.E.B. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Feed Science Technology**, v. 67, p. 319-338, 1997.

KNUDESEN, K.E. The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 90, p. 3-20, 2001.

KREUTZ, L. C. Resposta imunológica contra vírus. IN: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Ed da UFSM, 2007. cap. 9. p. 237-261.

LEE, J.T.; BAILEY, C.A.; CARTWRIGHT, A.L. β -mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions. **Poultry Science**, v. 82, p.1925-1931, 2003.

LEE, J.T.; CONNOR-APPLETON, S.; BAILEY, C.A.; CARTWRIGHT, A.L. Effects of guar meal by-product with and without β -mannanase Hemicell on broiler performance. **Poultry Science**, v. 84, p. 1261-1267, 2005.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6816-6824, 2003.

MACARI, M.; LUNEDO R.; PEDROSO, A.A. Microbiota intestinal das aves. IN: MACARI, M.; MENDES, A.A.; MENTEN, J.F.; NASS, I.A. Produção de frangos de corte. **Aves domésticas – produção de frangos de corte**. 2. ed. Campinas: Facta, 2014. p. 299-320.

MOOG, F. The lining of the small intestine. **Scientific American Brasil**, v. 245, p. 154-158, 1981.

MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. IN: **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2 ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p. 231-245.

NUNES, C.S.; MALMLOF, K. Effects of guar gum and cellulose on glucose absorption, hormonal release and hepatic metabolism in the pig. **British Journal of Nutrition**, v. 68, p. 693–700, 1992.

ODETALLAH, N.H.; FERKET, P.R.; GRIMES, J.L.; MCNAUGHTON, J.L. Effect of mannan-endo-1,4- β -mannosidase on the growth performance os turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meal. **Poultry Science**, v. 81, p. 1322-1331, 2002.

OVIEDO-RONDON, E.O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 209-225, 2009.

PEDROSO, A.A. Microbiota do trato digestório: transição do embrião ao abate. In: CONFERÊNCIA FACTA, 2011, Santos. **Anais ...** Campinas: Facta, 2011. p. 123-130.

PEDROSO, A.A.; MAURER, J.; CHENG, Y.; LEE, M. D. Remodeling the intestinal ecosystem toward better performance and intestinal health. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v. 21, p. 432-443, 2012.

PETTEY, L.A.; CARTER, S.D.; SENNE, B.W.; SHRIVER, J.A. Effects of β -mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth performance, carcass traits, and nutrient digestibility of weanling and growing-finishing pigs **Journal Animal Science**, v. 80, p. 1012–1019, 2002.

QURESHI, M. A. Avian macrophage and immune response: an overview, **Poultry Science**, v. 82, p. 691-698, 2003.

RITCHIE, B.W. Viral attack and avian response. IN: **Avian Viruses: Function and Control**. 1995.

SANSONETTI, P.J. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. **Nature Immunology**, v. 7, p. 1237-1242, 2006.

SANTOS JR., A. A.; FERKET, P.R.; SANTOS, F.B.O.; NAKAMURA, N.; COLLIER, C. Change in ileal bacterial population of turkeys fed different diets and after infection with *Salmonella* as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S ribosomal DNA. **Poultry Science**, v. 87, p. 1415-1427, 2008.

SELVENDRAN, R.R. The plant cell wall as a source of dietary fiber: chemistry and structure. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 39, p. 320-337, 1984.

STANLEY, D.; DENMAN, S. E.; HUGHES, R. J.; GEIER, M. S.; CROWLEY, T. M.; CHEN, H. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 96, p. 1361–1369, 2012.

STEIN, H.H.; BERGER, L.L.; DRACKLEY, J.K.; FAHEY JR, G.F.; HERNOT, D.C.; PARSONS, C.M. Nutricional properties and feeding values of soybeans and their co-products. IN: JOHNSON, L.A.; WHITE, P.J.; GALLOWAY, R. Soybeans chemistry, production, processing and utilization. Urbana: AOCS Press, 2008. p. 613-660.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Rocca, 1998.

TREGASKES, C.A.; KONG, F.K.; PARAMITHIOTIS, E.; CHEN, C.L.H.; RATCLIFFE, M.J.H.; DAVISON, T.F.; YOUNG, J.R. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v.154, p. 4485-4494, 1995.

TOROK, V.A.; OPHEL-KELLER, K.; LOO, M.; HUGHES, R.J. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 783-791, 2008.

WILLIAMS, R. B. Differences between the anticoccidial potencies of monensin in maize-based or wheat-based chicken diets. **Veterinary Research Communications**, v. 16, p. 147-152, 1982.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desta pesquisa foi estudar o efeito da suplementação de β -mananase em três situações distintas: aumento da inclusão de fibra bruta na dieta, desafio experimental com *Eimeria* sp. e em condições de criação comercial, sobre o desempenho zootécnico, qualidade intestinal, perfil imunológico e caracterização da microbiota intestinal de frangos de corte.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a inclusão de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja, elaboradas com níveis baixos e moderados de fibra bruta sobre o desempenho zootécnico, morfometria intestinal e o rendimento de carcaça de frangos de corte.

Avaliar o efeito da utilização de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja em frangos de corte desafiados com oocistos esporulados de *Eimeria* sp. aos 14 dias de idade sobre o desempenho zootécnico, morfometria intestinal, perfil imunológico e caracterização da microbiota intestinal.

Avaliar o efeito da adição de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja sobre a morfometria intestinal, perfil imunológico e caracterização da microbiota intestinal de frangos de corte criados em condições comerciais.

CAPÍTULO I - EFEITO DA ADIÇÃO DE β -MANANASE E FIBRA EM DIETAS SOBRE O DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E RENDIMENTO DE CARÇAÇA DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO - O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de β -mananase e fibra sobre o desempenho produtivo, a morfometria intestinal e o rendimento de carcaça de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade. Foram alojados 1440 pintinhos machos distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (sem e com enzima e nível baixo e moderado de fibra). A enzima β -mananase foi incluída na dose de 400g/ton e a fibra na quantidade de 3,0 e 4,5%, respectivamente. Aos 21 dias, houve interação significativa ($p < 0,05$) entre a inclusão de enzima e fibra sobre a conversão alimentar. Dietas com nível moderado de fibra e suplementadas com a enzima apresentaram resultado semelhante a dietas com baixa fibra e sem enzimas. Os melhores resultados para ganho de peso e consumo de ração de 1 a 42 dias de idade foram encontrados nas aves que receberam dieta com nível moderado de fibra ($p < 0,05$) independente da suplementação enzimática. Aos 21 dias a morfometria intestinal do duodeno, jejuno e íleo (comprimento do vilão, profundidade da cripta, relação vilão:cripta e área de absorção) não foi alterada pelos tratamentos, enquanto que aos 42 dias as aves que não receberam a suplementação com a β -mananase, apresentaram um maior comprimento de vilão e conseqüentemente, uma maior área de absorção ($p < 0,05$). Observou-se ainda aumento ($p < 0,05$) dos pesos absoluto e relativo do intestino a partir de dietas com nível moderado de fibra e também, do fígado ($p < 0,05$) em função da adição de enzima ou fibra aos 21 dias de idade. Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre fibra e enzima para os pesos absoluto e relativo do fígado aos 42 dias. Níveis moderados de fibra sem a suplementação enzimática resultaram nos maiores valores para peso de fígado. O rendimento de carcaça aos 42 dias de idade das aves não foi influenciado pelo nível de fibra das dietas e a β -mananase. Porém, houve interação significativa ($p < 0,05$) para a gordura abdominal, onde dietas com nível moderado de fibra acrescidas da enzima resultaram em menor percentual de gordura na carcaça. Não foi encontrada diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na qualidade da cama (umidade e pH) com a inclusão da enzima nas dietas. O uso de β -mananase em dietas com maior concentração de fibra melhora a conversão alimentar de frangos de corte de 1 a 21 dias e pode ser uma importante estratégia nutricional e econômica em situações de indisponibilidade de matéria prima de melhor qualidade. Dietas com níveis moderados de fibra resultaram em maior ganho de peso aos 42 dias.

Palavras-Chave: farelo de soja, mucosa intestinal, polissacarídeos não amiláceos

CHAPTER I - EFFECT OF β -MANNANASE AND FIBER ADDITION IN DIETS OVER PERFORMANCE, GUT MORPHOMETRY AND CARCASS YIELD OF BROILERS

ABSTRACT - The aim of this study was to assess the effect of β -mannanase and fiber on performance, gut morphometry and carcass yield of broilers from 1 to 42 days-old. 1440 male chicks were housed and placed following a completely randomized design in a factorial scheme 2 x 2 (with and without enzyme and low and moderate levels of fiber). β -mannanase was added in a dose of 400g/ton; fiber levels of 3,0 and 4,5%, respectively. At 21 days of age, there was a significant interaction ($p < 0,05$) between the enzyme and the fiber on feed conversion; diets with moderate level of fiber and enzyme inclusion showed similar result to those diets with low percentage of fiber and without enzyme. Fowls that received moderate level of fiber ($p < 0,05$) obtained the best results for weight gain and feed intake from 1 to 42 days of age, regardless the enzyme addition. In addition, while at 21 days of age the gut morphometry of duodenum, jejunum and ileum (villus length, crypt depth, villus: crypt ratio and absorption surface) did not suffer any change by the treatments, at 42 days-old the fowls which did not receive β -mannanase supplementation had higher villus length. As a

result, a larger absorption surface was seen ($p < 0,05$). There was also an increase ($p < 0,05$) of absolute and relative gut weight of those birds that underwent treatment with moderate fiber level; as well as the liver, due to the enzyme or fiber inclusion at 21 days of age. A significant interaction ($p < 0,05$) could be observed between fiber and enzyme on relative and absolute weights of the liver at 42 days of age; furthermore, moderate levels of fiber without the enzyme contributed to heavier livers. The fiber level in diets containing β -mannanase did not influence carcass yield at 42 days of age. However, there was a significant interaction ($p < 0,05$) in diets with moderate level of fiber and β -mannanase on abdominal fat pad, which influenced on a lower amount of fat in the carcass. Diets with moderate levels of fiber reflected in higher weight gain at 42 days of age. Regarding litter quality (pH and moisture), no statistical differences were found ($p > 0,05$) when adding the enzyme. Indeed, the presence of β -mannanase in diets with higher levels of fiber improved feed conversion of broilers from day 1 to day 21. This feature could be an important economical and nutritional strategy when lacking quality products.

Keywords: soybean meal, gut mucosa, non-starch polysaccharides

Introdução

Milho e farelo de soja são os dois ingredientes mais expressivos nas dietas de aves e suínos. O seu aproveitamento pelo animal impacta diretamente no desempenho produtivo, pois são as principais fontes de energia e proteína das dietas.

Diferente do milho, a soja precisa ser processada para utilização na alimentação animal. Ao passar pelo tratamento térmico, a maioria de seus compostos antinutricionais, principalmente os inibidores de tripsina, são destruídos ou reduzidos (RAVINDRAN et al., 2014). Entretanto, os PNAs continuam presentes.

PNAs consistem em polissacarídeos solúveis e insolúveis presentes na parede celular primária e secundária das plantas (SELVENDRAN, 1984) e implicam na utilização dos nutrientes em animais não ruminantes (BRITO et al., 2008). Além da presença física da fibra no trato gastrointestinal, que se constitui um antígeno vegetal à mucosa intestinal, a parede celular pode enclausurar nutrientes e interferir no processo de digestão e absorção (KNUDESEN, 2014).

A incapacidade na digestão da fibra, além de reduzir o valor energético do alimento, pode prejudicar a utilização de todos os nutrientes. Isto ocorre principalmente quando o tipo de fibra do alimento é solúvel, tendo grande capacidade de absorver água e gelatinizar a ingesta no trato intestinal (CHOCT et al., 2010). Este aumento da viscosidade do quimo intestinal diminui a velocidade de passagem dos alimentos ao longo do trato digestivo, dificulta a dispersão e ação das enzimas endógenas e interfere negativamente na difusão ou transporte dos

nutrientes pelos enterócitos (CHOCT et al., 2004). Além disso, pode haver menor aproveitamento das gorduras dietéticas, devido à diminuição na emulsificação e conjugação dos sais biliares com estes compostos (CAMPBELL et al., 1983).

A colonização por bactérias é favorecida pelo aumento de substrato não aproveitado pelos animais (HÖGBERG e LINBERG, 2004). Também, a mudança nas populações microbianas pode causar danos à mucosa e induzir ao aumento de infiltração de células do sistema imune no trato intestinal das aves (TEIRLYNCK et al., 2009).

Dentre os PNAs presentes no grão de soja, estão os β -mananos, polissacarídeos que repetem unidades de manose com galactose ou glicose, ou ambos (HSIAO et al., 2006 apud CARPITA e MCCANN, 2000). De acordo com Hsiao et al. (2006), a porcentagem de β -mananos presente em farelo de soja com casca é entre 1,33% e 2,14% e em farelo de soja sem casca entre 1,02% e 1,51%. Esta diferença é explicável, visto a maior quantidade de β -mananos presente na parede celular das plantas.

Mananos também são componentes da superfície de vários fungos, bactérias e vírus, o que confere a eles a capacidade de estimular o sistema imune inato das aves. Este fato leva a um maior gasto energético do animal voltado para mecanismos de defesa do sistema imunológico, por conta do aumento da proliferação de células de defesa, como monócitos e macrófagos (HSIAO et al., 2006).

A adição de enzimas exógenas na ração pode ser uma estratégia para a melhor utilização de ingredientes ricos em PNAs. A β -mananase, uma enzima exógena, quebra os β -mananos da dieta, especificamente, cadeias de galactomananos, galactoglucanomananos e mananos (JACKSON et al., 2004). A possibilidade de degradação dos β -mananos da dieta e conseqüentemente, a liberação de substratos no trato gastrointestinal, implica em maior aproveitamento dos nutrientes e pode favorecer o desenvolvimento de grupos específicos de microorganismos.

Neste sentido, é necessário o desenvolvimento de estudos que avaliem o efeito da adição de enzimas em dietas convencionais elaboradas com níveis moderados de fibra dietética. A fibra presente nestes ingredientes estimula o desenvolvimento de órgãos, a produção de enzimas e a digestibilidade dos nutrientes (MATEOS et al., 2012). Estes efeitos estão associados à funcionalidade

da moela, com o aumento do refluxo gastrointestinal que facilita o contato entre os nutrientes e as enzimas digestivas (GONZÁLEZ-ALVARADO et al., 2008; MATEOS et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar a inclusão de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja, elaboradas com níveis baixos e moderados de fibra bruta sobre a morfometria intestinal, o peso de órgãos, o desempenho produtivo e o rendimento de carcaça de frangos de corte.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no aviário experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Todos os procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação.

Foram alojados 1440 pintinhos machos de 1 dia de idade, da linhagem Cobb 500. A distribuição dos animais foi aleatória em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem enzima e nível baixo e moderado de fibra), totalizando 4 tratamentos com 9 repetições e 40 aves por unidade experimental (11,4 aves/m²). Os tratamentos experimentais utilizados foram:

- Tratamento 1: dieta controle, nível baixo de fibra e sem inclusão de β -mananase;
- Tratamento 2: dieta controle, nível baixo de fibra e com inclusão de β -mananase;
- Tratamento 3: dieta com nível moderado de fibra, sem inclusão de β -mananase;
- Tratamento 4: dieta com nível moderado de fibra, com inclusão de β -mananase.

Para as dietas que se caracterizavam com nível moderado de fibra, foi adicionado casca de soja (33,53% de fibra bruta) para aumentar o nível de fibra bruta. A enzima β -mananase foi incluída nas dietas específicas na dose de 400g/ton em todo período de criação das aves.

As dietas, à base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais

adotadas pelas integrações avícolas da região (Tabela 1). O programa de alimentação foi dividido em 2 fases: inicial (1 a 21 dias) e crescimento/abate (22 a 42 dias). As rações se apresentavam na forma farelada.

As aves foram alojadas em galpão climatizado (exaustores, placas evaporativas e aquecimento através de campânulas elétricas), dividido em 36 boxes de 3,52m², cobertos com maravalha (± 10 cm) sobre o piso. Durante todo período experimental as aves receberam água e ração à vontade. A temperatura de conforto térmico foi mantida de acordo com a idade.

Para avaliação do desempenho produtivo, as aves e as sobras de ração de cada unidade experimental foram pesadas semanalmente. A conversão alimentar foi corrigida pela mortalidade semanal das aves conforme metodologia escrita por Sakomura e Rostagno (2007).

Tabela 5. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) e crescimento/abate (22 a 42 dias)

Ingredientes, %	1 a 21 dias		22 a 42 dias	
	↓fibra	↑fibra	↓fibra	↑fibra
Milho, 8%	57,54	50,65	66,66	59,75
Casca de soja, 16%	-	5,00	-	5,00
Óleo	1,28	3,48	2,00	4,20
Farelo de soja, 46%	37,08	36,80	27,92	27,64
Cálcario calcítico, 38%	1,08	1,02	0,94	0,88
Fosfato bicálcio, 20%	1,72	1,72	1,40	1,42
Cloreto de Sódio	0,43	0,43	0,36	0,36
DL-Metionina, 98%	0,27	0,29	0,22	0,24
L-Lisina, 78%	0,15	0,14	0,19	0,18
L-Treonina, 98%	0,03	0,04	0,03	0,042
Cloreto de colina, 60%	0,12	0,12	0,04	0,05
Premix Vitamínico ¹	0,14	0,14	0,12	0,12
Premix Mineral ²	0,12	0,12	0,08	0,08
Inerte ³	0,04	0,04	0,04	0,04
Valores calculados				
EMA (kcal/kg)	2899	2899	3050	3050
PB, %	22,00	22,00	18,50	18,50
EE, %	4,154	6,209	5,030	7,750
FB, %	3,065	4,557	2,790	4,280
Lys Dig., %	1,190	1,190	1,082	1,095
AAST Dig, %	0,857	0,857	0,800	0,800
Tre Dig., %	0,751	0,750	0,630	0,630
Cálcio, %	0,902	0,901	0,757	0,760
Fósforo, %	0,452	0,448	0,380	0,380
Potássio, %	0,955	0,928	0,788	0,762
Sódio, %	0,200	0,200	0,170	0,170

¹Premix vitamínica (conteúdo por kg): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg; Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

²Premix mineral (conteúdo por kg): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

³Inerte substituído por β-mananase.

Aos 21 e 42 dias de idade, 9 aves/tratamento foram eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical. Após a eutanásia, as aves foram pesadas individualmente e as carcaças dissecadas para remoção dos órgãos linfóides (baço, bolsa cloacal e timo), moela, proventrículo e fígado. O peso dos órgãos foi obtido imediatamente após a dissecação e remoção dos tecidos exógenos para cálculo do peso relativo pela fórmula: peso relativo = (peso órgão/peso vivo) x 100.

O intestino delgado foi removido e obtido fragmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento do duodeno (a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal), do jejuno (a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel) e do íleo (a partir da válvula íleo-ceco-cólica), os quais foram presos abertos longitudinalmente em placas de isopor, e lavados com soro fisiológico. As amostras foram fixadas em solução de formol tamponado e após foram emblocadas em

parafina. Cada fragmento foi submetido a cortes semi-seriados de 5 µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina.

Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (Olympus BX 50), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Neste estudo foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilos e a profundidade e largura de 20 criptas de cada lâmina (Figura 1). Utilizou-se estas medidas morfométricas também para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, através da seguinte fórmula, segundo Kisielinski et al. (2002):

$$\text{Área de absorção: } (LV \times AV) + (LV/2 + LC/2)^2 - (LV/2)^2 / (LV/2 + LC/2)^2$$

Onde:

LV: largura de vilo, AV: altura de vilo, LC: largura de cripta

Os órgãos linfóides (baço, timo e bolsa cloacal) foram mantidos em solução de formol tamponado e após fixação procedeu-se o corte transversal e a imagem de cada órgão foi capturada por um sistema de lupa. As imagens foram preparadas e analisadas por meio do sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Foram obtidas as medidas da área total de cada órgão (mm²), e eixo longitudinal do baço e bolsa cloacal e eixo longitudinal e transversal (mm) do timo.

O rendimento de carcaça e de cortes comerciais foi determinado aos 42 dias de idade das aves. Foram eutanasiadas 2 aves/unidade experimental (18 aves/tratamento), com peso vivo ±2% da média de peso do box. As aves foram identificadas e submetidas ao jejum alimentar por seis horas e abatidas por atordoamento com eletricidade e posterior sangria. Para o cálculo de rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça eviscerada quente, sem os pés, cabeça e gordura abdominal, em relação ao peso vivo que foi obtido individualmente antes do abate das aves. Para o rendimento dos cortes nobres, foi considerado o rendimento do peito inteiro com pele e ossos, das pernas (coxa e sobrecoxa com ossos e pele), dorso e asas com pele que foi calculado em relação ao peso da carcaça eviscerada. A gordura abdominal presente ao redor da cloaca, da bolsa cloacal, moela, proventrículo e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada

conforme descrito por Smith (1993). Em seguida, foi pesada e também calculada em relação ao peso da carcaça eviscerada.

Ainda aos 42 dias, enquanto as aves estavam alojadas, foram coletadas amostras de cama para análise de matéria seca e pH. A coleta foi realizada em cinco pontos dentro de cada unidade experimental e então homogeneizada, totalizando 36 amostras de cama. Os pontos abrangeram as quatro extremidades do box e um ponto central.

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (“*outliers*”) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Depois de constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002) com nível de 5% de significância e em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Resultados e Discussão

O desempenho produtivo dos frangos de corte foi avaliado de 1 a 7 dias, 1 a 21 dias e 1 a 42 dias (Tabela 2). Na 1ª semana de idade das aves, não foi observada interação significativa ($p > 0,05$) entre o nível de fibra bruta na dieta e a adição de enzima, assim como também não foi observado efeito isolado dos fatores sobre o desempenho produtivo das aves. Já de 1 a 21 dias, observou-se interação significativa ($p = 0,0130$) para conversão alimentar (Tabela 3). No desdobramento da interação (Tabela 5) houve diferença estatística para o nível de inclusão de fibra (0,0560) e para enzima ($p = 0,0619$). Dietas com níveis baixos de fibra e acrescidas de enzima resultaram na melhor conversão alimentar.

Jackson et al. (2004) encontraram efeito positivo na adição de β -mananase em dietas peletizadas no ganho de peso nas fases inicial e crescimento. Assim como, Daskiran et al. (2004) trabalhando com diferentes níveis de β -mananos e β -mananases nas dietas de frangos de corte até os 14 dias de idade, concluíram que a suplementação enzimática melhora a utilização dos alimentos e aumenta o ganho peso em altos níveis de β -mananos, mesmo sendo uma resposta tardia. Estes

autores também observaram melhora na conversão alimentar com a adição da enzima.

Aos 42 dias, o ganho de peso ($p=0,0256$) e o consumo de ração ($p=0,0060$) das aves diferiram ($p<0,05$) (Tabela 4). Os melhores resultados foram observados pela ingestão da dieta com nível moderado de fibra independente da suplementação enzimática. Não houve interação entre o nível de fibra e a β -mananase para estes parâmetros.

A ação dos PNAs no trato gastrointestinal é essencialmente física, na qual a parede celular ou age como barreira na liberação de nutrientes ou aumenta a viscosidade e restringe a absorção (KNUDSEN et al., 2001). Entretanto, divergindo do conceito acima, Mateos et al. (2012) apontam que um maior nível de fibra melhora a função da moela, com um aumento do refluxo gastroduodenal, assim facilitando o contato entre os nutrientes e as enzimas digestivas. Além disso, esta diferença em funcionalidade do trato gastrointestinal pode influenciar na taxa de crescimento microbiano nos diferentes órgãos digestivos.

O nível de fibra bruta em dietas comerciais para frangos de corte é geralmente abaixo de 3%. No presente trabalho, o nível mais alto de fibra bruta utilizado foi em torno de 4,5%, o que possivelmente não foi um desafio para as aves. De acordo com estudos, dietas com moderados níveis de fibra melhoram o desenvolvimento dos órgãos digestíveis, e aumenta a secreção de ácido clorídrico, sais biliares e enzimas (KNUDESEN, 2001; SKLAN et al., 2003). Azarfar (2013) suplementou dietas a base de milho e farelo de soja com β -mananase (0,5 e 1,0 g/kg) e também não observou melhora em ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar em todo período experimental (1-42 dias). Hajati (2010) utilizou um blend enzimático para a quebra dos PNAs em aves de 1 a 44 dias de idade e encontrou o melhor ganho de peso para as aves que não receberam a suplementação enzimática, porém houve um menor consumo e melhor conversão alimentar para aves suplementadas.

Tabela 6. Desempenho produtivo de 1 a 7 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Peso vivo, g	Ganho de peso, g	Consumo de ração, g	Conversão alimentar
<i>Nível de fibra</i>				
Baixo	182,77	135,58	166,22	1,212
Moderado	184,71	137,42	172,11	1,258
Valor de P	0,1560	0,1572	0,1271	0,1022
<i>Enzima</i>				
Sem	182,88	135,70	168,18	1,230
Com	184,50	137,20	170,16	1,241
Valor de P	0,2579	0,2672	0,6011	0,6787
Fibra x Enzima	0,4647	0,5072	0,1161	0,2147
CV, %	2,13	2,72	6,67	6,40

Tabela 7. Desempenho produtivo de 1 a 21 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Peso vivo, g	Ganho de peso, g	Consumo de ração, g	Conversão alimentar
<i>Fibra</i>				
Baixo	981,02	939,18	1243,17	1,318
Moderado	997,96	953,78	1261,95	1,316
Valor de P	0,0692	0,0857	0,2213	0,7624
<i>Enzima</i>				
Sem	993,88	953,08	1257,30	1,319
Com	985,09	939,88	1247,82	1,314
Valor de P	0,3365	0,1184	0,5335	0,7331
Fibra x Enzima	0,2352	0,1317	0,3016	0,0130
CV, %	2,7314	2,61	3,61	3,22

Tabela 8. Desempenho produtivo de 1 a 42 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Peso vivo, g	Ganho de peso, g	Consumo de ração, g	Conversão alimentar
<i>Nível de fibra</i>				
Baixo	2781,58	2691,37 ^b	4637,98 ^b	1,734
Moderado	2830,08	2761,60 ^a	4774,42 ^a	1,722
Valor de P	0,1725	0,0256	0,0060	0,2428
<i>Enzima</i>				
Sem	2819,40	2746,39	4732,26	1,728
Com	2792,27	2706,59	4680,14	1,727
Valor de P	0,4408	0,1938	0,2696	0,9772
Fibra x Enzima	0,5571	0,2908	0,1660	0,6290
CV, %	3,72	3,30	2,96	1,72

Tabela 9. Desdobramento da interação entre fibra x enzima para a conversão alimentar aos 21 dias de idade de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Sem Enzima	Com Enzima	Valor de P
Nível baixo de fibra	1,3364	1,2930	0,0560
Nível moderado de fibra	1,3024	1,3359	0,1180
Valor de P	0,1084	0,0619	

Aos 21 dias de idade, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na morfometria do intestino delgado entre os tratamentos (Tabela 6).

Entretanto, aos 42 dias de idade, as aves que não receberam a suplementação com a β -mananase, apresentaram um maior comprimento de vilo ($p=0,0072$) e consequentemente, uma maior área de absorção ($p=0,0023$) (Tabela 7).

Tabela 10. Morfometria do intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	Área, μm^2
Duodeno						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	1740,94	138,12	181,31	44,90	9,39	28,29
Moderado	1714,30	139,63	181,76	44,84	9,50	28,66
Valor de P	0,5584	0,8969	0,9046	0,8534	0,8097	0,5963
<i>Enzima</i>						
Sem	1724,90	140,06	181,72	44,93	9,42	28,27
Com	1728,78	137,70	181,35	44,80	9,47	28,68
Valor de P	0,9466	0,8397	0,9217	0,6797	0,9130	0,5663
Fibra x Enzima	0,7542	0,9047	0,8074	0,4241	0,8353	0,9574
CV, %	7,58	25,03	6,15	2,19	14,90	7,37
Jejuno						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	882,59	200,64	135,13	53,21	6,55	11,35
Moderado	885,65	197,96	134,44	52,96	6,57	11,48
Valor de P	0,7891	0,8022	0,9021	0,8443	0,9626	0,8278
<i>Enzima</i>						
Sem	884,79	198,26	134,61	53,16	6,59	11,48
Com	883,30	200,34	134,97	53,02	6,53	11,35
Valor de P	0,9106	0,8455	0,9489	0,9164	0,8561	0,8353
Fibra x Enzima	0,8249	0,8024	0,7572	0,8288	0,8512	0,8685
CV, %	3,60	15,94	12,41	7,21	16,11	15,04
Íleo						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	550,86	159,18	145,72	44,35	3,78	8,86
Moderado	551,85	159,62	144,49	44,44	3,82	8,85
Valor de P	0,9457	0,8538	0,3028	0,7765	0,7206	0,9626
<i>Enzima</i>						
Sem	550,57	159,18	145,55	44,38	3,78	8,85
Com	552,14	159,61	144,66	44,40	3,82	8,86
Valor de P	0,9136	0,8585	0,4497	0,9616	0,7284	0,9738
Fibra x Enzima	0,9598	0,8147	0,5079	0,7995	0,9050	0,9215
CV, %	7,79	4,47	2,42	2,24	8,38	7,96

CV: comprimento de vilo; LV: largura de vilo; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C: relação vilo:cripta.

De acordo com Jackson et al. (2004) o modo de ação da β -mananase é complexo. Há três mecanismos sugestivos, o primeiro é a melhora no desempenho dos animais, a qual pode estar associada à redução da viscosidade (JACKSON et al., 2004 apud ROTTER et al., 1989). A segunda é uma melhora no metabolismo energético com a redução da ingestão de β -mananos, pois os mesmos segundo estudos, podem estar envolvidos com a redução da secreção de insulina (JACKSON et al., 2004 apud LEEDS et al., 1980; MORGAN et al., 1985) reduzindo assim, a absorção de glicose (JACKSON et al., 2004 apud RAINBIRD et al., 1984). E por fim,

o menor conteúdo de β -mananos no trato gastrointestinal reduz a estimulação do sistema imune inato, pela menor proliferação de macrófagos e monócitos e produção de citocinas (JACKSON et al., 2004).

Em condições experimentais, o uso de aditivos apresenta resultados controversos por não terem o mesmo impacto quanto ao observado em condições comerciais. A reduzida densidade de criação, a utilização de cama nova a cada lote, os procedimentos de desinfecção e a falta de desafio sanitário ou ambiental contribuem sobremaneira na manutenção do estado de saúde e no desempenho produtivo das aves.

Tabela 11. Morfometria do intestino delgado de frangos de corte aos 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	Área, μm^2
Duodeno						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	1779,49	152,64	182,15	43,11	10,12	29,59
Moderado	1754,53	151,85	178,53	42,89	10,15	29,32
Valor de P	0,6171	0,1511	0,5013	0,2488	0,7200	0,2194
<i>Enzima</i>						
Sem	1784,81	151,86	195,61	43,73	9,28	29,70
Com	1812,51	129,19	175,38	40,39	10,71	32,79
Valor de P	0,7598	0,2158	0,0672	0,1048	0,0706	0,3183
Fibra x Enzima	0,5578	0,5510	0,5368	0,0188	0,4862	0,1318
CV, %	13,05	36,14	16,39	11,73	21,79	26,11
Jejuno						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	900,66	139,83	131,15	43,52	7,11	15,39
Moderado	913,31	146,53	130,52	45,01	6,94	15,36
Valor de P	0,8913	0,5530	0,9512	0,4117	0,6433	0,6168
<i>Enzima</i>						
Sem	1001,61 ^a	140,33	138,00	44,05	7,32	17,32 ^a
Com	792,17 ^b	145,93	122,82	44,42	6,72	13,18 ^b
Valor de P	0,0072	0,6127	0,2721	0,7722	0,2348	0,0023
Fibra x Enzima	0,8325	0,6857	0,3667	0,4343	0,2675	0,8269
CV, %	22,88	22,44	28,66	12,76	22,83	22,09
Íleo						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	493,17	147,95	126,80	42,37	3,93	8,01
Moderado	483,53	145,44	130,42	42,42	3,83	8,50
Valor de P	0,8510	0,7631	0,7527	0,5903	0,9015	0,7844
<i>Enzima</i>						
Sem	530,71	148,76	130,02	40,89	4,16	8,70
Com	430,81	144,12	125,88	44,39	3,46	7,65
Valor de P	0,0710	0,6003	0,6473	0,0270	0,1754	0,3672
Fibra x Enzima	0,1949	0,8379	0,8778	0,1217	0,1354	0,1022
CV, %	27,45	16,47	17,04	10,78	28,01	21,98

CV: comprimento de vilos; LV: largura de vilos; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C: relação vilos:cripta.

Aos 21 dias o peso relativo do fígado aumentou ($p < 0,05$) de forma independente em função do fornecimento de dietas com nível moderado de fibra ($p = 0,0122$) e da suplementação enzimática ($p = 0,0345$) (Tabela 8).

Foi observada interação ($p < 0,05$) entre fibra e enzima para o peso relativo do fígado ($p = 0,0034$) aos 42 dias. No desdobramento da interação (Tabela 9), em dietas com nível moderado de fibra ($p = 0,0032$) e sem adição da β -mananase ($p = 0,0183$) observou-se os maiores percentuais de peso relativo para o órgão.

Tabela 12. Peso relativo de órgãos de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Bolsa	Timo	Baço	Intestino	Pâncreas	Fígado
21 dias						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	0,25	0,13	0,11	7,65	0,32	2,54 ^b
Moderado	0,25	0,13	0,11	7,98	0,31	2,69 ^a
Valor de P	0,7025	0,7191	0,1829	0,1528	0,5003	0,0122
<i>Enzima</i>						
Sem	0,25	0,13	0,10	7,72	0,31	2,55 ^b
Com	0,26	0,13	0,11	7,90	0,31	2,67 ^a
Valor de P	0,4994	0,5619	0,3471	0,4189	0,7868	0,0345
Fibra x Enzima	0,6074	0,9338	0,8325	0,1649	0,8924	0,8142
CV, %	15,36	22,51	20,47	8,22	15,66	6,54
42 dias						
<i>Nível de fibra</i>						
Baixo	0,11	0,09	0,12	4,58	0,18	2,02
Moderado	0,12	0,10	0,12	4,73	0,18	2,06
Valor de P	0,4069	0,3559	0,9887	0,4401	0,6930	0,5415
<i>Enzima</i>						
Sem	0,13	0,09	0,12	4,72	0,17	2,09
Com	0,11	0,10	0,11	4,57	0,18	1,99
Valor de P	0,2775	0,2174	0,1608	0,4565	0,5261	0,1925
Fibra x Enzima	0,8164	0,1009	0,8092	0,9644	0,4403	0,0034
CV, %	48,07	29,31	21,84	11,95	15,09	11,26

Azarfar (2013) encontrou diferenças para peso do fígado, em aves suplementadas com β -mananase. Frangos alimentados com 0,05 g/kg da enzima apresentaram um peso maior de fígado do que aqueles alimentados com 1,0 g/kg, mas não diferiram das aves que não receberam suplementação. Já Hajati (2010) aos 44 dias de idade das aves, não encontrou efeito significativo da suplementação do blend enzimático no peso dos órgãos estudados.

Tabela 013. Desdobramento das interações do peso relativo do fígado aos 42 dias de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Com Enzima	Sem Enzima	Valor de P
Nível baixo de fibra	2,0922	1,9489	0,2408
Nível moderado de fibra	1,8933	2,2438	0,0032
Valor de P	0,0851	0,0183	

O nível de fibra das dietas e a suplementação enzimática não influenciaram a deposição proteica ($p>0,05$) (Tabela 10). Houve interação ($p<0,05$) para o conteúdo de gordura abdominal ($p=0,0132$). No desdobramento desta interação observou-se diferença ($p=0,0552$) para inclusão da enzima (Tabela 11). Dietas com nível moderado de fibra ($p=0,0481$) sem a inclusão da β -mananase ($p=0,0662$) resultaram no menor percentual de gordura na carcaça.

Tabela 10. Rendimento de carcaça de frangos de corte aos 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Peso relativo, %			
	Carcaça	Pernas	Peito	Gordura
<i>Nível de fibra</i>				
Baixo	75,58	27,49	33,03	2,06
Moderado	75,03	27,66	32,95	2,04
Valor de P	0,1155	0,6809	0,8646	0,8864
<i>Enzima</i>				
Sem	75,25	27,46	32,89	2,07
Com	75,36	27,70	33,10	2,02
Valor de P	0,6987	0,5765	0,7240	0,6887
Fibra x Enzima	0,6193	0,8078	0,2447	0,0132
CV, %	1,32	4,28	5,93	17,51

Hajati (2010) encontrou efeito da suplementação de blend enzimático apenas para rendimento de coxas e sobrecoxas de frangos de corte aos 44 dias de idade. Este autor argumenta que as respostas à suplementação enzimática dependem da idade das aves, pois está relacionada com o tipo de microbiota presente e a sua fisiologia.

Segundo Kaczmarek et al. (2014), o modo de ação das enzimas que degradam os PNAs é baseado na eliminação da barreira física da parede celular do endosperma e encapsulação de nutrientes. A degradação dos PNAs pelas enzimas podem liberar porções de amido e proteína encapsuladas pela estrutura da parede celular, facilitando a utilização de energia adicional. Espera-se então, um maior aproveitamento dos nutrientes pelos animais em função da suplementação enzimática, principalmente após a primeira semana de vida.

Tabela 11. Desdobramento da interação do rendimento de gordura aos 42 dias de idade de frangos de corte recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	Com Enzima	Sem Enzima	Valor de P
Nível baixo de fibra	1,92	2,19	0,1355
Nível moderado de fibra	2,22 ^a	1,86 ^b	0,0481
Valor de P	0,1006	0,0662	

De acordo com a Tabela 12, não foi observado diferença ($p>0,05$) na qualidade da cama com a utilização da enzima. O aumento da excreção de água, em virtude da alta absorção no intestino grosso, em dietas com alto nível de PNAs está relacionado com o aumento da viscosidade no trato gastrointestinal. A enzima β -mananase visa diminuir esta viscosidade intestinal e assim, diminuir a excreção de água nas excretas. Entretanto, este fato não foi observado em nosso estudo.

Tabela 12. Matéria seca (MS) e pH da cama de frangos de corte aos 42 dias de idade recebendo dietas com nível baixo e moderado de fibra, suplementadas ou não com β -mananase

	MS, %	pH
<i>Nível de fibra</i>		
Baixo	61,45	8,15
Moderado	61,66	8,23
Valor de P	0,8871	0,5380
<i>Enzima</i>		
Sem	62,06	8,19
Com	61,05	8,19
Valor de P	0,4994	0,9839
Fibra x Enzima	0,4625	0,7684
CV, %	7,25	5,00

Conclusão

As dietas com baixo nível de fibra bruta e não suplementadas com a β -mananase atenderam as exigências nutricionais dos animais. O nível moderado de fibra utilizado nas dietas não prejudicou o desempenho zootécnico. A enzima, apesar da disponibilidade de substrato, não trouxe benefícios ao desenvolvimento animal.

Referências

AZARFAR, A. Effect of hemicell enzyme on the performance, growth parameter, some blood factors and ileal digestibility of broiler chickens fed corn/soybean-based diets. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 7, p. 85-91, 2013.

BRITO, M.S.; OLIVEIRA, C.F.S.; SILVA, T.R.G.; LIMA, R.B.; MORAIS, S.N.; SILVA, J.H.V. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos – revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2. N. 4, p. 111-117, 2008.

CAMPBELL, G.L.; CLASSEN, H.L. GOLDSMITH, K.A. Effect of fat retention on the rachitogenic effect of rye fed to broiler chicks. **Poultry Science**, v.62, p.2218-2213, 1983.

CHOCT, M.; KOCHER, A.; WATERS, D.L.E.; PETTERSSON, D.; ROSS, G. A comparasion of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 53-61, 2004.

CHOCT, M. **Feed polysaccharides: nutritional roles and effect of enzymes**. In: IV Congresso Latino Americano de Nutrição Animal - IV CLANA CBNA/AMENA. Estância de São Pedro, SP – Brasil, 2010.

DASKIRAN, M.; TEETER, R.G.; FODGE, D.; HSIAO, H.Y. An evaluation of endo- β -D-mannanae (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in β -mannan content. **Poultry Science**, v. 83, p. 662-668, 2004.

GONZÁLEZ-ALVARADO, J.M.; JIMÉNEZ-MORENO, E.; LÁZARO, R.; MATEOS, G.G. Effect of type of cereal, heat processing of the cereal, and inclusion of fiber in diet on productive performance and digestive traits of broilers. **Poultry Science**, v. 86, p. 1705-1715, 2007.

HAJATI, H. Effects of enzyme supplementation on performance, carcass chacaracteristics, carcass composition and some blood parameters of broiler chicken. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, n. 3, p. 221-227, 2010.

HÖGBERG, A.; LINDBERG, J.E. Influence of cereal non-starch polysaccharides an enzymes supplementation on digestion site and gut environment in weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**. 116,1-2, p. 113-128. 2004.

HSIAO, H.Y.; ANDERSON, D.M.; DALE, N.M. Levels of β -mannan in soybean meal. **Poultry Science**, v. 85, p. 1430-1432, 2006.

JACKSON, M.E.; GERONIAN, K.; KNOX, A.; MCNAB, J.; MCCARTNEY, E. A dose-response study with the feed enzyme β -mannanase in broilers provided with corn-soybean meal based diets in the absence of antibiotic growth promoter. **Poultry Science**, v. 83, p. 1992-1996, 2004.

KACZMAREK, S.A.; ROGIEWICZ, A.; MOGIELNICKA, M.; RUTKOWSKI, A.; JONES R.O.; SLOMINSKI, B.A. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutriente utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. **Poultry Science**, v. 93, p. 1745-1753, 2014.

KISIELINSKI, K., S. WILLIS, A. PRESCHER, B. KLOSTERHALFEN, AND V. SCHUMPELICK. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, p. 131-135, 2002.

KNUDESEN, K.E. B. The nutricional significance of “dietary fibre” analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 90, p. 3-20, 2001.

KNUDESEN, K. E. B. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. **Poultry Science**, v. 93, p. 2380-2393, 2014.

MATEOS, G.G.; JIMÉNEZ-MORENO, E.; SERRANO, M.P.; LÁZARO, R.P. Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 21, p. 156-174, 2012.

RAVINDRAN, V.; ABDOLLAHI, M.R.; BOOTWALLA, S.M. Nutrient analysis, metabolizable energy, and digestible amino acids of soybean meals of different origins for broilers. **Poultry Science**, Singapore, v. 93, p. 2567-2577, 2014.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2007.

SMITH, M.O. Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. **Poultry Science**, v. 72, p. 1146-1150, 1993.

SELVENDRAN, R.R. The plant cell wall as a source of dietary fiber: chemistry and structure. **The American Journal of Clinical Nutrition**, U.S.A., v. 39, p. 320-337, 1984.

SKLAN, D.; SMIRNOV, A.; PLAVNIK, I. The effect of dietary fibre on the small intestines and apparent digestion in the turkey. **British Poultry Science**, v. 44, n. 5, p. 735-740, 2003.

CAPÍTULO II - SUPLEMENTAÇÃO DE β -MANANASE EM DIETAS CONVENCIONAIS E A CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Eimeria* sp.

RESUMO - O objetivo do trabalho foi estudar o efeito da suplementação de β -mananase em dietas de frangos de corte desafiados com *Eimeria* sp. sobre o desempenho zootécnico, a morfometria intestinal, o perfil imunológico e a microbiota intestinal. Foram alojadas 320 pintinhos machos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (sem e com enzima e sem e com desafio). A enzima β -mananase foi incluída na dose de 400g/ton e as aves foram desafiadas com vacina de coccidiose aos 14 dias de idade. O consumo de ração, uma semana após o desafio experimental, foi maior ($p < 0,05$) nas aves que não receberam a suplementação enzimática. No período de 1 a 21 dias de idade, o peso vivo e o ganho de peso foram maiores ($p < 0,05$) para as aves que não foram suplementadas. De 1 a 42 dias, a pior conversão alimentar foi encontrada nas aves que não receberam a β -mananase. Uma semana após o desafio, as aves que consumiram dietas controle e foram desafiadas apresentaram maior proporção ($p < 0,05$) de populações de linfócitos T CD8 ativados. Nesta mesma idade, observou-se maior profundidade de cripta, menor relação vilos:cripta e maior número de células caliciformes nas aves desafiadas. Entretanto, aos 42 dias, as aves desafiadas apresentaram maior relação vilos:cripta, menor número de células caliciformes. Já, as aves que receberam a suplementação enzimática apresentaram uma menor profundidade de cripta ($p < 0,05$), o que resultou na melhor relação vilos:cripta. Independente da presença da *Eimeria* sp., a enzima aumentou ($p < 0,05$) o número de espécies e a diversidade no intestino delgado, em comparação com o tratamento controle, sendo que no ceco apenas aumentou ($p < 0,05$) a diversidade. A melhor compreensão sobre a interação entre os compostos vegetais não-digeríveis, seus metabólitos intestinais, a microbiota intestinal e o hospedeiro abrirá novas possibilidades de produzir novos aditivos nutricionalmente otimizados que promovem a saúde do hospedeiro, através da manipulação da comunidade microbiana do intestino.

Palavras-Chave: β -mananase, linfócitos T, microbiota intestinal

CHAPTER II – β -MANANASE SUPPLEMENTATION IN CONVENTIONAL DIETS AND THE DESCRIPTION OF GUT MICROBIOTA AND IMMUNE RESPONSE OF EIMERIA-CHALLENGED BROILERS

ABSTRACT - The aim of this study was to access the effect of β -mannanase addition in diets of *Eimeria*-challenged broilers on performance, intestinal morphometry, immunological profile and gut microbiota. There were housed 320 male chicks following a completely randomized design in a factorial scheme 2 x 2 (with and without enzyme and with and without the challenge). The enzyme β -mannanase was added according to the dose of 400g/ton and the birds were challenged with coccidiosis vaccine at 14 days of age. One week after the challenge, feed intake was higher ($p < 0,05$) in those birds that did not receive enzymatic supplementation. From 1 to 21 days of age, the live weight and the weight gain showed higher numbers ($p < 0,05$) on birds that were not supplemented. In terms of feed conversion ratio, animals that did not receive β -mannanase showed the worst result from 1 to 42 days. Challenged fowls fed with control diet presented a better proportion ($p < 0,05$) of T CD8 activated lymphocytes one week after the challenge implementation. In addition, at this same age, crypt depth was greater, lower villus: crypt proportion and higher number of goblet cells in challenged birds. However, at 42 days of age, challenged birds showed greater villus: crypt proportion and less goblet cells while birds that received enzymatic supplementation presented lower crypt depth ($p < 0,05$), which reflects in a greater villus: crypt proportion. Regardless the *Eimeria* sp., the enzyme increased ($p < 0,05$) the species number and diversity into the small intestine when comparing to the control; nonetheless, in the cecum only diversity increased ($p < 0,05$). In summary, a better understanding about the interaction between non-digestible vegetable components, its intestinal metabolites and microbiota and host will reveal new options to produce new nutritionally optimized

additives. This feature could improve the host's health through the manipulation of the gut microbial community.

Keywords: β -mannanase, T lymphocytes, gut microbiota

Introdução

Milho e farelo de soja constituem as principais matérias primas em dietas de aves e suínos, determinando majoritariamente o custo das dietas e por consequência o custo da carne produzida. Ao longo dos anos, muitos estudos foram conduzidos para um maior conhecimento das características nutricionais e da composição destes ingredientes. Apesar da utilização em larga escala, o milho e o farelo de soja apresentam variações em sua composição em termos de fatores antinutricionais (COWIESON, 2005; PAULA, 2007; REMUS, 2008). No caso do farelo de soja, com exceção dos inibidores de tripsina, a composição dos demais fatores antinutricionais (oligossacarídeos, β -mananos e fitato), segundo Krabbe (2011) não são monitorados pelo controle de qualidade da indústria e, portanto, ainda não são completamente conhecidos.

Segundo Chen et al. (2010), os oligossacarídeos da soja compreendem um grupo de açúcares compostos essencialmente por galactose (65,3%), mananos e (15,6%), glicose (8,7%), frutose (7,8%), arabinose (1,9%) e xilose (0,9%) que podem apresentar alta variabilidade na composição dos grãos em função de fatores climáticos, genéticos e de cultivo.

A dificuldade na digestão dos PNAs por animais não ruminantes, devido suas ligações β não serem degradadas pelas enzimas endógenas, além de reduzir a energia do alimento, pode prejudicar a utilização de todos os outros nutrientes. Isto ocorre principalmente quando o tipo de fibra do alimento é solúvel, ou seja, tem grande capacidade de absorver água e formar substâncias gelatinosas no trato intestinal (CHOCT et al., 2010). Este aumento da viscosidade intestinal diminui a velocidade de passagem dos alimentos ao longo do trato digestivo, dificultando a ação das enzimas endógenas e interferindo na difusão ou transporte dos nutrientes (CHOCT et al., 2004).

Enzimas exógenas podem hidrolisar PNAs dos ingredientes vegetais das rações, melhorando a disponibilidade de energia e a utilização de nutrientes

(SHIRMOHAMMAD e MEHR, 2011). Outro benefício do uso destas enzimas é a redução da viscosidade da digesta intestinal que modifica a microbiota intestinal e reduz a umidade da excreta, melhorando as condições da cama (OLIVEIRA e MORAES, 2007).

A suplementação dietética com enzimas exógenas pode ainda alterar a microbiota intestinal (CHOCT et al., 1999; BEDFORD, 2000; COWIESON et al., 2006; NIAN et al., 2011). A composição da microbiota intestinal tem uma relação muito estreita com mudanças nos componentes da dieta. Bactérias comensais competem por substratos disponíveis liberados da fermentação de frações fibrosas do alimento e estabelecem um metabolismo com preferências espécie-específicas (CERF-BENSUSSAN e GABORIAU-ROUTHIAU, 2010).

A concentração bacteriana no intestino delgado é predominantemente fermentadora de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*) além de alguns *Clostridiales*, *Bacteroidetes* e *Ruminococcus*, este último encontrado pela presença de carboidratos estruturais (GONG et al., 2007). Já no ceco, onde é possível o aproveitamento de parte dos carboidratos estruturais dietéticos não degradáveis pelas enzimas do animal (MACARI et al., 2014) são encontradas diferentes espécies de clostrídeos, que representam os principais habitantes do ceco, incluindo o *Clostridium perfringens*, além de *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* e *Eubacterium*, seguidos pelos *Bacteroides* (GONG et al., 2002; GONG et al., 2007; WISE e SIRAGUSA, 2007 apud MACARI et al., 2014). Também podem ser encontradas espécies de enterobactérias e actinobactérias, além de pequenas proporções de *Lactobacillus* (MACARI et al., 2014).

Entretanto, alterações na comunidade bacteriana intestinal podem ser causadas por uma única cepa de bactéria ou protozoário, o que causa um desequilíbrio na estrutura do bioma intestinal resultando em disbiose. Desafios por coccidiose atuam como fatores condicionantes de enterite necrótica pela destruição maciça da mucosa. Os tecidos intestinais danificados causadas por ela podem desestruturar as barreiras naturais de defesa e permitir a colonização por vários agentes patogênicos, tais como *Clostridium perfringens* ou *Salmonella* spp. (CHAPMAN, 2014).

Muitos estudos consolidam as interrelações entre nutrição, coccidiose e microbiota intestinal, tanto o impacto da coccidiose na digestão da dieta, quanto em ingredientes que influenciam na patogênese desta doença e por último o efeito

conjunto sobre a microbiota intestinal. Num estudo clássico comparativo da eficiência de um ionóforo contra infecção por *Eimeria tenella*, Williams (1992) observou que a infecção foi mais severa nas aves recebendo dieta a base de trigo do que na dieta a base de milho, independente da presença ou não do ionóforo. A principal explicação para a diferença na severidade da infecção pela *Eimeria tenella* é a alteração causada pelos alimentos no ambiente intestinal, principalmente na população de micro organismos e seu pH.

Se a disbiose é a causa ou efeito de distúrbios intestinais, isso ainda não é conhecido. Contudo, o estado de desequilíbrio microbiano intestinal pode ser modificado ou revertido por componentes dietéticos, como enzimas, probióticos, prebióticos e ácidos (BÄCKHED et al., 2012). A possibilidade de modular a comunidade intestinal com o uso racional destes aditivos pode ser uma alternativa para o dilema da proibição dos antibióticos como aditivos alimentares para promoção do crescimento dos animais de produção (ANDREATTI FILHO, 2007).

Estudos têm demonstrado que os animais desprovidos de uma microbiota intestinal são mais suscetíveis à doença e têm pior desenvolvimento do sistema imune (MAYNARD et al., 2012). Por este papel e outros ainda não totalmente compreendidos, a microbiota intestinal pode influenciar as taxas de crescimento do hospedeiro, seja por disponibilizar nutrientes por meio da fermentação de fibras vegetais ou pela produção de moléculas ainda desconhecidas, mas com grande impacto sobre a conversão alimentar (STANLEY et al, 2012). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de β -mananase sobre a microbiota intestinal e o sistema imune de frangos de corte desafiados com oocistos esporulados de *Eimeria sp.*

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no biotério experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Todos os procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação.

Foram distribuídos 320 pintinhos machos de 1 dia de idade, da linhagem Cobb 500 em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2

(com e sem enzima e com e sem desafio experimental), obtendo-se 4 tratamentos com 4 repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos experimentais utilizados foram:

- Tratamento 1: dieta controle e sem desafio;
- Tratamento 2: dieta com inclusão de β -mananase e sem desafio;
- Tratamento 3: dieta controle e com desafio;
- Tratamento 4: dieta com inclusão de β -mananase e com desafio.

As dietas, à base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais adotadas pelas integrações avícolas da região (Tabela 1). O programa de alimentação foi dividido em 2 fases: inicial (1 a 21 dias) e crescimento/final (22 a 42 dias). As rações eram fareladas e a enzima β -mananase foi incluída nas dietas específicas na dose de 400g/ton nas duas fases.

Aos 14 dias de idade, as aves dos tratamentos 3 e 4 receberam a vacina comercial (viva atenuada) contra coccidiose, derivada de 8 cepas de coccidia: *Eimeria acervulina*, *E. Brunetti*, *E. hagani*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. mivati*, *E. máxima* e *E. praecox*. Previamente à aplicação foi realizada a esporulação dos oocistos pela injeção de oxigênio diretamente em tubos Falcon com a vacina, os quais foram rapidamente lacrados e mantidos em estufa tipo BOD a 28°C durante 48 horas. A vacina foi inoculada diretamente no inglúvio de cada ave na dose de 20 vezes a recomendada pelo fabricante da vacina.

Tabela 14. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) e crescimento/abate (22 a 42 dias)

Ingredientes, %	1 a 21 dias	22 a 42 dias
Milho, 8%	57,54	66,66
Óleo	1,28	2,00
Farelo de soja, 46%	37,08	27,92
Cálcario calcítico, 38%	1,08	0,94
Fosfato bicálcio, 20%	1,72	1,40
Cloreto de Sódio	0,43	0,36
DL-Metionina, 98%	0,27	0,22
L-Lisina, 78%	0,15	0,19
L-Treonina, 98%	0,03	0,03
Cloreto de colina, 60%	0,12	0,04
Premix Vitamínico ¹	0,14	0,12
Premix Mineral ²	0,12	0,08
Inerte ³	0,04	0,04
EMA (kcal/kg)	2899	3050
PB, %	22,00	18,50
EE, %	4,15	5,03
FB, %	3,06	2,79
Lys Dig., %	1,190	1,082
AAST Dig., %	0,857	0,800
Tre Dig., %	0,751	0,630
Cálcio, %	0,902	0,757
Fósforo, %	0,452	0,380
Potássio, %	0,955	0,788
Sódio, %	0,200	0,170

¹Premix vitamínica (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg, Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

²Premix mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

³Inerte substituído por β -mananase.

O ambiente de criação das aves consistia em uma sala climatizada (ar condicionado e exaustores) com 4 baterias de gaiolas, cada uma composta por 4 gaiolas (1,00 x 0,80m), totalizando 16 unidades experimentais. Durante os primeiros dias de criação, com a finalidade de manter a temperatura de conforto térmico das aves, o chão das gaiolas foi isolado com papel kraft e em seguida colocado maravalha (\pm 5cm). A temperatura de conforto térmico das aves foi regulada de acordo com a idade das aves. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período do ensaio.

O manejo das aves era iniciado pelas aves do grupo controle e em seguida eram manejadas as aves desafiadas procurando evitar a contaminação entre os grupos.

Para avaliação do desempenho produtivo, as aves e as sobras de ração de cada unidade experimental foi pesada semanalmente. A conversão alimentar foi

corrigida pela mortalidade semanal das aves conforme metodologia descrita por SAKOMURA e ROSTAGNO (2007).

Uma semana após o desafio, foram coletadas excretas das aves de cada tratamento, totalizando 16 amostras, para a realização da contagem de oocistos de *Eimeria* spp por grama de excreta (OOPG) pelo método de Gordon e Whitlock (1939) modificado.

Aos 21 e 42 dias de idade das aves, respectivamente 7 e 28 dias após a inoculação dos oocistos esporulados, foi coletado sangue da veia jugular externa ou alar com anticoagulante heparina sódica Hepamax® (Blausiegel, São Paulo, Brasil) de 8 aves/tratamento e acondicionados em tubos Vacuteiner® (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) até o momento da análise em citômetro de fluxo. Todos os anticorpos foram adquiridos de Southern Biotechnology Associates (USA). O anticorpo camundongo anti-galinha CD45 (conjugado a SPRD - lido no canal FL3) clone LT40 foi usado para separar os leucócitos do sangue total. Para identificar as moléculas em superfície dos leucócitos os seguintes anticorpos foram utilizados: camundongo anti-galinha CD4 (clone CT-4, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha CD8 α (clone CT-8, IgG1, conjugado a R-PE); camundongo anti-galinha CD28 (clone AV7, IgG1, conjugado a FITC). Para determinar diferentes subpopulações leucocitárias e suas funções recorreu-se a duplas marcações a seguir: CD4/TCR $\nu\beta$ 1 e CD8 α /CD28.

As amostras de sangue total foram tratadas segundo Stabel et al. (2000). Basicamente, 50 μ L de sangue total foram incubados por 30 minutos (37°C) com os anticorpos específicos e fixados com paraformaldeído por 30 minutos a 4°C, posteriormente acondicionados em tubos de citometria em volume final de 2mL de PBS + BSA 1% + Azida 0,02%. Os marcadores descritos foram utilizados para analisar 3 populações principais: linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 ativados e monócitos.

A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson) e as fluorescência dos anticorpos foram detectadas nos canais FL1 (nm 530/30) para FITC, e FL2 (nm 585/42) para PE. Foram analisados 50.000 eventos na seleção (gate) de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral - FSC e SSC). Os dados foram analisados com o software Cell Quest (Becton Dickinson).

Após o procedimento de coleta de sangue, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical. Após a eutanásia, o peso dos órgãos linfóides (bolsa cloacal, timo e baço) foi obtido imediatamente após a dissecação e remoção dos tecidos exógenos para cálculo do peso relativo pela fórmula: peso relativo = (peso órgão/peso vivo) x 100. Após a coleta foram fixados em solução de formol tamponado. A superfície transversal de cada órgão foi exposta e fotografada juntamente com uma régua de calibração de 1mm (distância de 20cm, câmara digital com zoom de 2,4). As imagens foram preparadas e analisadas por meio do sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Foram obtidas as medidas da área total de cada órgão (mm²), e diâmetro longitudinal do baço e bolsa cloacal e diâmetro longitudinal e transversal (mm) do timo.

O intestino delgado foi removido e obtido fragmentos longitudinais de aproximadamente 5cm de comprimento do jejuno, os quais foram presos a pedaços de isopor e lavados com formol tamponado refrigerado. Cada fragmento, após fixação em formalina 10% tamponada, passou pelo processo de desidratação/hidratação por meio de soluções a base de álcool e xilol e então, foram emblocados em parafina. Após, foram submetidos a cortes semi-seriados de 5µm de espessura e corados pela técnica do ácido periódico de Schiff (PAS). Para a contagem das células caliciformes, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (Olympus BX 50), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética), em aumento de 40x. A contagem do número de células caliciformes foi feita nas imagens capturadas em aumento de 40x por mm² de área de vilo.

Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas pelo mesmo sistema descrito, entretanto em aumento de 10 vezes. Neste estudo foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilos e a profundidade e largura de 20 criptas de cada lâmina. Utilizou-se estas medidas morfométricas também para o cálculo da área de superfície de absorção da mucosa intestinal, através da seguinte fórmula, segundo Kisielinski et al. (2002).

$$\text{Área de absorção: } \frac{(LV \times AV) + (LV/2 + LC/2)^2 - (LV/2)^2}{(LV/2 + LC/2)^2}$$

Onde:

LV: largura de vilo, AV: altura de vilo, LC: largura de cripta

Nestas mesmas idades (21 e 42 dias), 3 aves/gaiola (12 aves/tratamento) foram selecionadas sem jejum prévio, sacrificadas por deslocamento cervical e o trato gastrointestinal foi exposto. O ambiente foi devidamente limpo e desinfetado com álcool 70%, evitando qualquer contaminação do material a ser coletado. O início do duodeno e a junção íleo/cecal foram isolados, afim de que o conteúdo intestinal permanecesse dentro do órgão e sem contato com o ambiente externo. O mesmo isolamento foi feito no início do ceco. Em ambas as situações, o isolamento foi feito com fio devidamente desinfetado e anteriormente ao corte para separação do órgão em duas porções, (i) duodeno, jejuno e íleo e (ii) ceco. Em seguida as amostras devidamente identificadas foram imediatamente congeladas. Aproximadamente 12hs antes do processamento do conteúdo intestinal, as amostras foram descongeladas em condições de refrigeração a temperatura de 4°C. Com o ambiente devidamente limpo e desinfetado constantemente, foram feitos “pools” (cada “pool” constituído por três aves) do conteúdo do intestino delgado e do ceco das três aves de cada unidade experimental, resultando em quatro amostras de intestino delgado e quatro amostras de ceco/tratamento.

Para o estudo da microbiota do intestino delgado, foi realizado previamente a concentração da fração bacteriana de acordo com a metodologia (adaptada) proposta por Apajalahti et al. (1998). A partir de uma seringa (60mL) estéril construiu-se uma coluna para filtração do material não digerido e das impurezas. Na parte inferior, havia um funil, formado por papel filtro (n°1), logo em seguida, na porção intermediária, algodão estéril, e na parte superior, gases estéreis. Esta seringa foi colocada em uma garrafa autoclavada de centrifuga.

Logo após, 15g do conteúdo intestinal homogeneizado diluído em 50mL de PBS (Tampão Fosfato de Sódio, pH 8) 50mM, contendo 0,1% de Tween 80. Por um minuto, a solução foi vagorosamente misturada e após, colocada na coluna. A garrafa foi alocada na centrífuga, a qual foi mantida com formol para diminuir a possível contaminação externa e o rotor congelado para manter a temperatura baixa. Então, o material foi centrifugado a 3000g por 20 minutos. O conteúdo foi filtrado e os micro organismos concentraram-se no fundo da garrafa, na forma de

pelete. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pelete ressuspendido em 1mL de solução salina estéril (solução NaCl 0,9%).

A nova solução foi distribuída em microtubos tipo eppendorf, no volume máximo de 200µL por tubo e centrifugadas a 6000g por 10 minutos. Novamente, os micro organismos concentraram-se no fundo e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente.

Obteve-se o peso do pelete bacteriano restante e em proporção de 1:10, foi ressuspendido em Solução Peptone (1% peptone, 15% glicerol em água). Homogeneizou-se a solução até não ser mais visível o pelete e o líquido ficar turvo. Então, os microtubos tipo eppendorf foram congelados para posterior extração do DNA.

Para análise do conteúdo cecal, devido ao maior número de microorganismos, não é necessário o procedimento de concentração das bactérias. Assim, 3g do conteúdo cecal previamente homogeneizado foi diluído em Solução Peptone na proporção de 1:10 em um tubo tipo falcon, o qual foi novamente congelado para posterior análise.

O conteúdo intestinal e cecal foram submetidos à extração de DNA com TE (Tampão Tris - EDTA) a partir de uma alíquota de 500µL da suspensão previamente obtida. Acrescentou-se uma solução de lise de 200µL, preparada a partir de 145µL de EDTA 1mM, pH 8,0 e 55µL SDS 10% e acrescida de 3,8µL de lisozima e 10,8µL proteinase K. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram mantidas em banho-maria a 55°C por 30min e transferidas posteriormente para outro banho-maria a 95°C por 15min. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 14000g por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante, acrescentando 3,2µL de RNase. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após a incubação adicionou-se 700µL da mistura obtida com fenol, clorofórmio e álcool isolamilico, mantidas em banho-maria 56°C por 15 minutos. Após esse período foram centrifugadas a 8000g por 15 minutos, recuperou-se 500µL acrescentando 134µL acetato de amônio 7M, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 1340µl de etanol gelado. As amostras foram mantidas à 4°C por 17 horas e posteriormente centrifugadas a 14000g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a evaporação do etanol em temperatura ambiente o precipitado foi dissolvido em 50µL de tampão TE. As amostras foram submetidas ao PCR e o produto foi

analisado em gel de agarose. Após constatação da amplificação, as amostras foram submetidas ao sequenciamento.

O DNA previamente extraído foi submetido à reação de PCR tendo como alvo a região V4 gene 16S rDNA. A reação de amplificação constituiu na desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos, de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto e 45 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi conduzida por 72°C por 4 minutos. Os *primers* bacterianos utilizados foram: Forward “AYTGGGYDTAAAGNG” (*E. coli* position 563-577) e reverse “CCGTCAATTCMTTTRAGT” (*E. coli* 907-924). Além disso, utilizou-se 10X PCR Buffer; Cloreto de Magnésio (MgCl₂ – 50mM); dNTP's (10mM) e a Taq Polimerase na concentração de 5U/μL. Após este primeiro PCR, o produto da reação foi purificado com o Kit Charge Switch, de acordo com instruções do fabricante. A segunda PCR, com os adaptadores, foi realizada na seguinte condição: 95°C por 3 minutos, seguindo 5 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos. O produto foi mantido a -20°C até o momento do sequenciamento. Nesta última reação foi usado 5μL de cada adaptador (2 adaptadores para cada amostra), mais 15μL do produto da primeira PCR. O sequenciamento foi realizado no MiSeq, com o “Kit MiSeq Reagent kit v2 (500 ciclos)”. O produto foi analisado pelo software MiSeq Reporter, na opção Metagenomics, do próprio equipamento.

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (“*outliers*”) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Depois de constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002).

A análise das sequências parciais do gene rDNA 16s foi conduzida utilizando-se um software com uma fonte filogenética de acesso aberto. 27 sequências de boa qualidade foram alinhadas usando a base de dados “Silva” e posteriormente filtrados. Sequências 16S foram carregadas no MG-RAST servidor 28 com o objetivo de gerar tabelas de gêneros e espécies com 97% de similaridade. Distâncias filogenéticas foram calculadas em sequências pré-agrupadas, e as unidades taxonômicas operacionais foram formadas usando o método do método vizinho. O algoritmo Libshuff foi usado para estimar diferenças entre a composição

das bibliotecas. A análise estatística relacionada com a frequência de sequências específicas representando os micro organismos presentes nas amostras foram conduzidas por análise de variância. A análise estatística relacionada com a frequência de sequências bacterianas presentes nas amostras foi analisada pelo PROC FREQ e comparadas pelo teste de Qui-Quadrado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$.

Resultados e Discussão

A relação entre a suplementação de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja e o desafio entérico através da inoculação de oocistos esporulados de *Eimeria* sp sobre a caracterização da microbiota intestinal e cecal foi investigada. Neste estudo, avaliou-se também a morfometria da mucosa intestinal e a resposta imune das aves submetidas às condições descritas.

Até os 14 dias de idade, as aves receberam dois tratamentos: rações suplementadas ou não com β -mananase. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) no desempenho produtivo das aves, independente do tratamento, avaliado aos 7 dias de idade (Tabela 2). Aos 14 dias, as aves foram inoculadas com oocistos de *Eimeria* sp. e na 1ª coleta pós-infecção (21 dias de idade) foi possível observar apenas lesões discretas, como placas esbranquiçadas na mucosa do duodeno até o início do jejuno, lesões típicas de *E. acervulina*. Alguns animais apresentaram diarreia aquosa, nos intestinos havia conteúdo mucoso alaranjado, espessamento da parede intestinal, entre outros sinais característicos de coccidiose, como os descritos na literatura (Allen e Fetterer, 2002), entretanto, muito sutis. Por outro lado, a contagem de oocistos foi significativa ($p < 0,05$), obtendo-se 38 OOPG nas fezes das aves não desafiadas e 15.700 OOPG nas aves desafiadas. A suplementação de enzima não interferiu neste resultado (Tabela 3).

Tabela 2. Desempenho produtivo de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase

	PV, g	CR, g	GP, g	CA
Enzima				
Sem enzima	187,89	155,81	139,57	1,130
Com enzima	184,62	158,36	136,36	1,161
CV, %	1,97	2,70	2,94	2,81
Valor de P	0,0993	0,2197	0,1393	0,0750

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

Tabela 3. Contagem de oocistos em frangos de corte alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de *Eimeria* sp.

Enzima	Desafio	Oocistos (OPG)
Sem enzima	Sem desafio	0
Sem enzima	Com desafio	8750
Com enzima	Sem desafio	75
Com enzima	Com desafio	22650
Enzima		
Sem enzima		4375
Com enzima		11363
	Desafio	
	Sem	38 ^a
	Com	15700 ^b
CV, %		23,89
Enzima		0,2419
Desafio		<0001
Enzima x desafio		0,8097

Estes achados relatados podem explicar os resultados de desempenho produtivo observados na 1^a semana pós desafio (14 a 21 dias) ou quando se considerou o período inicial (1 a 21 dias) e total (21 a 42 dias). Não houve interação ($p > 0,05$) da suplementação enzimática e do desafio sanitário pra todas as idades avaliadas (Tabela 4). Entretanto, o ganho de peso das aves suplementadas com a enzima foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado com as aves que receberam dieta controle aos 21 dias. Pode ser observado, neste mesmo período, que a infecção experimental não agrediu o trato gastrointestinal o suficiente para impactar o aproveitamento dos nutrientes e o ganho de peso das aves, apesar da maior eliminação de oocistos.

Em condições de campo, onde os desafios sanitários são consideravelmente maiores, possivelmente seriam encontradas lesões de scores elevados no trato gastrointestinal característicos deste protozoário, além de possíveis enterites inespecíficas oriundas de organismos oportunistas. Em aviários com alta densidade de criação, há ainda um somatório de condições negativas como os altos níveis de amônia, redução do acesso aos frangos à ração e a água, camas com alta umidade, além da pior qualidade de ambiente pela dificuldade de troca de ar (CENGIZ et al.,

2015) que contribui para a exacerbação de uma perturbação entérica como a coccidiose e resulta em considerável impacto econômico (ABDELRAHMAN et al., 2014).

De acordo com os dados da Tabela 4, o período de 1 a 21 dias de idade, observou-se o mesmo resultado relatado para o período de 14 a 21 dias, pior peso vivo e ganho de peso das aves suplementados com a enzima em relação ao grupo controle. De 1 a 42 dias, a suplementação com enzima resultou em pior conversão ($p < 0,05$).

Tabela 4. Desempenho produtivo de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de *Eimeria* sp.

		PV, g	CR, g	GP, g	CA
Enzima		14 a 21 dias			
	Desafio				
Sem enzima	Sem desafio		600,58	427,86	1,411
Sem enzima	Com desafio		598,83	426,11	1,408
Com enzima	Sem desafio		580,40	406,49	1,429
Com enzima	Com desafio		577,80	403,36	1,433
Enzima					
Sem enzima			599,70 ^a	426,98	1,409
Com enzima			579,10 ^b	404,93	1,382
	Desafio				
	Sem desafio		590,49	417,17	1,420
	Com desafio		588,31	414,74	1,418
CV, %			2,78	5,45	2,99
Enzima			0,0271	0,0753	0,1284
Desafio			0,7952	0,8335	0,0606
Enzima x desafio			0,9593	0,9522	0,5847
Enzima		1 a 21 dias			
	Desafio				
Sem enzima	Sem desafio	912,56	1141,83	852,75	1,340
Sem enzima	Com desafio	910,89	1133,36	843,53	1,346
Com enzima	Sem desafio	860,83	1121,48	809,28	1,386
Com enzima	Com desafio	874,52	1104,90	800,28	1,381
Enzima					
Sem enzima		911,72 ^a	1137,59	848,14 ^a	1,343
Com enzima		867,68 ^b	1113,19	804,78 ^b	1,383
	Desafio				
	Sem desafio	886,70	1131,66	831,01	1,363
	Com desafio	892,71	1119,13	821,90	1,363
CV, %		3,33	2,65	3,54	3,58
Enzima		0,0116	0,1272	0,0119	0,1228
Desafio		0,6918	0,4168	0,5452	0,9920
Enzima x desafio		0,6133	0,7896	0,9940	0,8254
Enzima		1 a 42 dias			
	Desafio				
Sem enzima	Sem desafio	2641,38	4169,68	2530,02	1,648
Sem enzima	Com desafio	2626,99	4193,26	2573,62	1,630
Com enzima	Sem desafio	2590,42	4167,40	2511,62	1,659
Com enzima	Com desafio	2538,83	4150,51	2451,27	1,694
Enzima					
Sem enzima		2634,19	4181,47	2551,82	1,639 ^b
Com enzima		2564,62	4158,96	2481,45	1,676 ^a
	Desafio				
	Sem desafio	2615,90	4168,54	2520,82	1,653
	Com desafio	2582,91	4171,89	2512,44	1,662
CV, %		3,41	3,32	3,01	1,84
Enzima		0,1422	0,7509	0,0879	0,0291
Desafio		0,4706	0,9623	0,8287	0,5982
Enzima x desafio		0,6819	0,7753	0,1951	0,1077

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

Resultados semelhantes foram encontrados por Yu e Chung (2004) que não encontraram diferenças na conversão alimentar com a inclusão de complexos enzimáticos contendo amilase, xilanase, β -glucanase e protease quando comparados a dietas referência de redução ou não de 3% da energia metabolizável.

Os efeitos de utilização de enzimas exógenas podem ser variáveis e dependem de um grande número de fatores tais como a idade do animal e da qualidade e tipo de dieta (Bedford, 2000). Asmare e Mekuriaw (2014) citam que o efeito da adição de enzimas é maior em rações contendo uma maior quantidade de substrato e concluem que os resultados controversos encontrados em trabalhos avaliando a utilização da enzima se devem a estreita relação enzima-ingrediente. A estimativa do conteúdo de β -galactomananos é de 1,83% e 2,22% no farelo de soja com 48% e 44% de proteína bruta, respectivamente (DIERICK, 1989). Por esse motivo, a eficiência das β -mananases é mais notável em dietas formuladas com farelo de soja com 44% de proteína bruta, uma vez que nesse material é adicionada certa quantidade de casca de soja. As dietas utilizadas neste estudo foram formuladas com farelo de soja de alta qualidade (46 a 48% de proteína bruta) com nível de fibra bruta de cerca de 3%, o que pode não se constituir em quantidade inferior de substrato para ação da enzima. Além disso, segundo Cho e White (1993), a porção solúvel da soja representada principalmente pela hemicelulose, a qual é composta, principalmente, pelos β -glucanos representa uma porção muito pequena em comparação com a cevada e aveia (em torno de 4,5 a 5,5%).

Os β -mananos têm a capacidade de atravessar a mucosa intestinal (ROSS et al., 2002) e não há relatos acerca dos consequentes efeitos, sejam benéficos ou maléficos, a não ser aqueles relatados sobre a resposta imune intestinal (ZHANG e TIZZARD, 1996; ROSS et al., 2002).

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre a adição de β -mananase na dieta e o desafio entérico sobre a população de linfócitos T CD8 ativados circulantes das aves na 1ª semana pós-desafio quanto aos 42 dias de idade (Tabela 5). Pode ser observado que, uma semana após o desafio, as aves que consumiram dietas controle e foram desafiadas apresentaram maior proporção de populações de linfócitos T CD8 ativados quando comparada com a resposta aos demais tratamentos. Já aos 42 dias, a resposta foi oposta, menor proporção no tratamento controle e desafiado em relação aos demais.

Aos 42 dias de idade, observou-se efeito do desafio independente da utilização de enzima para a população de linfócitos T CD8 de mucosa. Houve maior ($p < 0,05$) proporção de linfócitos T CD8 de mucosa no sangue periférico de aves desafiadas em relação às aves não desafiadas. Entretanto, o efeito sobre a população de linfócitos CD4 gerais foi influenciado ($p < 0,05$) pela interação da adição

de enzima e pelo desafio com *Eimeria* sp. Desdobrando a interação, é possível afirmar que aves não desafiadas e suplementadas com a enzima apresentam maiores proporções dessa população celular em relação ao grupo que não recebeu enzima. Por outro lado, quando as aves foram desafiadas, a suplementação da enzima nas dietas não altera a proporção de linfócitos T CD4 gerais.

Em animais adultos, a imunidade contra *Eimeria* sp. é dependente de células CD4+ (SMITH e BEAL, 2008). Assim, uma proporção reduzida de CD4 pode indicar falta de estímulos exógenos.

A falta de influência da infecção por *Eimeria* sp. sobre o sistema imune pode ser atribuída provavelmente devido à fase da infecção em que as mensurações foram feitas (7 dias após inoculação), quando a resposta deveria estar em período de transição de uma quantidade reduzida para uma quantidade elevada de linfócitos circulantes (BEIRÃO, 2011).

Em surtos de coccidiose ocorre perturbação da microbiota intestinal normal ou da integridade do epitélio intestinal reduzindo os mecanismos de proteção inatos e pode também, aumentar a potencialidade dos patógenos de se ligarem e colonizarem o epitélio intestinal (BURKHOLDER et al., 2008). Neste sentido, era esperado uma resposta mais marcante em relação a um padrão comum a todas as células. Provavelmente, a julgar pelos dados de desempenho produtivo, o desafio não significou uma perturbação a ponto de ativar uma resposta imune mais consistente.

Além disso, esperava-se uma maior proporção de linfócitos T CD4 de mucosa, que é destinada à proteção de mucosa logo que um agressor seja reconhecido, o que é de extrema importância no estabelecimento e desenvolvimento da resposta imunológica, visando uma resposta efetiva (atenuação e eliminação do patógeno) e mais rápida, visto a importância da imunidade mediada por células nas infecções por Eimerias (LILLEHOJ e LILLEHOJ, 2000).

No caso da infecção com espécies de *Eimeria* sp., o sistema imunológico das aves é induzido a responder de forma diversificada, principalmente, devido ao complexo ciclo de vida do parasita. Coccídeos em diferentes fases de seu ciclo de vida colonizam o hospedeiro ao mesmo tempo. Assim, a resposta do hospedeiro à invasão das células intestinais envolve vários mecanismos do sistema imunológico, principalmente, aqueles relacionados aos GALT, os quais contêm linfócitos T e B,

responsáveis pela imunidade adquirida pelo hospedeiro à coccidiose aviária (KAWAZOE, 2009).

Tabela 515. Populações de linfócitos T circulantes de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de *Eimeria* sp

		CD8 de mucosa	CD4 de mucosa	CD4 gerais	CD4 não ativados	CD8 não ativados	CD8 ativados	Monócitos
		21 dias de idade						
Enzima	Desafio							
Sem enzima	Sem desafio	5,18	10,04	2,75	14,51	4,17	1,18 ^b	6,35
Sem enzima	Com desafio	5,12	12,68	4,10	15,12	3,51	2,67 ^a	5,14
Com enzima	Sem desafio	4,76	9,80	3,23	11,72	3,62	1,59 ^b	5,64
Com enzima	Com desafio	3,79	9,95	3,13	13,66	2,35	1,41 ^b	5,56
Enzima								
Sem enzima		4,27	9,87	3,18	12,69	2,99	1,50	5,35
Com enzima		5,15	11,36	3,43	14,81	3,84	1,93	5,97
	Desafio							
	Sem desafio	4,45	11,31	3,62	14,39	2,93	2,04 ^a	5,60
	Com desafio	4,97	9,92	2,99	13,11	3,89	1,38 ^b	5,70
CV, %		39,85	38,17	36,06	34,26	44,65	49,95	26,94
Enzima		0,19	0,30	0,55	0,21	0,12	0,16	0,26
Desafio		0,44	0,33	0,14	0,44	0,08	0,03	0,81
Enzima x Eimeria		0,49	0,39	0,09	0,69	0,57	0,009	0,30
		42 dias de idade						
Enzima	Desafio							
Sem enzima	Sem desafio	4,28	8,91	2,98 ^b	16,35	3,68	2,49 ^a	11,72
Sem enzima	Com desafio	2,78	8,26	4,20 ^{ab}	15,19	3,41	0,87 ^c	9,49
Com enzima	Sem desafio	4,44	12,64	4,96 ^a	13,70	2,30	1,40 ^{bc}	8,00
Com enzima	Com desafio	2,62	8,46	3,47 ^b	11,92	3,99	1,97 ^{ab}	9,39
Enzima								
Sem enzima		3,53	10,55	4,22	12,81	3,14	1,68	9,44
Com enzima		3,53	8,59	3,59	15,77	3,54	1,68	9,86
	Desafio							
	Sem desafio	2,70 ^b	8,36	3,83	13,56	3,70	1,42	8,70
	Com desafio	4,36 ^a	10,78	3,97	15,02	2,99	1,95	10,61
CV, %		46,97	40,22	35,68	34,46	47,07	51,17	40,83
Enzima		0,99	0,16	0,21	0,09	0,47	0,99	0,76
Desafio		0,008	0,08	0,78	0,40	0,21	0,09	0,18
Enzima x Eimeria		0,78	0,20	0,01	0,85	0,09	0,001	0,20

Da mesma forma, era esperado uma melhor resposta imune quando a β -mananase foi adicionada às dietas. Alguns pesquisadores já demonstraram que os β -mananos atravessam a mucosa intestinal e potencializam a estimulação do sistema imune inato, aumentando a proliferação de macrófagos e monócitos e resultando na produção de citocina (ZHANG e TIZZARD, 1996; ROSS et al., 2002). Além disso, é esperado que com a utilização da β -mananase ocorra degradação dos β -mananos e, com isso, redução do peso molecular e do impacto sobre o sistema imunológico (JACKSON et al., 2003).

Não houve alteração nos pesos relativos dos órgãos linfóides de aves suplementadas com β -mananase ou desafiadas com oocisto de *Eimeria* sp., aos 21 dias ou 42 dias (Tabela 6). A falta de efeito reflete a falta de estímulo para o recrutamento de células do sistema imune para defesa contra a infecção experimental de coccidiose. Da mesma forma, também não foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre a morfometria dos órgãos linfóides aos 21 dias (Tabela 7).

Entretanto, aos 42 dias de idade, observou-se efeito ($p < 0,05$) do desafio sobre a área da bolsa cloacal. Aves desafiadas responderam aumentando a área da bolsa cloacal. Houve interação ($p < 0,05$) entre a enzima e o desafio para o diâmetro transversal do baço. Pode ser observado que as aves que consumiram dietas controle e foram desafiadas apresentaram menor diâmetro do baço quando comparado com a resposta aos demais tratamentos. Este resultado é semelhante ao observado para as populações de linfócitos CD8 ativados.

Tabela 6. Pesos relativos da bolsa cloacal, timo e baço de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de *Eimeria* sp

		Bolsa cloacal	Timo	Baço
21 dias				
Enzima	Desafio	%	%	%
Sem enzima	Sem desafio	0,26	0,14	0,09
Sem enzima	Com desafio	0,24	0,13	0,09
Com enzima	Sem desafio	0,26	0,14	0,11
Com enzima	Com desafio	0,23	0,14	0,10
Enzima				
Sem enzima		0,24	0,13	0,09
Com enzima		0,25	0,14	0,09
Desafio				
	Sem desafio	0,25	0,14	0,09
	Com desafio	0,24	0,13	0,09
CV, %		20,18	22,25	15,28
Enzima		0,7038	0,6423	0,9964
Desafio		0,4837	0,7730	0,8021
Enzima x desafio		0,5646	0,6677	0,4123
42 dias				
Sem enzima	Sem desafio	0,17	0,12	0,10
Sem enzima	Com desafio	0,21	0,11	0,11
Com enzima	Sem desafio	0,20	0,10	0,09
Com enzima	Com desafio	0,21	0,13	0,10
Enzima				
Sem enzima		0,21	0,09	0,12
Com enzima		0,20	0,10	0,11
Desafio				
	Sem desafio	0,20	0,10	0,11
	Com desafio	0,21	0,10	0,12
CV, %		23,51	28,52	23,65
Enzima		0,9117	0,3468	0,5731
Desafio		0,5832	0,9972	0,4406
Enzima x desafio		0,9003	0,1244	0,2531

Tabela 716. Medidas morfométricas da bolsa cloacal, timo e baço de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de *Eimeria* sp

Enzima	Desafio	Bolsa cloacal		Timo		Baço		
		Área, mm ²	D, mm	Área, mm ²	D, mm	Área, mm ²	DT, mm	DL, mm
21 dias								
Sem enzima	Sem desafio	129,96	12,65	63,79	8,94	31,71	3,84	9,15
Sem enzima	Com desafio	135,58	13,05	62,67	8,74	33,45	3,60	9,52
Com enzima	Sem desafio	123,15	12,33	67,97	9,00	36,88	3,77	10,30
Com enzima	Com desafio	133,03	12,89	65,22	9,00	31,58	4,04	9,29
Enzima								
Sem enzima		132,77	12,85	63,23	8,84	32,58	3,72	9,30
Com enzima		128,54	12,63	66,47	8,99	33,99	3,93	9,75
Desafio								
	Sem desafio	126,86	12,50	65,53	8,96	33,86	3,81	9,62
	Com desafio	134,35	12,97	63,84	8,85	32,57	3,82	9,39
CV, %		17,42	9,11	19,27	10,97	16,84	10,96	12,35
Enzima		0,6295	0,6244	0,5112	0,6904	0,4728	0,3135	0,3661
Desafio		0,4264	0,3339	0,7038	0,7908	0,4399	0,9331	0,5339
Enzima x desafio		0,8255	0,8680	0,8733	0,8114	0,1341	0,1757	0,1812
42 dias								
Sem enzima	Sem desafio	181,38	16,39	141,43	13,86	58,71	5,28 ^a	12,34
Sem enzima	Com desafio	265,20	18,04	163,17	14,02	50,48	4,64 ^b	12,05
Com enzima	Sem desafio	230,49	16,91	143,13	13,38	50,87	4,81 ^a	12,89
Com enzima	Com desafio	277,56	18,28	160,89	13,99	60,03	5,57 ^a	12,81
Enzima								
Sem enzima		223,29	17,35	152,30	13,94	54,32	4,93	12,19
Com enzima		252,46	17,54	152,01	13,68	55,44	5,19	12,85
Desafio								
	Sem desafio	207,57 ^b	16,71	142,28	13,62	54,53	5,03	12,61
	Com desafio	271,38 ^a	18,16	162,03	14,01	55,25	5,10	12,43
CV, %		31,38	13,85	23,21	10,23	29,14	15,60	23,49
Enzima		0,2800	0,6924	0,9816	0,6114	0,8833	0,4193	0,5317
Desafio		0,0269	0,1239	0,1250	0,4455	0,9366	0,8422	0,8639
Enzima x desafio		0,5152	0,8871	0,8747	0,6535	0,1425	0,0194	0,9203

D: diâmetro; DT: diâmetro transversal; DL: diâmetro longitudinal

O estudo da morfometria intestinal uma semana após o desafio mostrou alterações na estrutura da mucosa do jejuno (Tabela 8) Houve uma maior ($p < 0,05$) profundidade da cripta, menor relação vilos:cripta e um maior número de células calciformes ao longo dos vilos das aves desafiadas em relação ao grupo controle. Apesar disso não ter se refletido em pior desempenho produtivo ou resposta imune, o desafio com oocistos de *Eimeria* sp resultou em perturbação da proliferação celular na mucosa intestinal.

Em resposta a uma agressão ocorre um processo denominado de restituição, que é mediado por células epiteliais que revestem a margem da zona epitelial danificada. Estas células têm como função migrar e revestir a área danificada, de modo a restaurar rapidamente a integridade da camada epitelial. Em seguida, a cripta alonga-se para permitir o aumento da proliferação da população de

células progenitoras. Essa resposta de "cripta intestinal", segundo Okamoto (2011) permite que o tecido epitelial restaure o número de células epiteliais para reconstruir sua estrutura.

Já aos 42 dias, o desafio ao qual as aves foram submetidas aos 14 dias de idade, resultou em maior relação vilos:cripta, que pode ser o reflexo do aumento da profundidade da cripta observado aos 21 dias. Confirmando ainda esta hipótese, a contagem de células caliciformes foi menor ($p < 0,05$) para as aves desafiadas em relação às demais. Ou seja, o aumento da profundidade de cripta logo após a infecção visa a rápida regeneração e a proliferação de células caliciformes produtoras de muco. Com a depleção da infecção, é necessária a proliferação de novas células absortivas para manter as inúmeras atividades funcionais da mucosa intestinal, para reposição do pool de células utilizadas. Assim, as células progenitoras localizadas na base da cripta se diferenciaram em enterócitos em detrimento às células caliciformes, já que não há mais invasores presentes. Células caliciformes são responsáveis pela produção de mucina, as quais ligam os microorganismos patogênicos e reduzem sua colonização na mucosa intestinal (BLOMBERG et al., 1993).

Em condições experimentais, esse "ganho compensatório" pode ser observado, entretanto, em condições de criação comercial, os desafios ambientais, imunológicos e de manejo são mais intensos e frequentes permitindo que após um episódio, como de coccidiose, alguns agentes patogênicos oportunamente se estabeleçam e gerem enfermidades gastrintestinais determinando perdas econômicas importantes.

Em relação à suplementação com a β -mananase, as aves suplementadas apresentaram uma menor profundidade de cripta ($p < 0,05$), o que resultou na melhor relação vilos:cripta. Profundidades de cripta são também medidas de proliferação celular e criptas menos profundas indicam melhor estado de saúde intestinal, o que está relacionado, entre outros fatores, com a magnitude da zona de extrusão das vilosidades e o grau de antigenicidade dos componentes da ração (Hancock et al., 1990). Esse resultado é interessante, uma vez que os efeitos das enzimas exógenas são poucos perceptíveis na morfometria do trato digestório, pelo fato de sua ação ocorrer no conteúdo intestinal, agindo na degradação principalmente dos polissacarídeos não amiláceos (YU e CHUNG, 2004).

Tabela 8. Medidas morfométricas da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com β -mananase e desafiados ou não com oocistos de *Eimeria* sp

Enzima	Desafio	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	Área, μm^2	CC
Sem enzima	Sem desafio	668,50	167,60	74,09	36,58	9,21	11,24	10,66
Sem enzima	Com desafio	671,90	162,51	102,27	39,82	6,65	11,57	13,36
Com enzima	Sem desafio	669,69	156,38	85,10	34,22	8,05	12,21	10,05
Com enzima	Com desafio	646,65	167,57	100,66	41,03	6,48	10,50	13,11
Enzima								
Sem enzima		670,20	165,05	88,18	38,20	7,93	10,97	12,10
Com enzima		658,17	161,98	92,88	37,62	7,26	10,95	11,48
Desafio								
	Sem desafio	669,10	161,99	79,59 ^b	35,40	8,63 ^a	11,34	10,34 ^b
	Com desafio	659,27	165,04	101,47 ^a	40,42	6,57 ^b	10,58	13,24 ^a
CV, %		13,83	27,90	15,26	16,09	18,30	18,18	31,94
Enzima		0,7139	0,8500	0,3442	0,7926	0,1842	0,9697	0,7575
Desafio		0,7646	0,8511	0,0001	0,0272	0,0002	0,3015	0,0468
Enzima x desafio		0,6872	0,6180	0,2072	0,4168	0,3233	0,7969	0,8970
42 dias								
Sem enzima	Sem desafio	923,10	139,05	127,79	36,80	7,23	17,62	15,03
Sem enzima	Com desafio	977,91	168,30	114,00	32,88	9,24	17,30	7,97
Com enzima	Sem desafio	868,98	123,27	94,95	32,61	9,34	18,40	10,83
Com enzima	Com desafio	951,30	145,32	88,44	35,29	11,06	18,39	8,88
Enzima								
Sem enzima		950,50	153,68	120,89 ^b	34,84	8,23 ^b	17,46	9,22
Com enzima		910,14	134,30	91,70 ^a	33,95	10,20 ^a	18,39	9,72
Desafio								
	Sem desafio	896,04	131,16	111,37	34,71	8,28 ^b	18,01	10,85 ^b
	Com desafio	964,61	156,81	101,22	34,08	10,15 ^a	17,84	8,43 ^a
CV, %		14,24	32,04	23,44	13,62	19,93	27,22	22,39
Enzima		0,3963	0,2448	0,0025	0,5953	0,0052	0,5934	0,6027
Desafio		0,1544	0,1270	0,2591	0,7088	0,0076	0,9242	0,0062
Enzima x desafio		0,7712	0,8269	0,6826	0,0562	0,8287	0,9293	0,5545

CV: comprimento de vilos; LV: largura de vilos; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C: relação vilos:cripta; CC: células calcificiformes.

Com a finalidade de determinar os efeitos da suplementação de dietas com β -mananase para frangos de corte desafiados com oocistos de *Eimeria* sp. sobre a microbiota do intestino delgado e do ceco, 96 bibliotecas foram analisadas e 158.646 sequências de boa qualidade foram obtidas. Com o objetivo de comparar o tamanho e a composição microbiana entre os diferentes tratamentos, número de unidades taxonômicas ou espécies (OTUs), Chao index e Shannon index foram analisados, respectivamente, baseando-se na distribuição dos fragmentos terminais para cada amostra (Figura 1).

Analisando-se o tamanho e a estrutura da comunidade microbiana aos 21 dias de idade, o desafio com *Eimeria* sp. diminuiu o número de OTUs ($p < 0,05$) e diminuiu a diversidade (índice de Chao; $p < 0,05$) no ceco, em comparação com as aves do tratamento controle. Entretanto, observou-se que no intestino delgado o desafio apenas diminuiu ($p < 0,05$) a diversidade, sem afetar o número de OTUs.

Independente da presença da *Eimeria* sp., a enzima aumentou ($p < 0,05$) o número de OTUs e a diversidade no intestino delgado, em comparação com o tratamento controle, sendo que no ceco apenas aumentou ($p < 0,05$) a diversidade.

Aos 42 dias de idade, ou seja, 4 semanas após o desafio, o tratamento com aves desafiadas e não suplementadas com enzima, houve aumento do número de OTUs ($p < 0,05$) e menor diversidade no ceco ($p < 0,05$) em relação as aves do grupo controle; no intestino delgado, entretanto, menor número de OTUs ($p < 0,05$) foi observado. A suplementação de enzima diminuiu o número de OTUs ($p < 0,05$) apenas no intestino delgado, sendo que a diversidade diminuiu ($p < 0,05$) em ambos os segmentos em comparação ao tratamento controle.

Na análise da distribuição dos filos de bactérias encontradas nos cecos das aves aos 21 dias de idade, independente do tratamento, observou-se maior frequência dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Figuras 2 e 3). Quando as aves foram suplementadas com enzima, houve aumento na frequência de *Proteobacteria*, filo que abriga algumas espécies potencialmente patogênicas. Um aspecto importante a ser notado, foi que no tratamento em que as aves foram desafiadas e não suplementadas, houve aumento de bactérias do filo *Bacteroidetes*. Estudos mostram que humanos que perdem peso possuem mais *Bacteroidetes* e menos *Firmicutes*, enquanto que em roedores obesos ocorre o oposto (LEY et al., 2006).

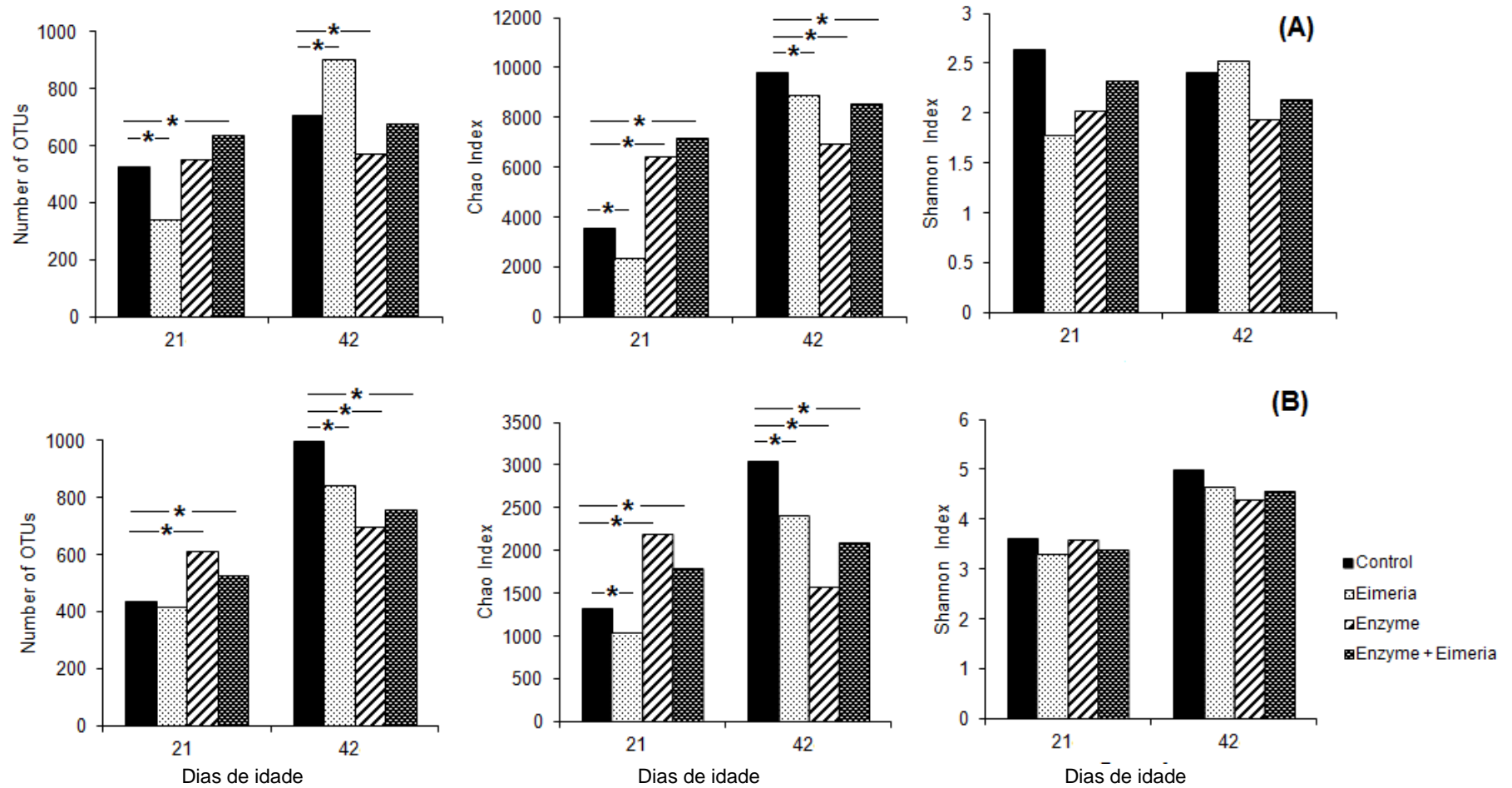


Figura 4. Número de 16S rDNA OTUs (97% similaridade) e índices de diversidade observados em amostras coletadas do ceco (A) e intestino delgado (B) de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiados com oocistos de *Eimeria* sp.

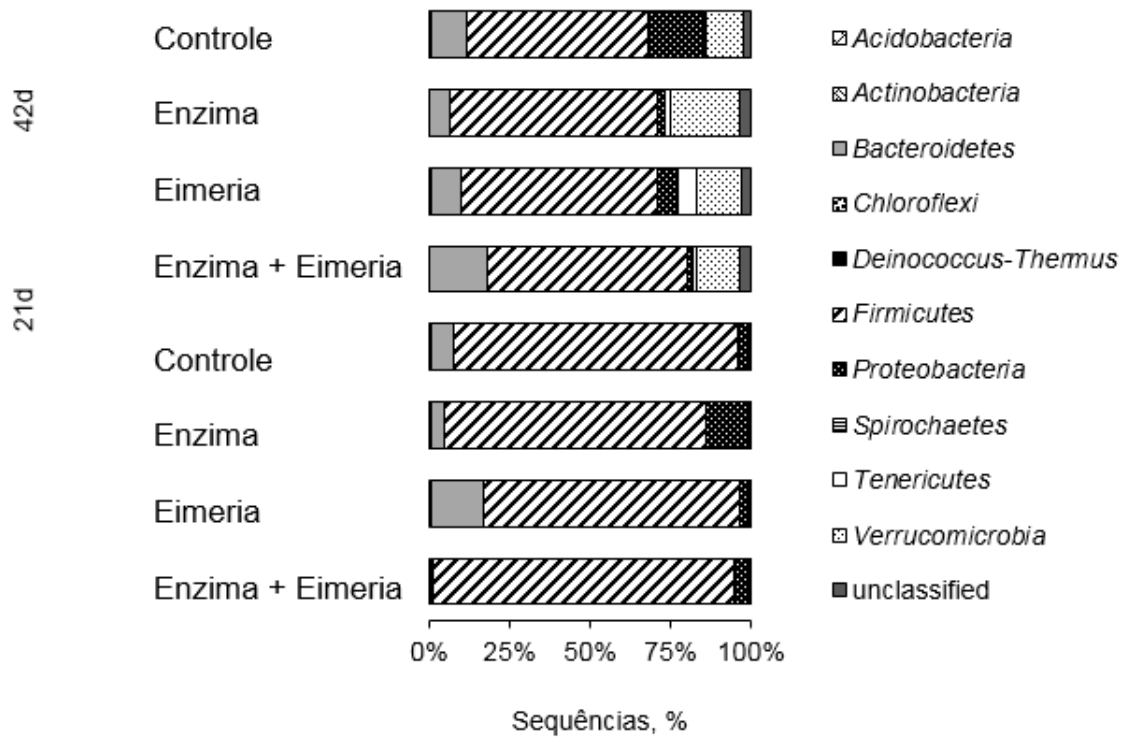


Figura 5. Distribuição dos filios de bactérias observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de ceco coletados de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiadas com *Eimeria* sp.

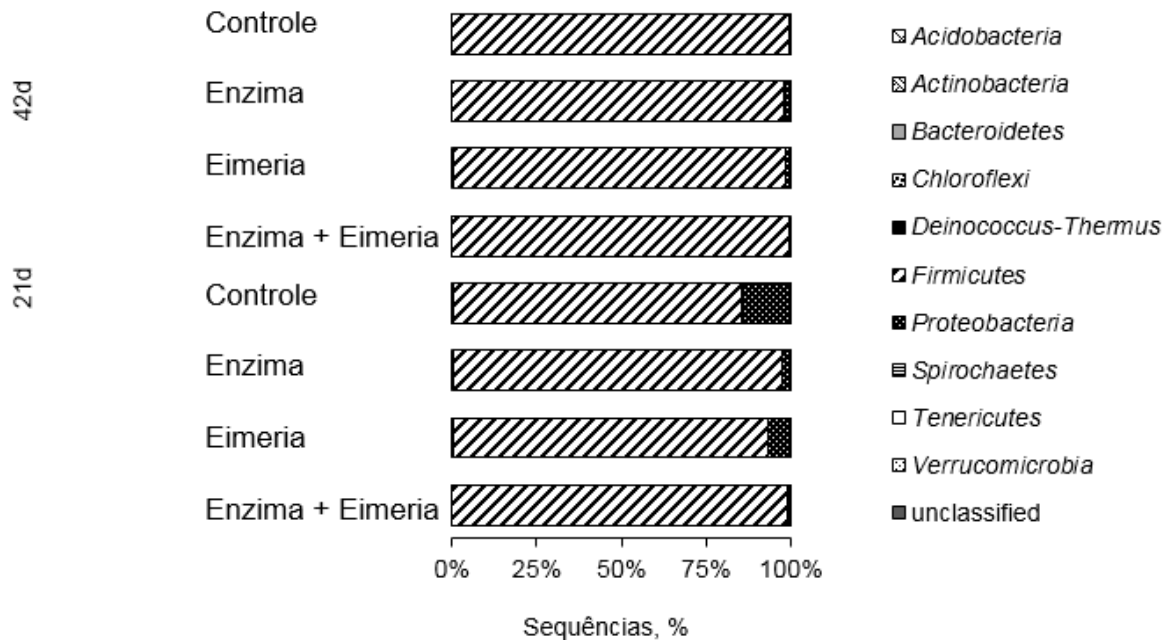


Figura 3. Distribuição dos filios de bactérias observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de intestino delgado coletados de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiadas com *Eimeria* sp.

Com relação ao intestino delgado, observou-se menor diversidade de filos em comparação ao ceco, com predominância de *Firmicutes* e *Proteobacteria*, com maior presença de *Proteobacteria* aos 21 dias de idade (Figura 3).

O gênero *Bacteroides* foi apenas detectado no ceco das aves (Figura 4). Aos 21 dias de idade, observou-se maior proporção nas aves desafiadas com *Eimeria* sp., o que está de acordo com Bortoluzzi et al. (2015), em que os autores, utilizando a mesma metodologia, detectaram *Bacteroides* apenas nesta seção do intestino, e em maior quantidade em aves desafiadas com *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*. Entretanto, um fato interessante de ser notado, foi que este gênero aumentou significativamente aos 42 dias de idade nas aves desafiadas e suplementadas com enzima, em comparação aos 21 dias de idade.

Já no intestino delgado aos 21 dias de idade (Figura 5) observou-se uma diversidade menor em comparação com o ceco (Figura 4), e maior em comparação ao intestino delgado aos 42 dias de idade, sendo possível estabelecer uma relação entre o desafio e maior desequilíbrio microbiano no intestino delgado, com posterior restabelecimento do equilíbrio microbiano.

É importante destacar, que quando as aves foram suplementadas com a enzima, independentemente da presença do desafio, houve maior proliferação de *Lactobacillus* no intestino delgado aos 21 dias de idade (Figura 5), em comparação ao grupo controle e ao desafiado sem suplementação, o que poderia justificar a piora no ganho de peso das aves suplementadas com enzima aos 21 dias de idade. Estes resultados estão de acordo aos encontrados por Peinado et al. (2013), em que os autores atribuíram a melhora no desempenho de frangos, a diminuição de *Lactobacillus*. Neste sentido, a suplementação da dieta com enzima desde o 1º dia de vida das aves pode contribuir com essa estabilidade mesmo em situações de desafio. Aos 42 dias, é interessante observar o equilíbrio entre as bactérias que compõem o microbioma, independente da suplementação de enzima ou do desafio ocorrido há 4 semanas. Talvez, em situações de altos desafios sanitários ambientais e de manejo, este adequado equilíbrio microbiano não seja observado.

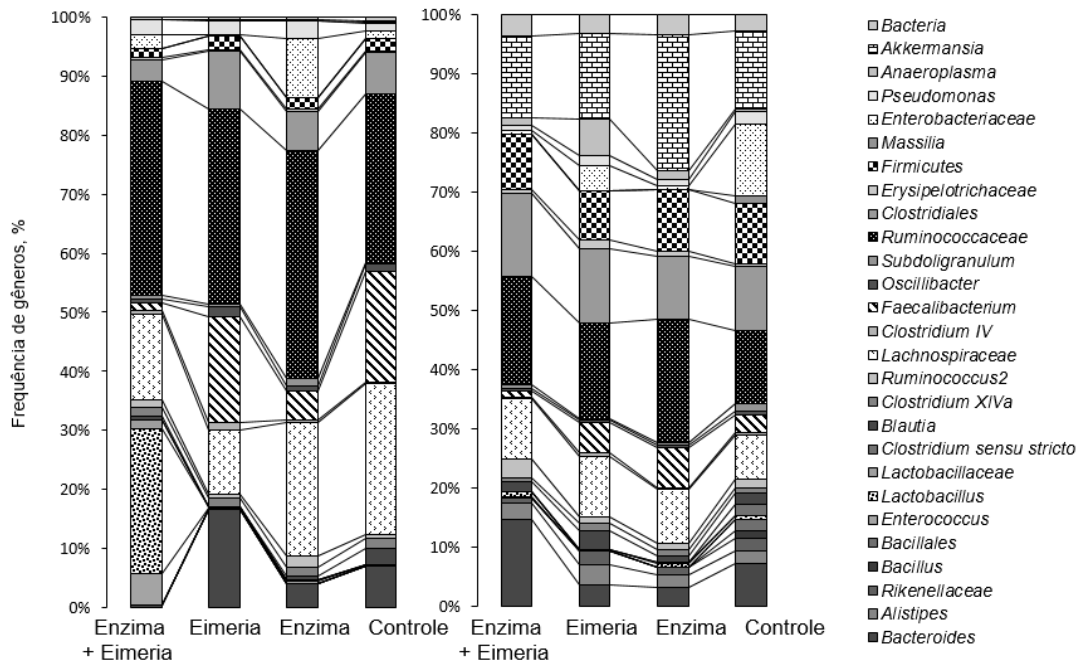


Figura 4. Distribuição dos principais gêneros de bactérias observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de ceco coletados de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiados com *Eimeria* sp.

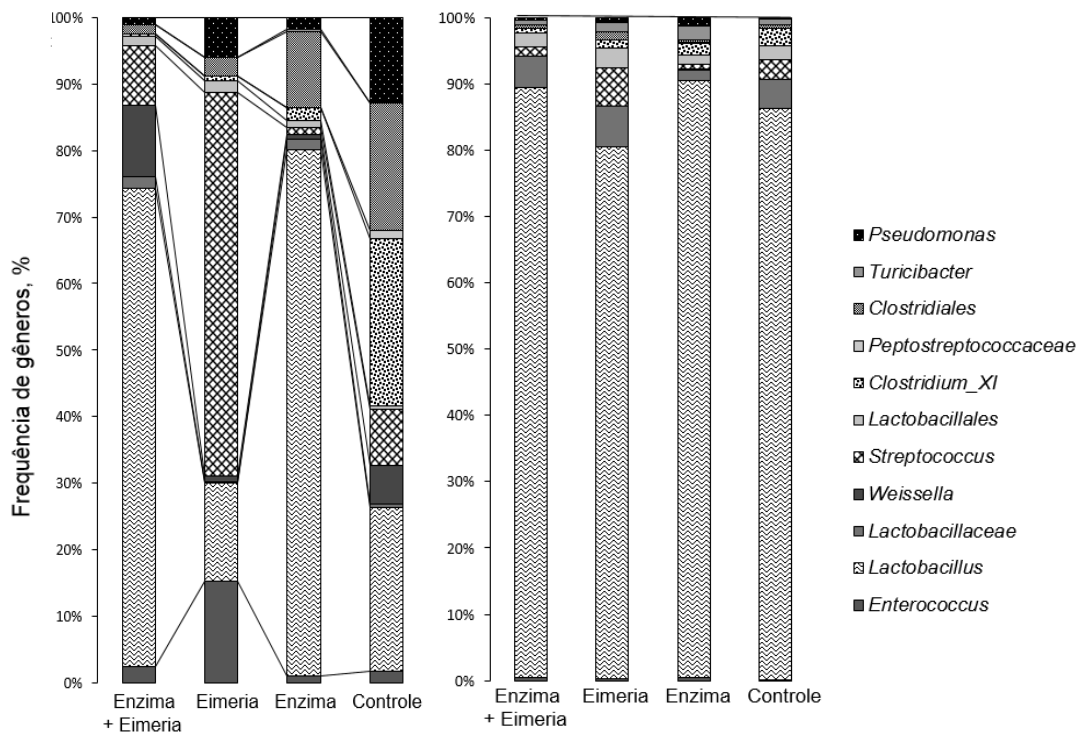


Figura 5. Distribuição dos principais gêneros de bactérias na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras de intestino delgado de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas contendo β -mananase e desafiados com *Eimeria* sp.

O diagrama de Venn demonstra claramente o agrupamento de bandas (espécies) que podem ser comuns ou exclusivas de cada tratamento (Figura 6). Números nos círculos e nas interseções indicam números de bandas comuns e bandas exclusivas, respectivamente. Na avaliação das comunidades microbianas, pode-se observar 130 espécies bacterianas (ou unidades taxonômicas operacionais), presentes em todos os tratamentos, no ceco (A) e 23 no intestino delgado (C) uma semana pós-infecção, enquanto que aos 42 dias, observa-se 250 espécies comuns a todos os tratamentos no ceco (B) e 25 no intestino delgado (D).

A análise de componentes principais (ACP) permitiu redimensionar o espaço das informações originais em um novo espaço formado por duas variáveis latentes denominadas de componentes principais (CP1 e CP2), criadas por combinações lineares das variáveis originais na região que deteve a maior concentração da variância original (Figura 6). Essas duas novas variáveis, colocadas ortogonalmente, geraram uma distribuição bidimensional das variáveis, conforme se observa na Figura 7. A análise “*biplo*t”, aplicada aos componentes principais, explicou apenas 57,79% (CP 1 = 36,50% e CP 2 = 21,29%) da variabilidade total observada na avaliação da microbiota intestinal de aves suplementadas com enzima e submetidas ao desafio com *Eimeria* sp. A estrutura das comunidades microbianas é diferente e sofre variações em função do segmento amostrado e da idade das aves.

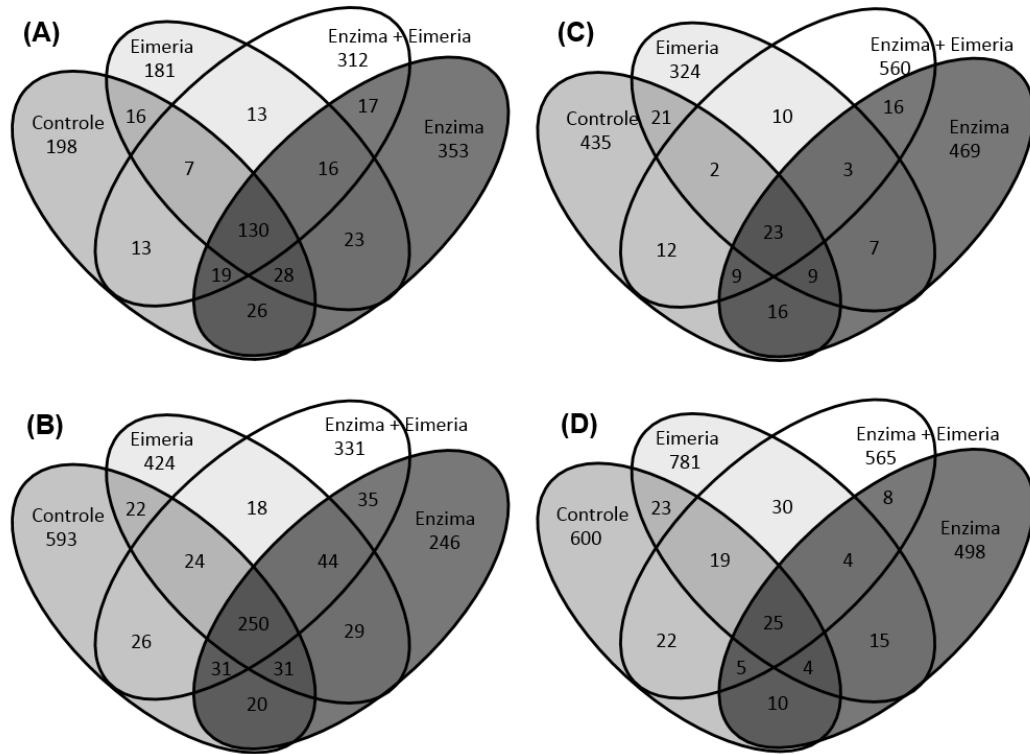


Figura 6. O diagrama de Venn mostra quais são as espécies comuns e exclusivas observadas entre amostras do ceco (A - B) e intestino delgado (C - D) coletadas de frangos aos 21 dias de idade (A - C) e 42 dias de idade (B - D)

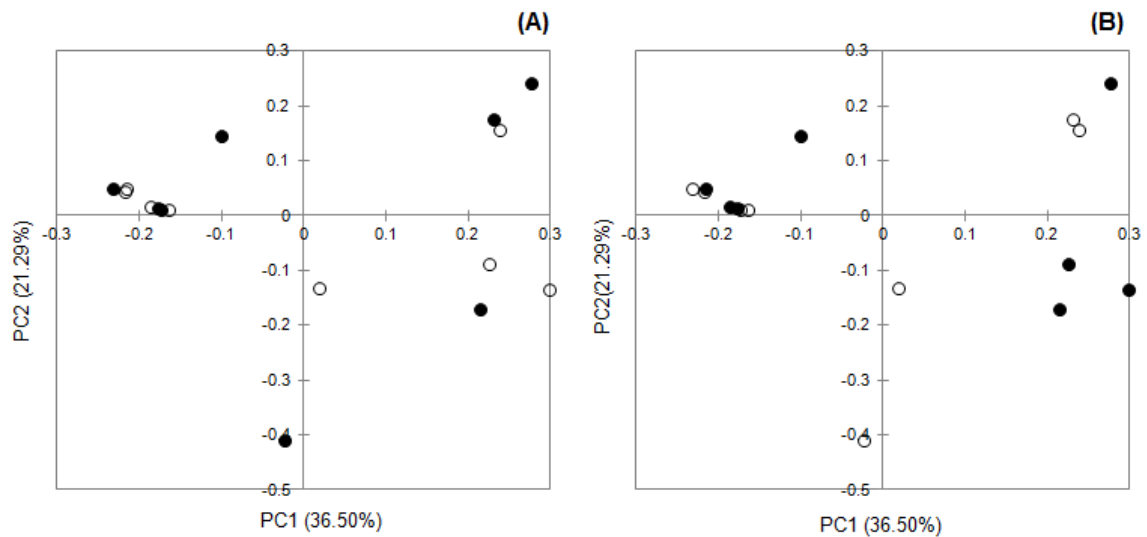


Figura 7. Análise do componente principal (ACP) de amostras do intestino mostra a presença (painel A, pontos negros) e ausência (painel A, pontos brancos) de *Eimeria* sp., e a presença (painel B, pontos negros) ou ausência (painel B, pontos brancos) da enzima em dietas para frangos de corte. Os dois componentes principais capturaram 36,50% (ACP1) e 21,29% (ACP2) de variância, respectivamente.

Nas Figuras 8 e 9, é possível observar as 3 principais espécies bacterianas responsáveis por alterações na comunidade microbiana, com relação a presença ou ausência de *Eimeria* (Figura 8) e suplementação ou não de enzima (Figura 9).

A inoculação com *Eimeria* sp. aumentou o *Streptococcus pasteurians* e diminuiu o *Candidatus arthomitis* e o *Romboutsia ilealis* no intestino delgado. No ceco, a inoculação com *Eimeria* sp. aumentou *Granulicatella adiacens* e diminuiu *Ruminococcus albus* e *Intestinimonas butyriciproducens* (Figura 8). Tanto a diminuição da espécie *Candidatus arthomitis* quanto do *Intestinimonas butyriciproducens* traz prejuízos ao hospedeiro, uma vez que estas espécies estão associadas a imunidade intestinal e a produção de butirato (importante substrato para a multiplicação celular e diferenciação de enterócitos), respectivamente.

Por outro lado, a suplementação de enzima diminuiu a presença do gênero *Streptococcus pasteurians* e *Romboutsia ilealis* e aumentou os *Lactobacillus reuteri* no intestino delgado das aves. No ceco, observou-se que a suplementação da enzima aumentou *Anaerobacterium chartisolvense* e *Alistipes onderdonkii* e diminuiu *Intestinimonas butyriciproducens* (Figura 09).

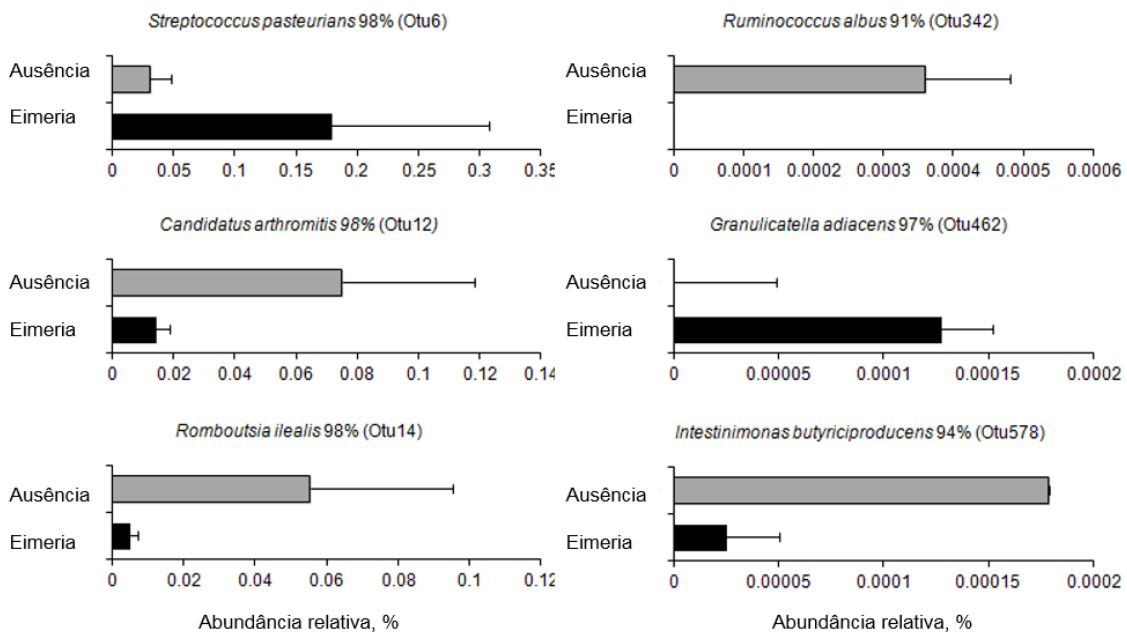


Figura 8. As 3 principais espécies bacterianas responsáveis por modificações na microbiota do intestino delgado (Otu6, Otu12, e Otu14) e cecal (Otu342, Otu462, and Out 578) microbiota de frangos de corte inoculados com *Eimeria* sp. em comparação com o grupo não inoculado.

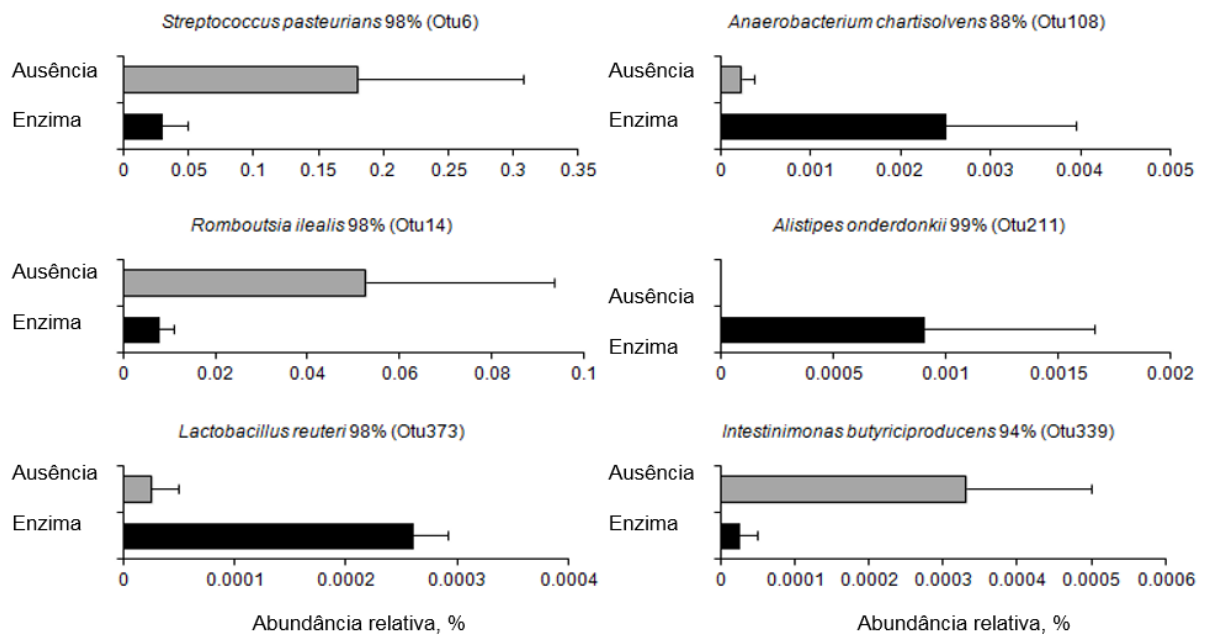


Figura 9. As 3 principais espécies bacterianas responsáveis por modificações na microbiota do intestino delgado (Otu6, Otu14, e Otu373) e cecal (Otu108, Otu211, e Otu339) de frangos de corte suplementados com a enzima em comparação com o grupo não suplementado

A melhor compreensão sobre a interação entre os compostos vegetais não-digeríveis, seus metabólitos intestinais, a microbiota intestinal e o hospedeiro abrirá novas possibilidades de produzir novos aditivos nutricionalmente otimizados que promovem a saúde do hospedeiro, através da manipulação da comunidade microbiana do intestino.

Conclusão

A suplementação das dietas com β -mananase não melhorou o desempenho produtivo dos frangos de corte independente do desafio experimental ao qual os frangos de corte foram submetidos.

Na semana após o desafio, as aves que consumiram dietas controle e foram desafiadas apresentaram maior proporção de populações de linfócitos T CD8 ativadas. Aos 42 dias de idade, aves não desafiadas e suplementadas com a enzima apresentam maiores proporções de CD4 gerais em relação ao grupo que não recebeu enzima.

Aos 21 dias observou-se maior profundidade de cripta, menor relação vilosidade:cripta e maior número de células caliciformes nas aves desafiadas e aos 42 dias,

as aves desafiadas apresentaram maior relação vilo:cripta, menor número de células calciformes. Já, as aves que receberam a suplementação enzimática apresentaram uma menor profundidade de cripta, o que resultou na melhor relação vilo:cripta.

Independente da presença da *Eimeria* sp., a suplementação de β -mananase aumentou o número de espécies e a diversidade no intestino delgado e apenas aumentou a diversidade no ceco aos 21 dias.

A estrutura das comunidades microbianas é diferente e sofre variações em função do segmento amostrado e da idade das aves.

Referências

ABDELRAHMAN, W.; MOHNL, M.; TEICHMANN, K.; DOUPOVEC, B.; SCHATZMAYR, G.; LUMPKINS, B.; MATHIS, G. Comparative evaluation of probiotic and salinomycin effects on performance and coccidiosis control in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p. 3002-3008, 2014.

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

ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. IN: **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Ed. Rocca Ltda, 2007, p. 41-51.

APAJALAHTI, J.H.A.; SARKILAHTI, L.K.; HEIKKINEN, J.P.; NYRMINEN, P.H.; HOLBEN, W.E. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanosine-plus-cytosine based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 64, n. 10, p. 4084-4088, 1998.

ASMARE, B.; MEKURIAW, Y. Exogenous enzymes in nutrient digestion and health of non-ruminant: carbohydrases enzyme **Research Journal of Agriculture and Environmental Management**, v. 3, n. 12, p. 605-611, 2014.

BÄCKHED, F.; FRASER, C.M.; RINGEL, Y.; SANDERS, M.E.; SARTOR, R.B., SHERMAN, P.M.; VERSALOVIC, J.; YOUNG, V.; FINLAY, B.B. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 5, p. 611-622, 2012.

BEDFORD, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. **Animal Feed Science and Technology**. v.86, p.1-13, 2000.

BEIRÃO, B.C.B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BLOMBERG, L.; KRIVAN, H.C.; COHEN, P.S.; CONWAY, P.L. Piglet ileal mucus contains protein and glycolipid (*Galactosylceramide*) receptors specific for *Escherichia coli* K88 Fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 6, p.2526-2531, 1993.

BORTOLUZZI, C.; MENTEN, J.F.M.; PEREIRA, R.; FAGUNDES, N.S.; NAPT, G.S.; PEDROSO, A.A.; BIGATON, A.D.; ANDREOTE, F.D. Hops β -acids and zinc bacitracin affect the performance and intestinal microbiota of broilers challenged with *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 207, p. 181-189, 2015.

BULKHOLDER, K.M.; THOMPSON, K.L.; EINSTEIN, M.E.; APPLGATE, T.J.; PATTERSON, J.A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. **Poultry Science**, v. 87, p. 1734-1741, 2008.

CENGIZ, O.; KOKSAL, B.H.; TATLI, O.; SEVIM, O.; AHSAN U.; UNER, A.G.; ULUTAS, P.A.; BEYAZ, D.; BUYUKYORUK, S.; YAKAN, A.; ONOL, A.G. Effect of dietary probiotic and high stocking density on the performance, carcass yield, gut microflora, and stress indicators of broilers. **Poultry Science**, v. 0, p. 1-9, 2015.

CERF-BENSUSSAN, N.; V. GABORIAU-ROUTHIAU. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 735–744, 2010.

CHAPMAN, H.D. Milestones in avian coccidiosis research: a review. **Poultry Science**, v. 93, p. 501-511, 2014.

CHEN, H.; LI-JUN, L.; JIAN-JUN, Z.; BO, X.; RUI, L. Chemical composition analysis of soybean oligosaccharides and its effects on ATPase activities in hyperlipidemic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 229-231, 2010.

CHO, K.C.; WHITE, P. J. Enzymatic analysis of β -glucan content in different oat genotypes. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 539-542, 1993.

CHOCT, M.; HUGHES, R.J.; BEDFORD, M.R. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. **British Poultry Science**, v. 40, p. 419-422, 1999.

CHOCT, M.; KOCHER, A.; WATERS, D.L.E; PETTERSON, D.; ROSS, G. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 53-61, 2004.

CHOCT M., DERSJANTLI Y., MCLEISH J., PEISKER M. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 23, p. 1386-1398, 2010.

COWIESON, A. J.; SINGH, D.N.; ADEOLA, O. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. 1. Growth performance and digestible nutrient intake. **British Poultry Science**, v. 47; p. 477-489, 2006.

COWIESON, A.J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 293-305, 2005.

DIERICK, N.A. Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: enzyme and fermentation. **Archive Animal Nutrition Berline**, v. 3, p. 241-246, 1989.

GONG, J., R. J. FORSTER, H. YU, J. R. CHAMBERS, P. M. SABOUR, R. WHEATCROFT, AND S. CHEN. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 208:1-7, 2002.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R.J.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; YANG, C.; HAN, Y. 16S rDNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 147-157, 2007.

GORDON, H.M.L.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.

HANCOCK, J.D.; PEO JR., LEWIS, A.J. Effects of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on morphology of pig intestine. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3244-3251, 1990.

JACKSON, M.E.; ANDERSON, D.M.; HSIAO, H.Y.; MATHIS, G.F.; FODGE, D.W. Beneficial effect of β -mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. **Avian Diseases**, v. 47, p. 759-763, 2003.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JUNIOR, SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Facta, 2009. p. 837-858.

KISIELINSKI, K., S. WILLIS, A. PRESCHER, B. KLOSTERHALFEN, AND V. SCHUMPELICK. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, p. 131-135, 2002.

KRABBE, E. Aplicação e pontos críticos no uso de enzimas. In: I CONGRESSO SOBRE ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2011, Campinas. **Anais ...** Campinas: IAC, 2011.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. **Avian Diseases**, v. 44, p. 408-425, 2000.

MACARI, M.; MENDES, A.A.; MENTEN, J.F.; NASS, I.A. Produção de frangos de corte. IN: MACARI, M.; LUNEDO R.; PEDROSO, A.A. Microbiota intestinal das aves. **Aves domésticas – produção de frangos de corte**. 2. ed. Campinas: Facta, 2014. p. 299-320.

MAYNARD, C.L., ELSON, C.O., HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231-241, 2012.

NIAN, F.; GUO, Y.M.; RU, Y.J.; LI, F.D.; PÉRON, A. Effect of exogenous xylanase supplementation on the performance, net energy and gut microflora of broiler chickens fed wheat-based diets. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 24, p. 400-406, 2011.

OLIVEIRA, M. C.; MORAES, V. M. B. Mananoligossacarídeos e enzimas em dietas à base de milho e farelo de soja para aves. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 339-357, 2007.

OKAMOTO, R. Epithelial regeneration in inflammatory bowel diseases **Inflammation and Regeneration**, v. 31, n. 3; p. 275-281, 2011.

PAULA, S.A. **Composição bioquímica e fatores antinutricionais de genótipos de soja**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2007.

PEINADO, M.J.; RUIZ, R.; ECHAVARRI, A.; ARANDA-OLMEDO, I.; RUBIO, L.A. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. **Animal feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 181, p. 87-92, 2013.

REMUS, J.C. Enzyme combinations to optimize byproducts use in corn-based poultry feed. 35 POULTRY NUTRITION CONFERENCE, 2008, Carolina do Norte. **Anais ... Carolina do Norte: Feed Industry Association**. North Carolina, 2008, p. 23-41.

ROSS, S.A.; DUNCAN, C.J.G.; PASCO, D.S.; PUGH, N. Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. **Journal of Agrochemical and Food Chemistry**, v. 50, p. 5.683-5.685, 2002.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2007.

SHIRMOHAMMAD, F.; MEHR, M. Effects of dietary supplementation of multi-enzyme complex on the energy utilization in rooster and performance of broiler chicks. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, pp. 9200-9206, 2011.

SMITH, A. L.; BEAL, R. K. In:DAVISON, T. F., KASPERS, B. AND SCHAT, K.A. . **Avian Immunology** Academic Press, 2008. 482.

STANLEY, D.; DENMAN, S. E.; HUGHES, R. J.; GEIER, M. S.; CROWLEY, T. M.; CHEN, H. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 96, p. 1361–1369, 2012.

WILLIAMS, R. B. Differences between the anticoccidial potencies of monensin in maize-based or wheat-based chicken diets. **Veterinary Research Communications**, v. 16, p. 147-152, 1992.

YU B.I.; CHUNG, T.K. Effects of multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, p. 178-182, 2004.

ZHANG, L.; TIZZARD, I.R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from aloe vera gel. **Immunopharmacology**. v. 35, p. 119-128, 1996.

CAPÍTULO III - SUPLEMENTAÇÃO DE β -MANANASE EM DIETAS CONVENCIONAIS E A CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS EM CONDIÇÕES COMERCIAIS

RESUMO - O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da adição de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja sobre a morfometria intestinal, perfil imunológico, ocorrência de calos de pés, rendimento de carcaça e a caracterização da microbiota intestinal de frangos de corte criados em granjas comerciais. Foram utilizados 4 aviários *dark house*, e em cada um foram alojados 34 mil pintos de 1 dia de idade da linhagem Cobb Slow. Os tratamentos consistiram na inclusão ou não da enzima β -mananase, sendo a mesma dieta para cada 2 aviários, compostas a base de milho e farelo de soja. Aos 21 e 42 dias de idade das aves, 16 aves/tratamento foram capturadas de forma aleatória para análise histomorfométrica do intestino (altura e largura dos vilos e a profundidade e largura das criptas e contagem de células caliciformes.). O rendimento de carcaça de cortes comerciais de 40 aves/tratamento foi determinado aos 46 dias de idade das aves em um abatedouro comercial. Também foram coletados 3600 pés/tratamento para a avaliação de ocorrência de calos de pés. Não houve efeito significativo da adição de β -mananase sobre nenhuma das medidas morfométricas de intestino, rendimento de carcaça ou perfil imunológico. A suplementação das dietas com enzima resultou em maior grau de aves com lesão leve, em comparação com o grau médio e grave. A avaliação da microbiota intestinal mostrou a ocorrência de espécies distintas não somente entre os tratamentos, mas pouco compartilhada entre os aviários da mesma granja. A inclusão de β -mananase não trouxe melhorias nas respostas produtivas de frangos de corte criados em condições comerciais.

Palavras-Chave: calos de pés, microbiota intestinal, rendimento de carcaça

CHAPTER III – β -MANANASE SUPPLEMENTATION IN CONVENTIONAL DIETS AND THE DESCRIPTION OF GUT MICROBIOME AND IMMUNE RESPONSE OF BROILERS REARED FOLLOWING COMMERCIAL CONDITIONS

ABSTRACT - The aim of this study was to assess the effect of β -mannanase addition in corn and soybean meal-based diets over gut morphometry, immunological profile, bumblefoot, carcass yield and description of gut microbiota of broilers raised in commercial barns. There were four dark house barns; on each of them, 34 thousand Cobb Slow chicks (1 day-old) were housed. The treatments were with and without β -mannanase, and every two barns received the same diet, which was made of corn and soybean meal. At 21 and 42 days of age, sixteen fowls per treatment were randomly taken in order to analyze intestinal histomorphometry (height and width of the villi, depth and width of the crypts and goblet cell count). The carcass yield of commercial cuts from 40 fowls/treatment was performed at 46 days of age in a commercial slaughterhouse. 3600 feet/treatment were also collected for bumblefoot evaluation. There was no significant effect of β -mannanase on morphometric measures, carcass yield or immunological profile. The enzyme supplementation reflected in a higher number of birds with mild lesion in comparison with medium and severe. The evaluation of the gut microbiota showed the occurrence of different species not only between treatments, but among poultry barns in the same farm as well. The inclusion of β -mannanase did not bring improvements in productive responses of broiler chickens raised on commercial terms.

Keywords: bumble foot, gut microbiota, carcass yield

Introdução

A intensa seleção genética aplicada, aliada ao atendimento das exigências nutricionais, permite ao frango de corte moderno expressar um grande potencial produtivo. Além disso, a estreita relação entre a composição da microbiota intestinal com a dieta aponta a importância da manutenção de um ambiente intestinal saudável, essencial para alcançar desempenho esperado.

No Brasil a dieta é composta basicamente por milho e farelo de soja, fontes de energia e proteína, respectivamente e considerados ingredientes vegetais de alta digestibilidade. Entretanto, ingredientes vegetais, incluindo milho e farelo de soja possuem em sua composição PNAs.

Na soja, estes compostos podem representar 22,7% da parede vegetal, o que pode comprometer o valor nutricional do grão. Os PNAs não podem ser digeridos por frangos de corte devido a natureza de suas ligações químicas que resistem a hidrólise das enzimas endógenas (CHOCT et al., 2010) em consequência dificultam a absorção de outros nutrientes, pois alteram o tempo de permanência do alimento no trato digestivo, causam aumento da viscosidade gastrointestinal e reduzem a difusão de enzimas e substratos, o que prejudica o resultado zootécnico. Tais características conferem aos PNAs um caráter antinutricional e imunodepressor resultando em custo metabólico e nutricional (CHOCT et al., 2010; HUMPHREY e KLASING, 2007).

A adição de enzimas exógenas pode ser uma estratégia para melhorar a utilização dos PNAs pelas aves (MONTANHINI et al., 2012). A enzima β -mananase é uma enzima capaz de catalisar os β -mananos, via hidrólise aleatória das ligações β -1,4-manano, reduzindo seu peso molecular resultando em menor agressão à mucosa intestinal, aumentando a disponibilidade de energia metabolizável da dieta (DHAWAN e KAUR, 2007).

Por outro lado, com a melhor digestão de componentes da parede celular dos vegetais, as enzimas exógenas podem alterar a composição da microbiota e, assim, melhorar a saúde intestinal de frangos de corte (DANICKE et al., 1999). Uma melhor absorção dos nutrientes diminui a quantidade de substrato no intestino, o que resulta em alteração na quantidade e na composição da população microbiana.

A microbiota compõe um ecossistema que interage de forma diferente com os nutrientes ingeridos pelos animais e com a mucosa intestinal. Assim, este ecossistema pode ser dividido em dois sub-ecossistemas: o luminal, que está diretamente relacionado com os ingredientes ingeridos, o tempo de trânsito e os efeitos das chamadas substâncias antimicrobianas adicionadas à dieta; e o colonizador, composto pela microbiota da mucosa, o qual está na dependência de expressão de locais específicos de aderência microbiana, a quantidade de muco produzida e que faz efeito tampão para as bactérias, às vezes com função “trap” para certas bactérias, a produção de imunoglobulinas que atuam sobre o agente invasor, bem como a taxa de extrusão celular que ocorre no ápice do enterócito. Este último sub-ecossistema apresenta capacidade intrínseca de alterar a estrutura funcional da mucosa, modificando a altura de vilo e profundidade de cripta e, conseqüentemente, os processos digestivos e absorptivos (APAJALAHTI et al., 2004; LUNEDO et al, 2014).

Em condições de criação comercial, os desafios ambientais, imunológicos e de manejo são mais intensos e frequentes que em condições experimentais. A suplementação de enzimas específicas como no caso da β -mananase pode não ter o mesmo impacto quanto o observado em condições experimentais. Considerando que “o intestino é um órgão em estado constante de inflamação controlada”, a qualidade ambiental desfavorável, sem os recursos de manejos de limpeza e desinfecção rigorosos, e as altas densidades de criação, entre outros, representam maiores desafios e mais comumente alguns agentes patogênicos oportunamente se estabelecem e geram enfermidades gastrintestinais determinando perdas econômicas importantes.

Outro fator importante no estabelecimento da microbiota das aves é a cama do aviário. A cama de aviário produzida nos galpões de criação é formada por material orgânico e excretas dos animais, cujas características físico-químicas de pH, associadas às temperaturas ótimas para criação de frango (20 a 30°C) e à elevada umidade, formam um composto rico em nutrientes, ambiente propício para o desenvolvimento de microorganismos.

Assim, a composição da microbiota bacteriana é afetada pelas bactérias presentes no intestino e pelos microrganismos naturais do ambiente (Yin et al., 2010). No trato intestinal, são encontradas bactérias Gram positivas, em maior quantidade que as bactérias Gram negativas. Já, na cama dos aviários, predominam

bactérias aeróbicas estafilococos Gram positivas e, em menor quantidade, as bactérias enterococos Gram negativas. Bactérias potencialmente patogênicas, como *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, entre outras, podem estar associadas à microbiota intestinal das aves e podem ser encontradas na cama de frango (RESENDE, 2010).

Para o entendimento de um ecossistema é necessário caracterizá-lo corretamente. Segundo Apajalahti et al. (2004), as espécies bacterianas que constituem uma comunidade são dependentes umas das outras e do ambiente no qual estão inseridas. Isto faz com que os requerimentos de crescimento de muitas bactérias sejam fornecidos apenas pelo *habitat* natural ou por outras espécies bacterianas sinérgicas vivendo na mesma comunidade, dificultando muita a análise de espécies individualmente como é feito pelos métodos dependentes de cultura (PEDROSO et al., 2012). As técnicas moleculares usando análise filogenética dos ácidos nucléicos têm surgido como ferramentas chaves para caracterizar estas comunidades e estabelecer suas funções dentro do ecossistema e sua relação com o hospedeiro (OVIEDO-RONDÓN, 2009).

É importante ainda considerar que a resposta do organismo frente à infecção possui complexas etapas que envolvem tanto respostas celulares como humorais. Como as aves não possuem linfonodos, as células de defesa podem ser encontradas nos órgãos linfóides primários e nos secundários, como intestino e fígado (TIZARD, 1996).

O sistema imune do lúmen intestinal apresenta uma grande quantidade de células linfóides e tecidos linfóides associados ao intestino (GALT), já que imediatamente após nascimento e durante toda a vida das aves, ele é exposto a uma grande quantidade de agentes infecciosos e parasitários, além de outros agentes estranhos e imunogênicos. A exposição a estes agentes influencia na formação, quantidade e distribuição dos GALT no intestino e na regulação da resposta imune.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da adição de β -mananase em dietas a base de milho e farelo de soja sobre a caracterização do microbioma e morfometria intestinal e resposta imune de frangos de corte criados em condições comerciais.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida numa granja de produção de frangos de corte com quatro aviários comerciais e integrada a uma agroindústria da região oeste do Paraná. Todos os procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação.

Foram alojados em cada aviário, 34 mil pintos de 1 dia de idade da linhagem Cobb Slow, não sexados. Os tratamentos consistiram na inclusão ou não da enzima β -mananase, sendo a mesma dieta para cada 2 aviários. Os tratamentos experimentais utilizados foram:

- Tratamento 1: Aviários 0 e 1 - dieta com inclusão de β -mananase;
- Tratamento 2: Aviários 2 e 3 - dieta sem inclusão de β -mananase.

A enzima β -mananase foi incluída nas dietas específicas na dose de 400g/ton em todas as fases do programa nutricional. O programa nutricional compreendeu cinco dietas à base de milho e farelo de soja: pré inicial (1 a 7 dias), inicial 1 (8 a 18 dias), inicial 2 (19 a 28 dias), crescimento (29 a 37 dias) e abate (38 dias até o abate). As duas primeiras dietas eram peletizadas e trituradas e as demais, peletizadas. As dietas atenderam as exigências nutricionais de cada fase de vida das aves, segundo os níveis nutricionais das Tabelas Brasileiras (Rostagno et al., 2011) e as recomendações nutricionais da agroindústria.

Os aviários eram do tipo *dark house* com estrutura idêntica, placa evaporativa, nebulizadores, forro baixo, linhas de comedouro e bebedouro automáticas e cama reutilizando pela 9ª vez. A metragem era de 150m de comprimento por 15m de largura, comportando 15,11 aves/m².

Todos os procedimentos de alojamento e criação das aves foram idênticos aos quatro aviários e obedeceram as normas da agroindústria. A temperatura de conforto térmico das aves e o programa de luz também seguiram as recomendações da empresa. Água e ração foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo o período do ensaio.

Aos 21 e 42 dias de idade das aves, 16 aves (machos)/tratamento foram pesadas e procedido a coleta do sangue através da veia ulnar com anticoagulante (Heparina sódica - Hepamax, Blausiegel, São Paulo, Brasil), o qual foi

acondicionado em tubos Vacuteiner® (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) até o momento da análise em citômetro de fluxo. Todos os anticorpos foram adquiridos de Southern Biotechnology Associates (USA). O anticorpo camundongo anti-galinha CD45 (conjugado a SPRD - lido no canal FL3) clone LT40 foi usado para separar os leucócitos do sangue total. Para identificar as moléculas em superfície dos leucócitos os seguintes anticorpos foram utilizados: camundongo anti-galinha CD4 (clone CT-4, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha CD8 α (clone CT-8, IgG1, conjugado a R-PE); camundongo anti-galinha CD28 (clone AV7, IgG1, conjugado a FITC). Para determinar diferentes subpopulações leucocitárias e suas funções recorreu-se a duplas marcações a seguir: CD4/TCR $\nu\beta$ 1 e CD8 α /CD28.

As amostras de sangue total foram tratadas segundo Stabel, Bolin, Pesch, e Rahner, 2000 (modificado). Basicamente, 50 μ L de sangue total foram incubados por 30 minutos (37°C) com os anticorpos específicos e fixados com paraformaldeído por 30 minutos a 4°C, posteriormente acondicionados em tubos de citometria em volume final de 2mL de PBS + BSA 1%+Azida 0,02%. Os marcadores descritos foram utilizados para analisar 3 populações principais: linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 ativados e monócitos.

A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson) e as fluorescência dos anticorpos foram detectadas nos canais FL1 (nm 530/30) para FITC, e FL2 (nm 585/42) para PE. Foram analisados 50.000 eventos na seleção (gate) de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral - FSC e SSC). Os dados foram analisados com o software Cell Quest (Becton Dickinson).

Após o procedimento de coleta de sangue, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical. Após a eutanásia, o peso dos órgãos linfóides (bolsa cloacal, timo e baço) foi obtido imediatamente após a dissecação e remoção dos tecidos exógenos para cálculo do peso relativo pela fórmula: peso relativo = (peso órgão/peso vivo) x 100. Após a coleta foram fixados em solução de formol tamponado. A superfície transversal de cada órgão foi exposta e fotografada juntamente com uma régua de calibração de 1mm (distância de 20cm, câmara digital com zoom de 2,4). As imagens foram preparadas e analisadas por meio do sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Foram obtidas as medidas da área total de cada órgão (mm²), e

diâmetro longitudinal do baço e bolsa cloacal e diâmetro longitudinal e transversal (mm) do timo.

O intestino delgado foi removido e obtido fragmentos longitudinais de aproximadamente 5cm de comprimento do jejuno, os quais foram presos a pedaços de isopor e lavados com formol tamponado refrigerado. Cada fragmento, após fixação em formalina 10% tamponada, passou pelo processo de desidratação/hidratação por meio de soluções a base de álcool e xilol e então, foram emblocados em parafina. Após, foram submetidos a cortes semi-seriados de 5µm de espessura e corados pela técnica do PAS. Para a contagem das células calciformes, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (Olympus BX 50), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética), em aumento de 40x. A contagem de células calciformes foi feita nas imagens capturadas em aumento de 40x por mm² de área de vilo.

Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas pelo mesmo sistema descrito, entretanto em aumento de 10x. Neste estudo foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilos e a profundidade e largura de 20 criptas de cada lâmina. Utilizou-se estas medidas morfométricas também para o cálculo da área de superfície de absorção da mucosa intestinal, através da seguinte fórmula, segundo Kisielinski et al. (2002):

$$\text{Área de absorção: } \frac{(LV \times AV) + (LV/2 + LC/2)^2 - (LV/2)^2}{(LV/2 + LC/2)^2}$$

Onde:

LV: largura de vilo, AV: altura de vilo, LC: largura de cripta

Nestas mesmas idades, seis aves (machos)/aviário (12 aves/tratamento) foram selecionadas sem jejum prévio, eutanasiadas por deslocamento cervical e o trato gastrointestinal foi exposto. O ambiente foi devidamente limpo e desinfetado com álcool 70%, evitando qualquer contaminação do material a ser coletado. O início do duodeno e a junção íleo/cecal foram isolados, afim de que o conteúdo intestinal permanecesse dentro do órgão e sem contato com o ambiente externo. O mesmo isolamento foi feito no início do ceco. Em ambas as situações, o isolamento foi feito com fio devidamente desinfetado e anteriormente ao corte para separação

do órgão em duas porções, (i) duodeno, jejuno e íleo e (ii) ceco. Em seguida as amostras devidamente identificadas foram imediatamente. Aproximadamente 12h antes do processamento do conteúdo intestinal, as amostras foram descongeladas sob condições de refrigeração. Com o ambiente devidamente limpo e desinfetado constantemente, foram feitos “pools” (cada “pool” constituído por três aves) do conteúdo do intestino delgado e do ceco de 12 aves de cada tratamento, resultando em quatro amostras de intestino delgado e quatro amostras de ceco/tratamento.

Para o estudo da microbiota do intestino delgado, foi realizado previamente a concentração da fração bacteriana de acordo com a metodologia (adaptada) proposta por Apajalahti et al. (1998). A partir de uma seringa (60mL) estéril construiu-se uma coluna para filtração do material não digerido e das impurezas. Na parte inferior, havia um funil, formado por papel filtro (nº1), logo em seguida, na porção intermediária, algodão estéril, e na parte superior, gases estéreis. Esta seringa foi colocada em uma garrafa autoclavada de centrifuga.

Logo após, 15g do conteúdo intestinal homogeneizado diluído em 50mL de PBS (Tampão Fosfato de Sódio, pH 8) 50mM, contendo 0,1% de Tween 80. Por um minuto, a solução foi vagarosamente misturada e após, colocada na coluna. A garrafa foi alocada na centrífuga, a qual foi mantida com formol para diminuir a possível contaminação externa e o rotor congelado para manter a temperatura baixa. Então, o material foi centrifugado a 3000g por 20 minutos. O conteúdo foi filtrado e os micro organismos concentraram-se no fundo da garrafa, na forma de pelete. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pelete ressuscitado em 1mL de solução salina estéril (solução NaCl 0,9%).

A nova solução foi distribuída em microtubos tipo eppendorf, no volume máximo de 200µL por tubo e centrifugadas a 6000g por 10 minutos. Novamente, os micro organismos concentraram-se no fundo e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente.

Obteve-se o peso do pelete bacteriano restante e em proporção de 1:10, foi ressuscitado em Solução Peptone (1% peptone, 15% glicerol em água). Homogeneizou-se a solução até não ser mais visível o pelete e o líquido ficar turvo. Então, os microtubos tipo eppendorff foram congelados para posterior extração do DNA.

Para análise do conteúdo cecal, devido ao maior número de microorganismos, não é necessário o procedimento de concentração das bactérias.

Assim, 3g do conteúdo cecal previamente homogeneizado foi diluído em Solução Peptone na proporção de 1:10 em um tubo tipo falcon, o qual foi novamente congelado para posterior análise.

O conteúdo intestinal e cecal foram submetidos à extração de DNA com TE (Tampão Tris - EDTA) a partir de uma alíquota de 500µL da suspensão previamente obtida. Acrescentou-se uma solução de lise de 200µL, preparada a partir de 145µL de EDTA 1mM, pH 8,0 e 55µL SDS 10% e acrescida de 3,8µL de lisozima e 10,8µL proteinase K. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram mantidas em banho-maria a 55°C por 30min e transferidas posteriormente para outro banho-maria a 95°C por 15min. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 14000g por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante, acrescentando 3,2µL de RNase. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após a incubação adicionou-se 700µL da mistura obtida com fenol, clorofórmio e álcool isolamílico, mantidas em banho-maria 56°C por 15 minutos. Após esse período foram centrifugadas a 8000g por 15 minutos, recuperou-se 500µL acrescentando 134µL acetato de amônio 7M, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 1340µL de etanol gelado. As amostras foram mantidas à 4°C por 17 horas e posteriormente centrifugadas a 14000g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a evaporação do etanol em temperatura ambiente o precipitado foi dissolvido em 50µL de tampão TE. As amostras foram submetidas ao PCR e o produto foi analisado em gel de agarose. Após constatação da amplificação, as amostras foram submetidas ao sequenciamento.

O DNA previamente extraído foi submetido à reação de PCR tendo como alvo a região V4 do gene 16S rDNA. A reação de amplificação constituiu na desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos, de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto e 45 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi conduzida por 72°C por 4 minutos. Os *primers* bacterianos utilizados foram: Forward "AYTGGGYDTAAAGNG" (*E. coli* position 563-577) e reverse "CCGTCAATTCMTTTRAGT" (*E. coli* 907-924). Além disso, utilizou-se 10X PCR Buffer; Cloreto de Magnésio (MgCl₂ – 50mM); dNTP's (10mM) e a Taq Polimerase na concentração de 5U/µL. Após este primeiro PCR, o produto da reação foi purificado com o Kit Charge Switch, de acordo com instruções do fabricante. A segunda PCR, com os adaptadores, foi realizada na seguinte

condição: 95°C por 3 minutos, seguindo 5 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos. O produto foi mantido a -20°C até o momento do sequenciamento. Nesta última reação foi usado 5µL de cada adaptador (2 adaptadores para cada amostra), mais 15µL do produto da primeira PCR. O sequenciamento foi realizado no MiSeq, com o “Kit MiSeq Reagent kit v2 (500 ciclos)”. O produto foi analisado pelo software MiSeq Reporter, na opção Metagenomics, do próprio equipamento.

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (“*outliers*”) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Depois de constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002).

A análise das sequências parciais do gene rDNA 16s foi conduzida utilizando-se um software com uma fonte filogenética de acesso aberto. 27 sequências de boa qualidade foram alinhadas usando a base de dados “Silva” e posteriormente filtrados. Sequências 16S foram carregadas no MG-RAST servidor 28 com o objetivo de gerar tabelas de gêneros e espécies com 97% de similaridade. Distâncias filogenéticas foram calculadas em sequências pré-agrupadas, e as unidades taxonômicas operacionais foram formadas usando o método do método vizinho. O algoritmo Libshuff foi usado para estimar diferenças entre a composição das bibliotecas. A análise estatística relacionada com a frequência de sequências específicas representando os micro organismos presentes nas amostras foram conduzidas por análise de variância. A análise estatística relacionada com a frequência de sequências bacterianas presentes nas amostras foi analisada pelo PROC FREQ e comparadas pelo teste de Qui-Quadrado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$.

Resultados e Discussão

A microbiota compõe um ecossistema que interage de forma diferente com os nutrientes ingeridos pelos animais e com a mucosa intestinal. A dieta é o principal fator dessa interação podendo modular as comunidades microbianas, como é

observado em experimentos controlados. Entretanto, em condições de criação comercial, essa relação pode ser influenciada, em maior ou menor grau, pelas condições sanitárias e ambientais das instalações. A dificuldade em manter a ambiência, sem os recursos de manejos de limpeza e desinfecção rigorosos, e as altas densidades de criação, entre outros, representam maiores desafios e mais comumente alguns agentes patogênicos oportunamente se estabelecem e alteram a relação simbiótica com o hospedeiro.

Neste sentido, os resultados encontrados mostram variações nas respostas, além de ressaltar a particularidade das comunidades microbianas de aves criadas em diferentes aviários, mesmo pertencendo a mesma granja, com manejos e programas sanitários e nutricionais semelhantes.

Na avaliação dos órgãos do sistema imune, bolsa cloacal, baço e timo, de frangos recebendo dietas suplementadas ou não com β -mananase, não foram encontradas alterações ($p > 0,05$) em relação ao peso ou morfometria nas coletas realizadas aos 21 e 42 dias de idade (Tabelas 1 e 2). Entretanto, a medida do diâmetro do baço aos 21 dias de idade foi menor quando as aves receberam a adição de enzima na dieta.

A morfometria da mucosa intestinal também não foi alterada ($p > 0,05$) pela suplementação de enzima (Tabela 3). O número de células caliciformes não sofreu alterações em função da suplementação enzimática. As células caliciformes são as células produtoras de glicoproteínas (muco) que tem as funções de proteção da mucosa intestinal contra agentes abrasivos da dieta e agentes patogênicos e também, participa na absorção dos nutrientes. Segundo Pickler et al. (2012), o muco participa da resposta imune inespecífica, e quando há a grande expressão de células caliciformes indica que pode haver algum tipo de desafio sanitário que demande maior produção de muco. Em contrapartida, o muco quando em grandes quantidades pode trazer prejuízos para a saúde da ave, pois aumenta o trânsito intestinal, reduzindo a absorção dos nutrientes.

Em situações experimentais, a adição da enzima β -mananase altera a estrutura da mucosa intestinal (JARONI et al., 1999; MATHLOUTHI et al., 2002; GRACIA et al., 2003; ZHU et al., 2014). O controle das variáveis externas, como as ambientais, de manejo e sanitárias permitem a expressão dos efeitos da suplementação de enzimas sobre a digestibilidade, a redução da viscosidade e sobre as respostas imunes das aves. Neste sentido, a avaliação de aditivos em

condições comerciais pode gerar respostas diferentes daquelas observadas em condições experimentais e isso pode impactar diretamente no desempenho econômico da atividade, já que a nutrição representa de 60 a 80% dos custos de produção. O setor avícola de maneira geral é muito sensível ao incremento do custo de produção, e, portanto, o grande entrave, ainda, são os custos relacionados à adoção de ferramentas, cujas respostas ainda não são muito consistentes.

Além da dieta, fatores estressantes exercem influência sobre a microbiota intestinal das aves. Burkholder et al. (2008) avaliaram a influência de fatores estressantes como altas temperaturas e jejum e observaram que as aves submetidas a estas condições, tornaram-se mais susceptíveis a patógenos oportunistas.

Tabela 1. Peso vivo, peso absoluto e relativo da bolsa cloacal, baço e timo de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais

	Peso vivo		Bolsa cloacal		Baço		Timo	
	g	g	%	g	%	g	%	
21 dias								
Enzima								
Sem enzima	852,75	2,63	0,309	1,06	0,125	0,97	0,080	
Com enzima	850,50	2,43	0,285	1,30	0,124	0,82	0,096	
Valor de P	0,9486	0,4943	0,4260	0,1500	0,1026	0,9068	0,9648	
CV, %	7,77	21,74	19,63	25,39	22,09	19,02	18,41	
42 dias								
Enzima								
Sem enzima	2828,75	1,35	0,048	2,94	0,105	2,74	0,097	
Com enzima	2829,50	1,72	0,061	2,71	0,097	2,54	0,090	
Valor de P	0,9943	0,3052	0,2499	0,5566	0,5521	0,6065	0,6542	
CV, %	7,09	21,29	22,00	24,49	23,26	30,33	32,34	

Tabela 217. Medidas morfométricas da bolsa cloacal, baço e timo de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase criados em condições comerciais

	Bolsa cloacal		Baço		Timo		
	Área, mm ²	D, mm	Área, mm ²	D, mm	Área, mm ²	DT, mm	DL, Mm
21 dias							
Enzima							
Sem enzima	123,61	12,30	54,74	8,23 ^a	18,55	3,23	6,87
Com enzima	129,80	12,66	46,36	7,38 ^b	17,94	3,06	7,30
Valor de P	0,6684	0,6289	0,1288	0,0369	0,7352	0,5304	0,2319
CV, %	22,33	11,89	20,54	9,41	19,43	16,65	9,73
42 dias							
Enzima							
Sem enzima	83,01	9,99	109,95	11,62	42,29	4,39	11,74
Com enzima	70,36	9,30	111,63	11,85	39,50	4,28	11,03
Valor de P	0,3211	0,3939	0,8595	0,6552	0,4748	0,6947	0,4569
CV, %	31,05	15,75	16,84	8,74	18,57	12,46	16,34

DT: diâmetro transversal; DL: diâmetro longitudinal

Jackson et al. (2003) observaram que em frangos infectados com *Eimeria* e *Clostridium perfringens*, a adição da enzima β -mananase resultou em redução da severidade do desafio gerado por esses patógenos, sendo que o efeito foi verificado não somente pelo aumento no peso corporal, mas também pela redução nas lesões intestinais. Por outro lado, na ausência de desafio sanitário, Mushtaq et al. (2007) não observaram benefícios no desempenho, digestibilidade de nutrientes, resposta imune e características de carcaça de frangos de corte suplementados com glucanase e xilanase em dietas a base de farelo de canola.

Ainda devem ser considerados fatores intrínsecos à própria suplementação enzimática. As condições de fabricação das enzimas variam em função do tipo e cepa de microrganismo, meio de cultura utilizado, condições de fermentação e processamento, controle dos processos, entre outros (GILBERT e COONEY, 2011). As enzimas devem ter especificidade e em proporção ao substrato presente nos ingredientes que compõe a dieta, além disso, o animal deve ser capaz de utilizar o produto final da ação enzimática ou beneficiar-se da quebra de substratos específicos (DALE, 2002). Outro fator importante é a estabilidade durante e após o processamento da ração até que seja consumida, e no ambiente intestinal onde irá agir.

Tabela 318. Comprimento (C) e largura de vilo (L), profundidade (P) e largura (L) de cripta, área de absorção e contagem de células caliciformes (Cels./10mm) da mucosa do jejuno de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais

Enzima	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	Área, μm^2	CC
21 dias							
Sem enzima	776,18	171,95	100,52	41,40	7,90	12,66	9,18
Com enzima	752,60	166,79	111,16	38,20	6,90	12,57	8,17
CV, %	14,70	25,92	18,87	14,51	19,84	24,90	22,47
Valor de P	0,6811	0,8175	0,3050	0,2866	0,1937	0,9539	0,2013
42 dias							
Sem enzima	877,06	152,13	94,08	33,68	9,36	15,96	13,09
Com enzima	872,01	139,93	101,88	31,64	8,67	17,16	10,73
CV, %	15,14	23,92	15,26	13,90	12,97	16,05	31,23
Valor de P	0,9403	0,4963	0,3143	0,3831	0,2538	0,3820	0,1114

CV: comprimento de vilo; LV: largura de vilo; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C: relação vilo:cripta; CC: células caliciformes.

Em relação à avaliação do perfil imunológico da resposta celular, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre aves suplementadas ou não com a β -mananase sobre a população de linfócitos (Tabela 4). Um importante modo de ação da β -mananase é a redução da estimulação do sistema imune inato associada com

a redução do conteúdo de substratos de β -mananos entrando no trato intestinal (JACKSON et al., 2004). Como já discutido, a enzima para agir, deve ter especificidade e ser suplementada em quantidade proporcional ao substrato, o que talvez não tenha ocorrido nesse trabalho, resultando em nenhum efeito sobre o sistema imune.

As populações de linfócitos do sangue periférico mostram-se como bons marcadores para avaliar a imunocompetência de aves de produção, aparentemente saudáveis, que são constantemente imunizadas e passam por intensos processos de seleção de características interessantes do ponto de vista zootécnico (BEIRÃO, 2011; FERNANDES, 2014). A citometria de fluxo tem sido extensivamente utilizada em pesquisas para avaliar a situação do sistema imune, o efeito de dados patógenos sobre a imunidade, além da capacidade de resposta dos animais aos estímulos.

É descrito que a colonização normal do intestino por micro organismos é importante para o desenvolvimento normal do sistema imune humoral e celular das mucosas, o que acontece durante a vida do neonato (KANEKO et al., 2004). Pode-se supor que esta seja a razão das diferenças entre aves SPF e comerciais, em que as primeiras apresentam menor proporção de células CD8+.

Além disso, sob diferentes condições ambientais, diferentes fenótipos imunológicos são estimulados, e, portanto diferentes proporções de células são esperadas na circulação. Bem como, em condições de granjas comerciais, e com a seleção para melhor conversão alimentar, precisa ocorrer um desvio de energia entre características de manutenção como a resposta imune, preteridas no processo de seleção, e as características zootécnicas (Beirão, 2011). Portanto, quanto mais um animal for selecionado dentro desses parâmetros, maior será o desvio e a importância do sistema imune em determinar o ganho de peso.

O trato digestório representa a maior área de comunicação entre a ave e o meio externo. É considerado o maior órgão imune das aves. Mais de 70% das células produtoras de imunoglobulinas estão aí localizadas, e por isso é considerado o maior órgão efetor da imunidade humoral. Somente a superfície epitelial do intestino das aves representa mais de 50 m².

Toda esta área é habitada por uma grande massa de micro organismos, composta por mais 500 espécies, em equilíbrio entre si e simbiose com o hospedeiro. Quando em equilíbrio, a microbiota impede a proliferação e a atuação

de micro organismos potencialmente patogênicos e suas toxinas, mantendo com isso a qualidade intestinal. A microbiota exerce diversas funções benéficas como antibacteriana (por competição de nutrientes e de sítios de ligação e multiplicação), imunoestimuladora (estímulo do sistema imune e desenvolvimento de tolerância imunológica) e nutricional ou metabólica (síntese de vitaminas e conversão do colesterol).

Tabela 419. Perfil imunológico celular de frangos de corte com 21 e 42 dias de idade suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais

	CD8 de mucosa	CD4 de mucosa	CD4 gerais	CD4 não ativados	CD8 não ativados	CD8 ativados	Monócitos
21 dias							
Sem enzima	4,75	10,98	5,50	18,49	4,31	2,50	7,22
Com enzima	3,49	8,79	3,75	15,30	3,43	2,33	5,45
CV,%	34,83	31,73	58,63	39,89	54,72	88,86	37,05
Valor de P	0,0998	0,1849	0,2187	0,3541	0,4197	0,8756	0,1738
42 dias							
Sem enzima	2,76	10,78	3,99	22,28	2,55	1,89	7,05
Com enzima	2,61	12,64	4,68	20,10	1,84	2,44	5,99
CV,%	34,78	31,29	26,40	22,78	38,74	47,53	42,19
Valor de P	0,7666	0,3274	0,2467	0,3817	0,1137	0,3021	0,4511

No ambiente externo, a presença de bactérias na cama de aviário é inerente à produção e, portanto, integrante do ambiente que a ave habita. Condições estressantes podem ser mais impactantes sobre as respostas produtivas do que a suplementação de aditivos nas dietas. Estas podem ser ambientais, como o excesso de umidade decorrente das altas densidades de alojamento que propicia um ambiente favorável ao desenvolvimento de oocistos de *Eimeria* sp. e bactérias, nutricionais, como a presença de material não digerido no trato intestinal dos animais ou da falta de manejo adequado.

Portanto, a microbiota reflete o ambiente físico e biológico de seu hospedeiro. Neste trabalho, procurou-se determinar os desvios e as similaridades na comunidade bacteriana intestinal de frangos de corte criados em diferentes aviários. Os resultados demonstram que o ambiente de criação tem um impacto muito grande sobre essa comunidade. O genoma microbiano dos frangos de corte foi formado por 148 e 8 espécies no ceco e no intestino delgado, respectivamente, que representa 44,06 e 48,94% do total de sequências bacterianas observadas. Cada um dos aviários estudados, independente da suplementação enzimática utilizada, apresentou uma microbiota distinta, pouco compartilhada com os demais, apesar das condições em comum, sejam elas construtivas, de ambiência, manejo ou sanidade. Assim como, a suplementação enzimática resultou na identificação de bactérias específicas, principalmente na avaliação da comunidade bacteriana cecal.

Além disso, as espécies bacterianas que constituem uma comunidade são também dependentes umas das outras. Isto faz com que as exigências de crescimento de muitas bactérias sejam atendidas apenas pelo *habitat* natural ou por outras espécies bacterianas sinérgicas vivendo na mesma comunidade (APAJALAHTI et al., 2004; PEDROSO et al., 2012). Estes fatos podem contribuir para que as respostas a modificações de dieta ou manejo e inclusão de aditivos sejam bastante variáveis de acordo com a saúde intestinal, o ambiente de criação e a própria composição da microbiota (APAJALAHTI et al., 2002).

Neste sentido, nas análises bioestatísticas da microbiota do ceco e intestino delgado foram considerados no modelo o efeito específico de cada aviário, devido à grande diversidade bacteriana, como já destacado. Foi observado flora específica no ceco das aves alojadas nos aviários avaliados (Figura 1). No aviário 0 foram encontradas sequências relativas ao *Acinetobacter* (Otu534), *Subdoligranulum* (Otu730), ;*Ruminococcaceae* (Otu751) e *Firmicutes* (Otu1098), no aviário 1, foram

observados *Firmicutes* (Otu186), *Acinetobacter* (Otu643), *Butyricimonas* (Otu706), *Clostridia* (Otu966), no aviário 2, *Clostridiales* (Otu858), *Ruminococcaceae* (Otu964), *Ruminococcaceae* (Otu974), *Clostridia* (Otu989), *Firmicutes* (Otu1091), *Firmicutes* (Otu1096) e no aviário 3, *Firmicutes* (Otu576), *Bacteroidales* (Otu707) *Firmicutes* (Otu719), *Firmicutes* (Otu720), *Firmicutes* (Otu721), *Porphyromonadaceae* (Otu726), *Actinomyces* (Otu770), *Bacillales* (Otu803), *Bacteroidales* (Otu857), *Clostridiales* (Otu916), *Pseudomonadaceae* (Otu926), *Clostridiales* (Otu935), *Fusobacterium* (Otu950), *Erysipelotrichaceae* (Otu999), *Firmicutes* (Otu1084), *Firmicutes* (Otu1097).

Aos 42 dias de idade a diversidade é maior que aos 21 dias (Figura 1). A diversidade também varia em função do segmento intestinal. No ceco a diversidade é muito maior que no intestino delgado. No intestino delgado dos frangos do aviário 0 foi observada as sequências relativas à família *Lactobacillaceae* (Otu1007), no aviário 1, *Yaniella* (Otu400), *Enterococcaceae* (Otu823), *Enterococcaceae* (Otu887), aviário 2, *Lactobacillaceae* (Otu1030) e aviário 3, *Lactobacillaceae* (Otu988), *Lactobacillus* (Otu1054).

Na avaliação genômica da microbiota cecal (Figura 2) foi observado entre os aviários da granja avaliada correspondem a 44,8% das sequências analisadas: *Ruminococcaceae* (9,1%), *Clostridiales* (5,9%), *Firmicutes* (2,9%), *Lachnospiraceae* (2,8%), *Faecalibacterium* (2,3%), *Bacteroides* (1,9%), *Pseudomonas* (1,7%), *Alistipes* (1,6%), *Subdoligranulum* (1,4%), *Bacteria* (1,3%), *Rikenellaceae* (0,7%), *Blautia* (0,4%), *Parabacteroides* (0,3%), *Erysipelotrichaceae* (0,3%), *Anaeroplasma* (0,3%), *Pseudoflanifactor* (0,2%), *Butyrococcus* (0,2%), *Odoribacter* (0,1%), *Clostridia* (0,1%). *Eubacterium* (0,09%), *Bacteroidales* (0,08%), *Osilobacter* (0,07%), *Ruminococcus* (0,06%), *Clostridium XIVb* (0,06%), *Coriobacteriaceae* (0,05%), *Clostridium XIVa* (0,03%). Já o genoma da microbiota do intestino delgado corresponde a 48% das sequências analisadas: *Lactobacillus* (4,0%), *Streptococcus* (0,3%), *Enterococcus* (0,1%), *Lactobacillales* (0,03%).

Na comparação entre os tratamentos (Figuras 3 e 4), basicamente só é possível avaliar a dissimilaridade entre a microbiota das aves suplementadas e das aves não suplementadas. Na comparação da distribuição dos gêneros bacterianos podem ser observadas grandes diferenças, principalmente do Aviário 0 em relação aos demais. Os aviários, independente da suplementação enzimática, apresentam uma comunidade microbiana distinta, especialmente aos 21 dias. Já aos 42 dias essas diferenças são menores (Figuras 5 e 6).

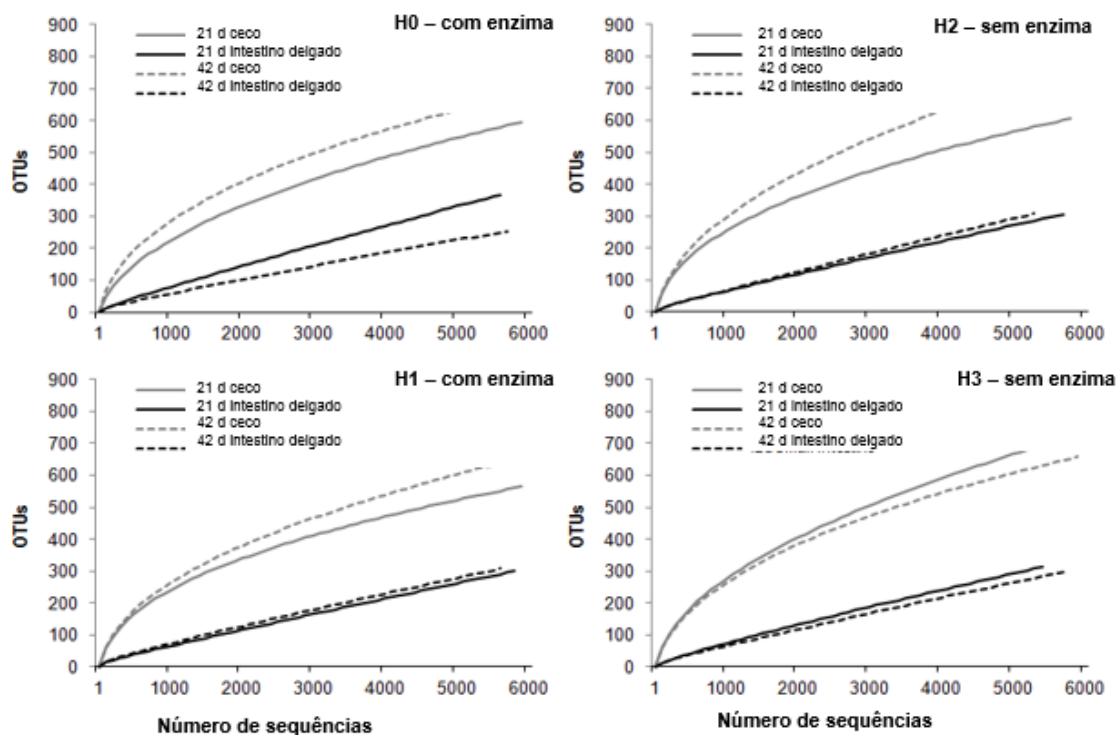


Figura 1. Curvas de rarefação – 97% de similaridade observada na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco e intestino de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação

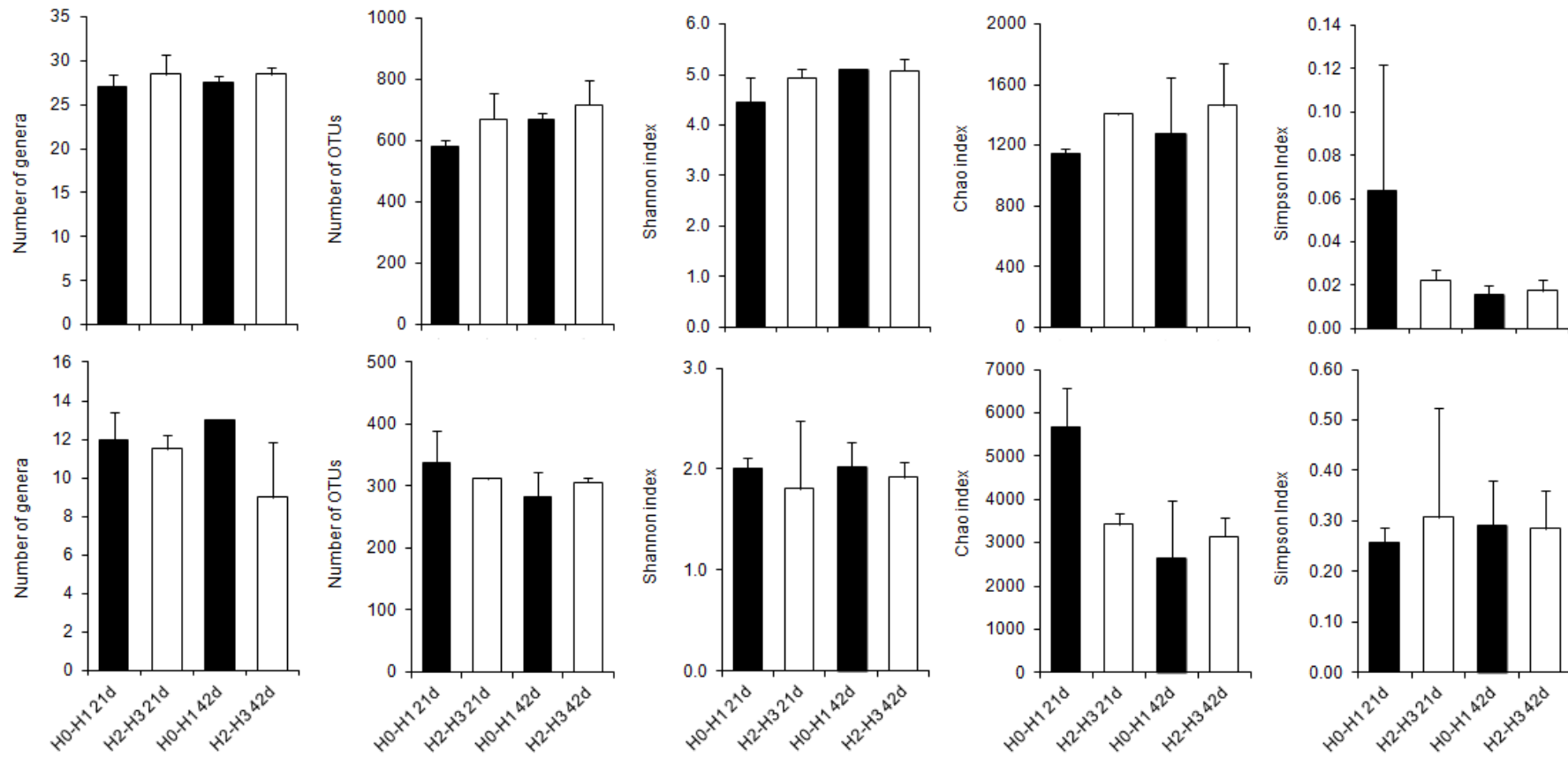


Figura 26. Número de gêneros, de OTUs e índice de diversidade observado na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco e intestino de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H1 e H2: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação

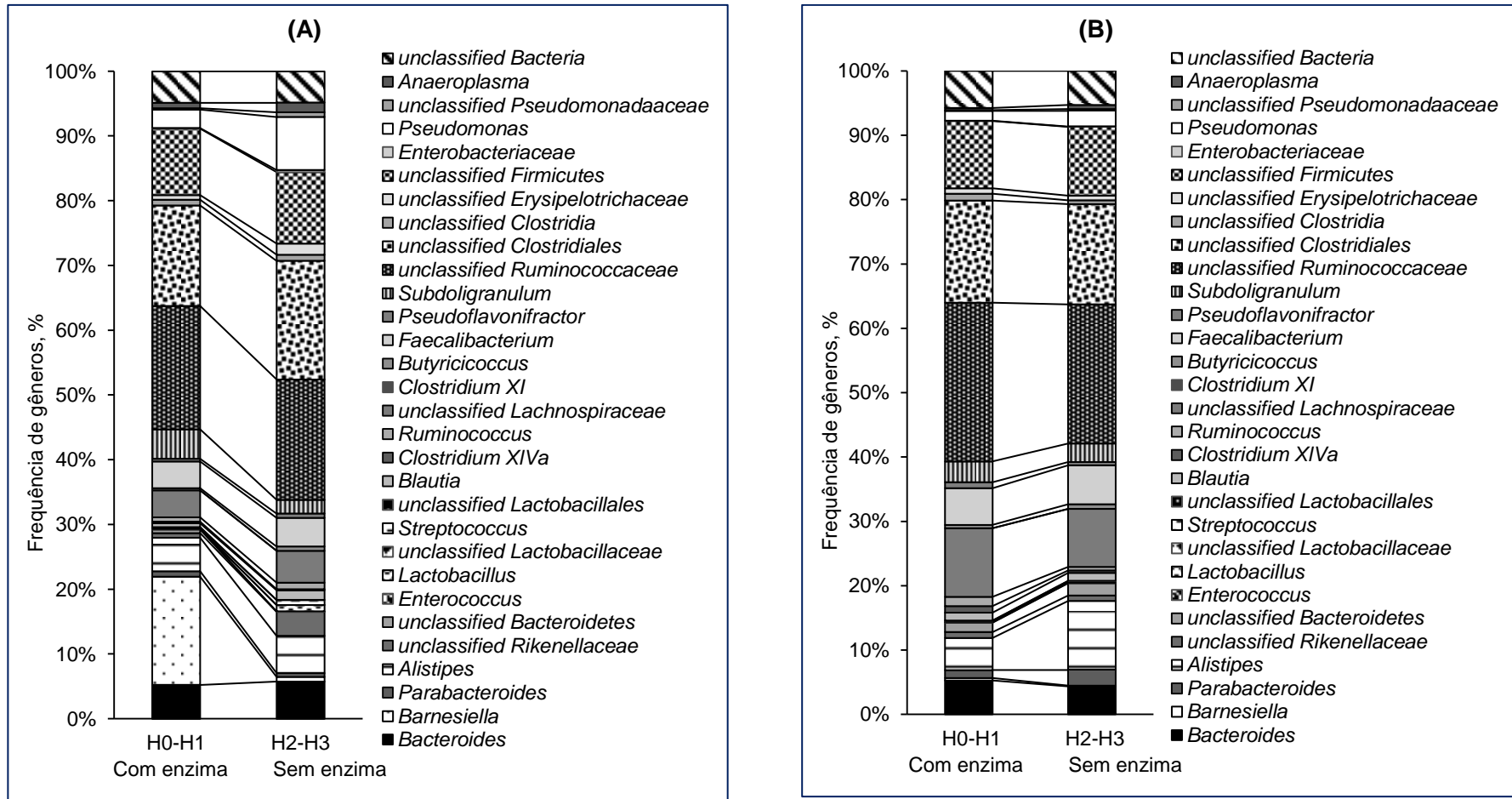


Figura 37. Distribuição de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco de frangos de corte aos 21 dias de idade (A) e 42 dias de idade (B) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação

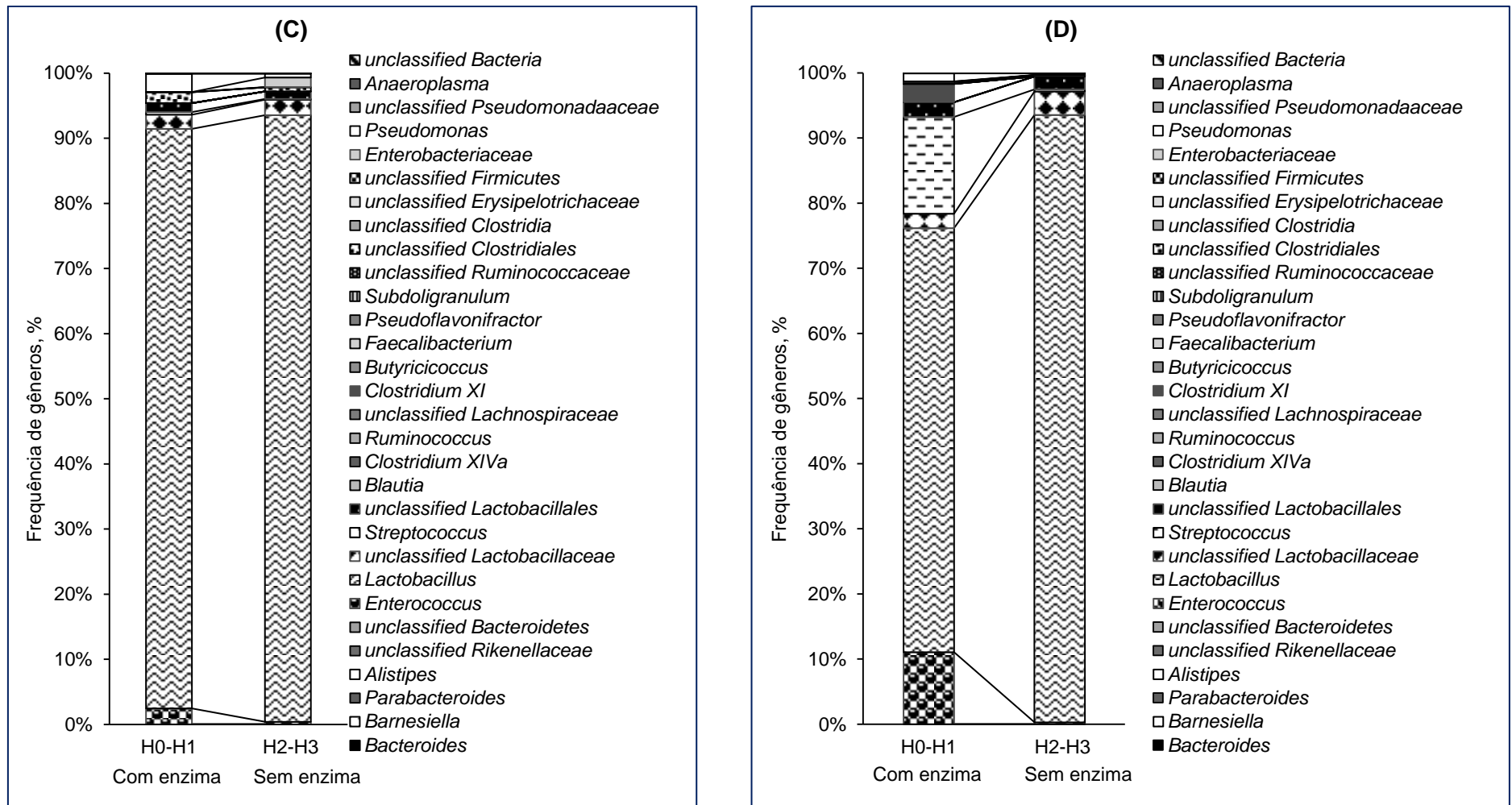


Figura 4. Distribuição média de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade (C) e 42 dias de idade (D) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação

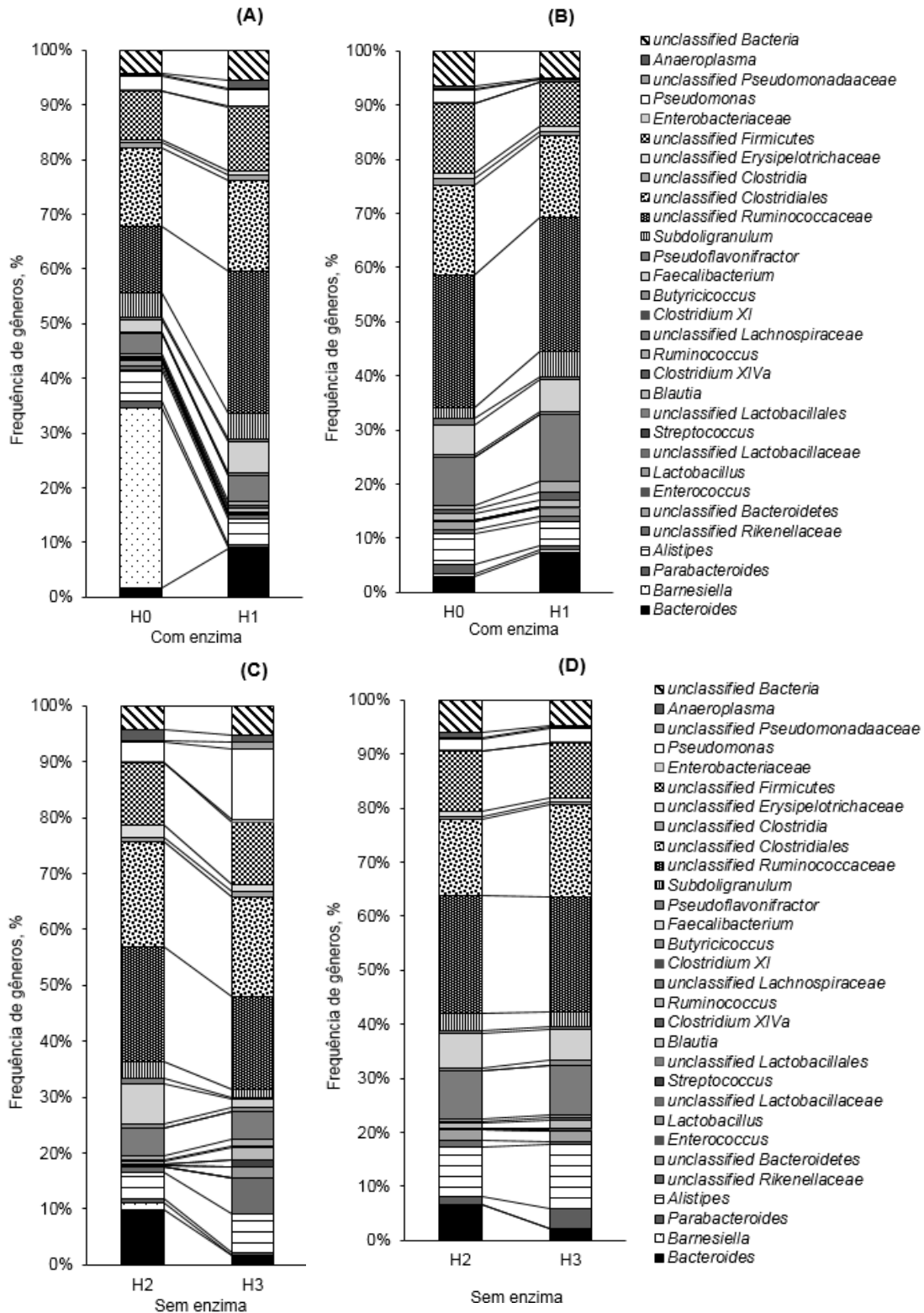


Figura 5. Distribuição de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco de frangos de corte aos 21 dias de idade (A e C) e 42 dias de idade (B e D) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β - mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação

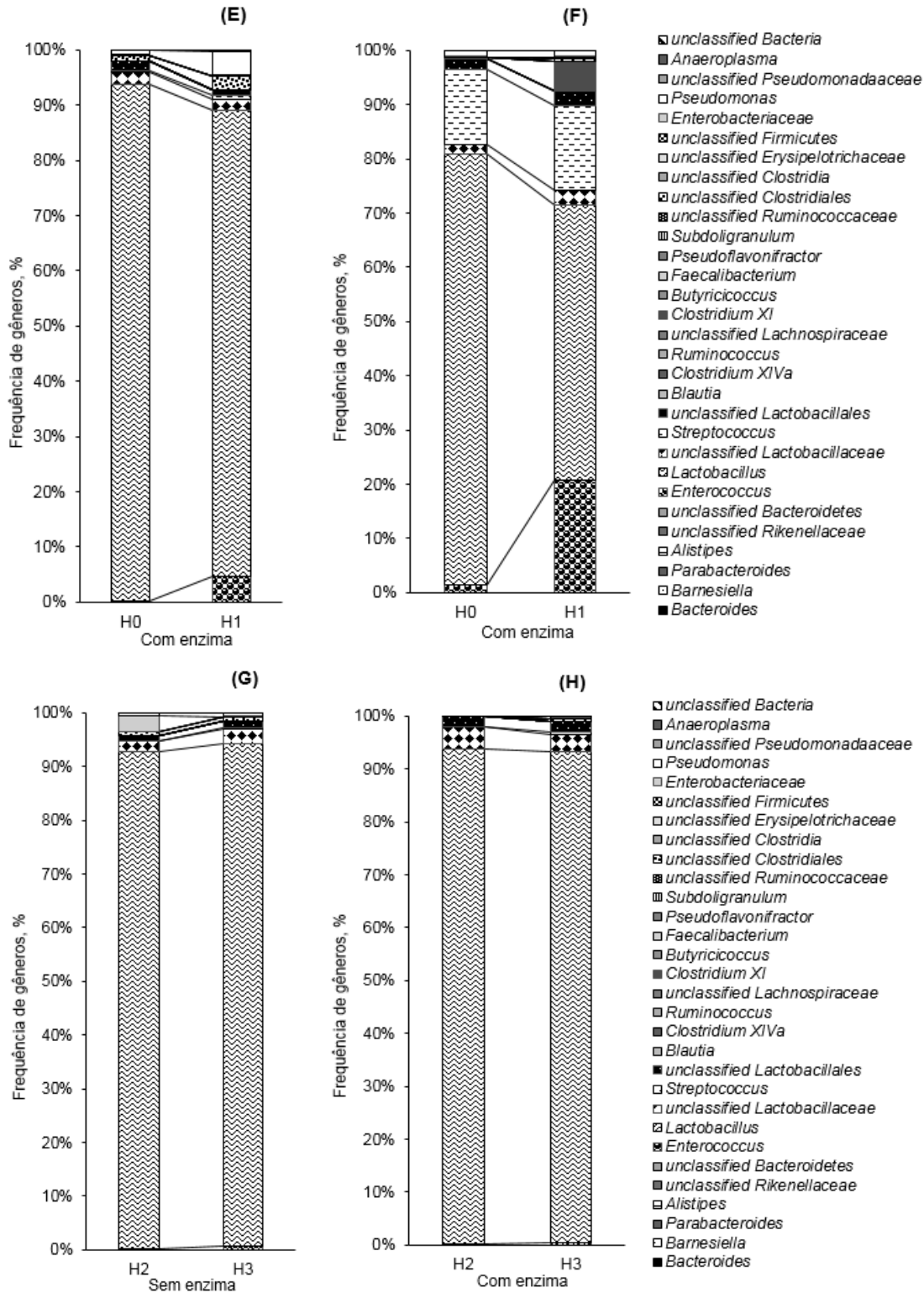


Figura 6. Distribuição de gêneros bacterianos observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do intestino delgado de frangos de corte aos 21 dias de idade (E e G) e 42 dias de idade (F e H) criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β - mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação

Na tabela 5, pode ser observado que o número de espécies observadas no ceco indica uma grande variabilidade em comparação ao intestino delgado,

entretanto o número de sequências é semelhante, indicando que a quantidade de cada espécie sequenciada é igual. Na comparação dentro de cada aviário e entre os tratamentos, não foram observadas diferenças. Lunedo et al. (2014) encontraram 3,9 e 6 vezes mais cópias do gene 16S na dieta a base de sorgo aos 42 dias no duodeno, e aos 7 dias no jejuno, em relação às aves que receberam dietas a base de milho.

A presença de nutrientes resultantes do processo de digestão luminal na camada de muco caracteriza a influência dos nutrientes dietéticos na comunidade colonizadora. Apesar do uso da β -mananase na dieta das aves dos aviários 0 e 1, não houve diferença na colonização intestinal. Segundo Lunedo et al. (2014), ingredientes diferentes, como no caso do milho e do sorgo, apresentam diferente taxa de degradação pelas enzimas do animal e, conseqüentemente, diferentes substratos para as bactérias presentes no lúmen.

Tabela 5. Número de OTUs (Notus) e número de sequências (Nseq) compartilhadas entre as amostras no genoma microbiano e sua relativa porcentagem observados na biblioteca 16S rDNA em grande escala nas amostras coletadas do conteúdo do ceco e intestino de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade criados em quatro diferentes aviários da mesma granja. Aviários H0 e H1: suplementação de β -mananase e Aviários H2 e H3: sem suplementação

Dentro de aviários	Ceco		Intestino Delgado	
	Notus (%)	Nseq (%)	Notus (%)	Nseq (%)
H0	311 (7,00)	10,488 (11,33)	16 (0,36)	10,661 (11,52)
H1	282 (6,34)	10,447 (11,28)	23 (0,51)	10,601 (11,45)
H2	329 (7,40)	10,003 (10,80)	15 (0,34)	10,294 (11,12)
H3	318 (7,15)	9,685 (10,46)	24 (0,54)	10,499 (11,34)
Entre os aviários				
H0-H1 (com β -mananase)	204 (4,59)	19,555 (21,13)	13 (0,29)	21,039 (22,73)
H2-H3 (sem β -mananase)	208 (4,68)	17,916 (19,36)	10 (0,22)	20,606 (22,26)
Granja	148 (3,33)	32,271 (34,87)	8 (0,18)	40,774 (44,06)

Em relação à avaliação dos calos dos pés (Tabela 6), pode ser observada uma frequência mais alta de aves com lesões leves quando foram suplementadas com β -mananase. Dos 3.600 pés de frangos de cada tratamento avaliados no abatedouro, as lesões consideradas leves foram observadas em 59,81% dos pés das aves suplementadas e em 42,18% nas aves não suplementadas. Esse efeito pode estar correlacionado à ação da enzima em quebrar os PNAs da dieta e com isso menos água é excretada pelas aves. Existe uma correlação direta entre a umidade da cama dos aviários com a ocorrência de calos de pés. Calos de pés representam perdas econômicas no momento do abate, visto que a pododermatite é

um problema crítico que pode comprometer as exportações de pés e pernas de frangos de corte (Hashimoto et al., 2013).

Tabela 20. Frequência de score de lesões de pés de frangos de corte ao abate suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais

	Score de lesão de pés, %		
	Leve	Moderado	Grave
Sem enzima	42,18	54,26	3,56
Com enzima	59,81	30,47	9,72

No abate das aves, foram observadas diferenças ($p < 0,05$) no rendimento da carcaça e dos cortes comerciais (Tabela 8). Os machos apresentaram maiores valores de peso vivo, maior rendimento de pés e menor percentual de gordura independente da suplementação enzimática ($p < 0,0001$). O rendimento do filé do peito diferiu ($p < 0,0001$) de forma isolada para sexo e enzima. As fêmeas que não receberam a β -mananase apresentaram um maior rendimento de filé de peito.

Este resultado reflete as demais observações obtidas na avaliação do sistema imune, morfometria de órgãos linfoides e mucosa intestinal, onde se constatou que a suplementação da β -mananase na dose recomendada pelo fabricante não se refletiu em melhorias nestas características. Por outro lado, os resultados referentes à avaliação das comunidades microbianas do ceco e intestino delgado mostraram haver grande diversidade não somente entre aves suplementadas ou não, mas também entre aviários da mesma granja, o que pode ter sido fundamental ou até mesmo decisivo nas respostas das aves. A microbiota é capaz de regular a eficiência absorptiva, a maturação intestinal, a resposta imune, o tempo de permanência do bolo alimentar no trato e o aproveitamento de alguns nutrientes pouco digestíveis pelas enzimas endógenas do animal (AMIT-ROMACH et al., 2004).

Muitas pesquisas estão sendo conduzidas focadas no estudo das interações entre a nutrição e a microbiota do papo, intestinal e cecal.

Estima-se que a dieta pode proporcionar ao animal 15.000 componentes, sendo que desses, 8.000 são não nutrientes (WISHART, 2008). Esses compostos podem ter efeito quantitativo e qualitativo na microbiota intestinal. Essas moléculas propiciam um diálogo químico intestinal e podem ter uma grande importância na troca de informações entre a microbiota e o hospedeiro (MACARI et al, 2014).

Portanto, o entendimento e monitoria do dinamismo do ecossistema microbiano intestinal são fundamentais para o desenvolvimento de alternativas ou

produtos para modular a microbiota intestinal e melhorar o desempenho ou reduzir os fatores estressantes e controlar doenças entéricas em criações comerciais.

Tabela 7. Peso vivo e rendimento da carcaça e de cortes comerciais de frangos de corte ao abate suplementados ou não com β -mananase e criados em condições comerciais

		Peso vivo	Carcaça	Pés	Gordura	Coração	Asa	Peito	Filé
		G	%	%	%	%	%	%	%
Com enzima	Fêmeas	2729,94	72,67	4,09	2,91	0,55	11,00	26,64	6,70
Com enzima	Machos	3482,28	72,80	5,08	1,93	0,54	10,86	27,70	5,82
Sem enzima	Fêmeas	2722,67	72,12	4,44	3,03	0,54	10,85	26,66	7,11
Sem enzima	Machos	3458,45	72,75	4,90	2,10	0,58	10,98	27,79	6,22
Enzima									
Sem		3090,56	72,44	4,67	2,57	0,56	10,92	27,23	6,67 ^a
Com		3106,11	72,74	4,58	2,42	0,55	10,93	27,17	6,26 ^b
Sexo									
Fêmeas		2726,31 ^b	72,40	4,27 ^b	2,97 ^a	0,55	10,93	26,65	6,91 ^a
Machos		3470,36 ^a	72,78	4,99 ^a	2,01 ^b	0,56	10,92	27,74	6,02 ^b
CV, %		13,78	1,99	11,32	35,47	14,42	5,18	6,71	8,36
Enzima		0,7682	0,4250	0,2516	0,4249	0,5562	0,9538	0,9377	0,0221
Sexo		<0,0001	0,2510	<0,0001	<0,0120	0,3769	0,9888	0,1903	<0,0001
Enzima x Sexo		0,8621	0,4492	0,1113	0,9028	0,2682	0,7503	0,9601	0,9882

Conclusão

Em condições comerciais, a suplementação das dietas com β -mananase não trouxe benefícios na qualidade intestinal e no rendimento de carcaça de frangos de corte.

O perfil imunológico das aves que receberam a suplementação enzimática não apresentou diferenças em relação as aves controle.

A população da microbiota intestinal das aves diferiu entre os aviários independente da suplementação com a enzima.

A β -mananase não trouxe vantagens produtivas para os frangos de corte em condições comerciais.

Referências

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v. 83, p. 1093-1098, 2004.

APAJALAHTI, J.H.A.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 223-232, 2004.

APAJALAHTI, K.H.A.; KETTUNEN, H.; KETTUNEN, A.; HOLBEN, W.E.; NURMINEN, P.H.; RAUTONEN, N.; MUTANEN, M. Culture-independent microbial community analyses reveals that inulin in diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4986-4995, 2002.

BEIRÃO, B.C.B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BURKHOLDER, K. M.; THOMPSON, K. L.; EINSTEIN, M. E.; APPLGATE, T.J.; PATTERSON, J.A. Influence of Stressors on Normal Intestinal Microbiota, Intestinal Morphology, and Susceptibility to Salmonella Enteritidis Colonization in Broilers. **Poultry Science**, v. 87, n. 9, p. 1734-1741, 2008.

CHOCT M., DERSJANTLI Y., MCLEISH J., PEISKER M. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive

effects in pigs and poultry. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 23, p. 1386-1398, 2010.

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 319–46, 2005.

DALE, N. Enzyme use likely to expand. **Poultry Times**, v. 49, p. 5-8, 2002.

DANICKE, S.; VAHJEN, W.; SIMON, O. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium, on transit time of feed, and on nutrient digestibility. **Poultry Science**, v. 78, p. 1292-1299, 1999.

DHAWAN, S., KAUR, J. Microbial mananases: an overview of production and application. **Critical Review in Biotechnonology**, v. 27, p. 197-216, 2007.

FERNANDES, T. **Perfil imunológico de frangos de corte frente a imunomoduladores e sua correlação com o peso corporal**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GILBERT, C.; COONEY, G. Thermostability of feed enzymes and their practical application in the feed mill. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2ed. Oxfordshire: CAB International, 2011. p. 249-259.

GRACIA, M.I.; LATORRE, M.A.; GARCÍA, M.; LÁZARO, L.; MATEOS, G.G. Heat processing of barley and enzyme supplementation of diets for broilers. **Poultry Science**, v. 82, p. 1281-1291, 2003.

ZHU, H.L.; HU, L.L.; HOU, Y.Q.; ZHANG, J.; DING, B.Y. The effects of enzyme supplementation on performance and digestive parameters of broilers fed corn-soybean diets. **Poultry Science**, v. 93, p. 1-9, 2014.

HUMPHREY B.D., KLASING K.C. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 90-100, 2007.

JACKSON, M.E.; ANDERSON, D.M.; HSIAO, H.Y.; MATHIS, G.F.; FODGE, D.W. Beneficial effect of β -mananase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. **Avian Diseases**. 47: 759 – 763, 2003.

JACKSON, M.E.; GERONIAN, K.; MCNAB, J.; MCMARTNEY, E. A dose-response study with the feed enzyme β -mannanase in broilers provided with corn-soybean meal based diets in the absence of antibiotic growth promoters. **Poultry Science**, v. 83, p. 1992-1996, 2004.

JARONI, D.; SCHEIDELER, S.E.; BECK, M.M.; WYATT, C. The effect of dietary wheat middlings and enzyme supplementation II: Apparent nutrient digestibility, digestive tract size, gut viscosity, and gut morphology in two strains of Leghorn hens. **Poultry Science**, v. 78:, p. 1664-1674, 1999.

KANEKO, M.; MIZUNUMA, T.; TAKIMOTO, H.; KUMAZAWA, Y. Development of TCR alpha beta CD8 alpha alpha intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by interleukin-15-producing epithelial cells constitutively stimulated by gram-negative bacteria via TLR4. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 883-889, 2004.

KISIELINSKI, K., S. WILLIS, A. PRESCHER, B. KLOSTERHALFEN, AND V. SCHUMPELICK. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, p. 131-135, 2002.

LUNEDO, R; FERNANDEZ-ALARCON, M.F.; CARVALHO, F.M.S.; FURLAN, L.R.; MACARI, M. Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize-or sorghum-fed broiler chickens using real-time PCR. **British Poultry Science**, v. 55, p. 795-803, 2014.

MACARI, M.; LUNEDO R.; PEDROSO, A.A. Microbiota intestinal das aves. IN: MACARI, M.; MENDES, A.A.; MENTEN, J.F.; NASS, I.A. *Produção de frangos de corte*. **Aves domésticas – produção de frangos de corte**. 2. ed. Campinas: Facta, 2014. p. 299-320.

MATHLOUTHI, N.; LALLÈS, J.P.; LEPERCQ, P.; JUSTE, C.; LARBIER, M. Xylanase and β -glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chicks fed a rye-based diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2773-2779, 2002.

MONTANHINI R.N., CECCANTINI M.L., FERNANDES J.I.M. Productive performance, intestinal morphology and carcass yield of broilers fed conventional and alternative diets containing commercial enzymatic complex. **International Journal of Poultry Science**, v. 11, p. 505-516, 2012.

MUSHTAQ, T.; SARWAR, M.; AHMAD, G.; MIRZA, M.A.; NAWAZ, H.; HAROON MUSHTAQ, M.M.; NOREEN, U. Influence of canola meal-based diets supplemented with exogenous enzyme and digestible lysine on performance, digestibility, carcass, and immunity response of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, p. 2144-2155, 2007.

OVIEDO-RONDÓN, E.O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 209-225, 2009.

PEDROSO, A.A.; MAURER, J.; CHENG, Y.; LEE, M. D. Remodeling the intestinal ecosystem toward better performance and intestinal health. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v. 21, p. 432-443, 2012.

PICKLER, L.; HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; MIGLINO, L.B.; CARON, L.F.; BEIRÃO, B.C.B.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis* e *Minnesota* e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 27-36, 2012.

RESENDE, F.M.S. **Análise físico-químicas e virucidas da fermentação com cobertura e sem amontoamento da cama de aves**. Dissertação (Mestrado em

Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2010.

TIZARD, I.R. Veterinary Immunology: An Introduction. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996.

WISHART, D.S. Metabolomics:a complementary tool in renal transplantation. **Contributions to Nephrology**, n. 60, p. 76-87, 2008.

YIN, Y., LEI, F., LIYING, Z., LI, S., WU, Z., ZHANG, R., GAO, G. F., ZHU, B., WANG, X. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. **Isme Journal**, v. 4, p. 367-376, 2010.

ZHU, H.L.; HU, L.L.; HOU, Y.Q.; ZHANG, J.; DING, B.Y. The effects of enzyme supplementation on performance and digestive parameters of broilers fed corn-soybean diets. **Poultry Science**, v. 93, p. 1-9, 2014.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A comunidade bacteriana intestinal é como um “organismo vivo dentro do organismo da ave”. As condições que permitem o seu desenvolvimento dependem do equilíbrio entre espécies e dos fatores proporcionados pelo seu hospedeiro, como a dieta e as condições sanitárias dos aviários.

Assim, estratégias nutricionais poderiam ser pensadas como controladoras de microbiota. O uso de aditivos, como enzimas, ácidos orgânicos, probióticos, prebióticos e óleos essenciais podem ser considerados moduladores de estrutura e distribuição das espécies da comunidade microbiana do trato gastrintestinal.

A utilização de β -mananase em dietas a base de milho e farelos de soja não foi efetiva em melhorar as características de desempenho, morfometria intestinal e reposta imune ou ainda na modulação da microbiota intestinal.

Entretanto, alguns resultados indicam interação da mananase e as condições sanitárias das aves. Na semana após o desafio, as aves que consumiram dietas controle e foram desafiadas apresentaram maior proporção de populações de linfócitos T CD8 ativados. Aos 42 dias de idade, aves não desafiadas e suplementadas com a enzima apresentam maiores proporções de CD4 gerais em relação ao grupo que não recebeu enzima. Observou-se maior profundidade de cripta, menor relação vilos:cripta e maior número de células caliciformes nas aves desafiadas e aos 42 dias, as aves desafiadas apresentaram maior relação vilos:cripta, menor número de células caliciformes. Já, as aves que receberam a suplementação enzimática apresentaram uma menor profundidade de cripta, o que resultou na melhor relação vilos:cripta.

Em relação a microbiota intestinal, observou-se que independente da presença da *Eimeria* sp., que a suplementação de β -mananase aumentou o número de espécies e a diversidade no intestino delgado e aumentou a diversidade no ceco.

Apesar do milho e farelo de soja serem enquadrados no grupo de alimentos de baixa viscosidade, o teor de PNAs no farelo de soja é significativo, cerca de 30,2%, enquanto que no milho, há uma limitação em relação à disponibilidade de amido, pois normalmente está localizado dentro do endosperma e das células que o compõem, dificultando a ação das enzimas. O fato de as enzimas serem muito específicas na sua reação catalítica determina que os produtos que contenham só

uma enzima, como neste experimento, sejam insuficientes para produzir máximo benefício como suplemento em dietas avícolas. Isso sugere que misturas de enzimas ou complexos enzimáticos sejam mais efetivos, pois, podem atuar de forma mais genérica sobre carboidratos solúveis e insolúveis, levando ao melhor aproveitamento da dieta. A especificidade das enzimas requer conhecimento da composição dos nutrientes não normalmente digestíveis por enzimas exógenas ou digeridas com baixa eficiência.

Portanto, pesquisas são necessárias para um melhor domínio do perfil de substratos presentes nas matérias primas, associado ao desenvolvimento de recursos analíticos práticos e viáveis de serem implantados pelo controle de qualidade das fábricas de rações. Além disso, a melhor compreensão sobre a interação entre os compostos vegetais não-digeríveis, seus metabólitos intestinais, a microbiota intestinal e o hospedeiro abrirá novas possibilidades de produzir novos aditivos nutricionalmente otimizados que promovem a saúde do hospedeiro, através do desenvolvimento da comunidade microbiana específica do intestino.