

EFEITO DA IMUNOMODULAÇÃO E DA INTEGRIDADE INTESTINAL DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURA EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS*

LILIANA L. BORGES¹, MELINA A. BONATO¹, RICARDO L. C. BARBALHO¹, BRENO C. B. BEIRÃO²

¹ICC Industrial Comércio Exportação e Importação Ltda., São Paulo, Brasil. ²Imunova Análises Biológicas Ltda ME., Curitiba, Brasil.

Contato: liliana.borges@iccbrasil.com.br

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos imunológicos e a dinâmica da integridade intestinal em frangos de corte tratados com parede celular de levedura (PCL) desafiados com *Salmonella* Enteritidis (SE). As aves foram alojadas em isoladores com 1 dia de idade e divididas em 4 tratamentos: G1-Desafio com SE e não tratadas; G2- Aves não desafiadas e tratadas com PCL (0,5 kg/ton); G3-Aves não desafiadas e não tratadas; G4-Desafio com SE e tratadas com PCL (0,5 kg/ton). O desafio foi feito oralmente aos 2 dias com 10^8 UFC/mL/ave. Foram avaliados permeabilidade da mucosa intestinal; células imunes circulantes; atividade de macrófagos e heterófilos; e IgA específica para SE nas fezes. O período experimental foi até 21 d. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Aos 4 dias, o G1 apresentou o maior marcador de passagem no sangue em comparação ao grupo tratado (G4). Os grupos desafiados apresentaram maiores quantidades de células imunes. As células fagocíticas aumentaram com o desafio SE aos 8 dias e o PCL reduziu este efeito. O grupo G4 apresentou maior média de IgA anti-*Salmonella*. O desafio com o SE modificou todos os sistemas avaliados, no entanto, a integridade intestinal melhorou com a presença do PCL.

Palavras Chave: *Saccharomyces cerevisiae*; β -glucanas; MOS, permeabilidade intestinal; IgA

Yeast cell wall immunomodulatory and intestinal integrity effects on broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis

Abstract: The objective of this study was to evaluate the immune effects and the intestinal integrity dynamics in broilers treated with yeast cell wall (YCW) in a challenging situation with *Salmonella* Enteritidis (SE). The birds were housed in isolators at 1 day-old and divided into 4 treatments: G1- Challenge with SE and not treated; G2- Birds not challenged and treated with YCW (0.5 kg/MT); G3- Birds not challenged and not treated and; G4- Challenge with SE and treated with YCW (same dosage). The birds were orally challenged at 2 d with 10^8 CFU/mL/bird. Were evaluated intestinal mucosa permeability; circulating immune cells; phagocytosis activity of macrophages and heterophils; and specific IgA for SE in feces. The experimental period was until 21 d. The data were analyzed by ANOVA and the means compared by Tukey test at 5% of significance. At 4 d G1 presented the highest passing marker in the blood compared to the treated group (G4). Challenged groups presented higher amounts of the immune cells. Phagocytic cells increased with SE challenge at 8 d, and the YCW decreased this effect. The G4 group provided a highest average amount of anti-*Salmonella*. The challenge with SE induced changes in all evaluated systems; however, the intestinal integrity improved with the presence of the YCW.

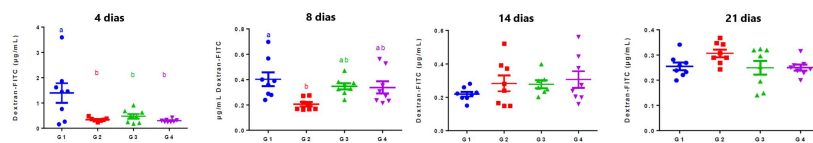
Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; β -glucans; MOS; intestinal permeability; IgA

Introdução: A *Salmonella* é uma das causas primárias de intoxicações alimentares no mundo, sendo considerado um relevante problema de saúde pública e os surtos geralmente estão associados com o consumo de carnes ou ovos contaminados. Assim sendo, oferecer alimentos livres de *Salmonella* aos consumidores finais é um dos grandes objetivos da indústria de produção de alimentos (BRASIL, 2016). Aditivos à base de levedura tem sido estudados e seus benefícios estão diretamente relacionados com a melhora da saúde intestinal. A parede celular de levedura é composta principalmente por β -glucanas e mananoligossacarídeos (MOS), os quais agem sobre o sistema imunológico e previnem a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal. Assim sendo, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos imunes e a dinâmica da integridade intestinal em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e tratados com parede celular de levedura.

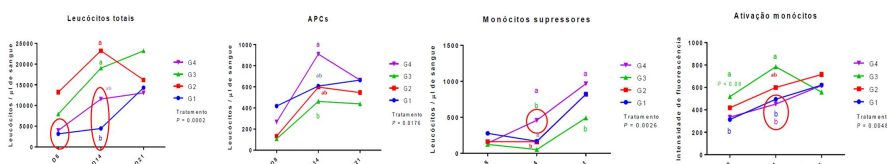
Material e Métodos: Foram utilizados 100 pintos de corte Cobb 500 de um dia de idade, alojados em isoladores e distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos: G1 - Aves desafiadas com SE e não tratadas/medicadas; G2- Aves não desafiadas e suplementadas com PCL (*Saccharomyces cerevisiae*, ImmunoWall da ICC Brasil, a 0,5 kg/ton); G3- Aves não desafiadas e não tratadas/medicadas e; G4- Aves desafiadas com SE e tratadas com PCL (mesma dosagem). As aves foram desafiadas oralmente aos dois dias com 10^8 UFC/mL/ave. A SE foi quantificada pelo método do NMP (número mais provável) nas amostras de ceco e papo, aos 8, 14 e 21 dias. Permeabilidade da mucosa intestinal foi avaliada em 8 aves/tratamento aos 4, 8, 14 e 21 dias através da passagem de um marcador (Dextran-FITC, 3-5 kD) do lúmen intestinal para o sangue. Os subgrupos de células imunes circulantes e suas atividades (leucócitos totais, APCs, monócitos, linfócitos T auxiliares, linfócitos T auxiliares de mucosas, linfócitos T citotóxicos de mucosas e linfócitos T citotóxicos ativados) foram avaliados aos 8, 14 e 21 dias através de citometria de fluxo. IgA específico para SE a partir de amostras de excretas também foi avaliado aos 14 dias através de imunohistoquímica. Aos 14 dias, foram coletadas amostras de íleo e ceco para quantificação de células inflamatórias, heterófilos e hemácias na lâmina própria células calciformes das vilosidades. O período experimental foi até 21 dias. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultado e Discussão: Aos quatro dias, a PCL no grupo com SE (G4) reduziu a passagem do marcador no sangue em relação ao G1 (P <0,05), indicando melhora da integridade intestinal (Gráfico 1). A quantidade total de leucócitos circulantes foi maior (P <0,05) nos grupos não desafiados (G2 e G3), no entanto, os grupos

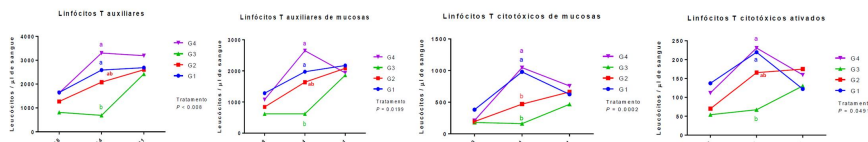
desafiados apresentaram maiores quantidades dos subtipos de células como APCs, monócitos, monócitos supressores e a série de linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos (Gráficos 2 e 3). O grau de ativação de monócitos elevou-se ($P < 0,05$) no G3 aos oito e aos 14 dias (Gráfico 2). As células fagocíticas aumentaram com o desafio SE aos oito dias, e o PCL diminuiu ($P < 0,05$) este efeito. De acordo com o gráfico 4, observamos que o G4 apresentou a maior média ($P < 0,05$) de IgA anti-Salmonella. Os resultados de histopatologia (Tabela 1) mostram que o íleo apresentou menor área de lâmina própria (LP) no G2, comparado ao G3 e G4 ($P < 0,05$). Da mesma forma, houve menor contagem de células inflamatórias (CI) no G2, diferentemente do G1. O número de eritrócitos foi menor no G1, assim como as células caliciformes encontrados em menor quantidade no G1 e G2 vs. G3 e G4. No ceco, houve menor área de LP no G3 e G2, e menor CI no G2 ($P < 0,05$). A maior contagem de hemácias foi observada no G3 e no G4 e a maior presença de células caliciformes no G4 ($P < 0,05$). A presença das β -glucanas 1,3/1,6, presentes na PCL estimula o sistema imune inato dos animais, deixando-os mais preparado para infecções por patógenos (COX & DALLOUL, 2010), como foi mostrado no presente estudo.



G1: Controle+SE; G2: PCL; G3: Controle; G4:PCL+SE
Diferenças indicadas foram calculadas por análise de variância de uma via (one-way ANOVA) com teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$).
Gráfico 1. Permeabilidade intestinal de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis e tratados com parede celular de levedura.



G1: Controle+SE; G2: PCL; G3: Controle; G4:PCL+SE
Relevância estatística está indicada por letras diferentes sobre cada grupo. Teste de ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$, exceto quando indicado em contrário). Diferenças entre os grupos no conjunto das três coletas estão indicadas pelo respectivo P à direita de cada gráfico.
Gráfico 2. Leucócitos totais, APCs (células apresentadoras de antígenos), monócitos supressores e monócitos ativados de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis e tratados com parede celular de levedura.



G1: Controle+SE; G2: PCL; G3: Controle; G4:PCL+SE
Relevância estatística está indicada por letras diferentes sobre cada grupo. Teste de ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$, exceto quando indicado em contrário). Diferenças entre os grupos no conjunto das três coletas estão indicadas pelo respectivo P à direita de cada gráfico.
Gráfico 3. Linfócitos T auxiliares, linfócitos T auxiliares de mucosas, linfócitos citotóxicos de mucosas e linfócitos T citotóxicos ativados de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis e tratados com parede celular de levedura.

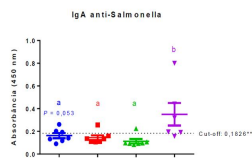


Gráfico 4. IgA anti *Salmonella* de amostras de sangue de frangos aos 14 dias desafiados com *Salmonella* Enteritidis e tratados com parede celular de levedura.

Tabela 1. Histopatologia das vilosidades do íleo e ceco aos 14 dias de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis e tratados com parede celular de levedura.

Tratamentos	Íleo					Ceco				
	Área média da LP (μm^2)	CI	Hemácias	Heterófilos	Caliciformes	Área média da LP (μm^2)	CI	Hemácias	Heterófilos	Caliciformes
G1: Controle+SE	9,37 ^{ab}	36,45 ^a	2,45 ^b	0,80	26,31 ^b	6,27 ^b	25,51 ^b	2,25 ^b	1,58	7,60 ^{ab}
G2: IMW	7,76 ^a	21,86 ^b	5,43 ^{ab}	1,55	22,16 ^b	4,28 ^a	10,60 ^a	1,46 ^b	0,75	4,62 ^b
G3: Controle	12,42 ^a	31,43	7,41 ^a	1,36	37,36 ^a	3,24 ^a	19,56 ^b	3,56 ^a	0,63	8,35 ^{ab}
G4: IMW+SE	10,42 ^a	29,38 ^{ab}	7,21 ^a	1,38	41,01 ^a	7,10 ^a	19,23 ^b	4,43 ^a	1,36	12,73 ^a
Valor de P	0,0603	0,0104	0,0213	0,2498	0,0022	0,0006	0,0002	0,0025	0,0409	0,039

Área média da LP: área média da lâmina própria (μm^2). CI: células inflamatórias em lâmina própria.
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa para o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Conclusão: O desafio com o *Salmonella* Enteritidis induziu alterações em todos os sistemas avaliados, no entanto, a integridade intestinal e alguns parâmetros imunológicos foram melhorados pela parede celular de levedura na dieta em aves desafiadas.

Referências Bibliográficas: COX, C. M.; DALLOUL, R. A. Beta-glucans as immunomodulators in poultry: use and potential applications. *Avian Biology Research*, v.3, n.4, p.171-178, 2010. BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília, DF. 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>