

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA INOCULAÇÃO VIA ESOFÁGICA DE
MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A HEMATOLOGIA,
DESENVOLVIMENTO E INTEGRIDADE INTESTINAL DE
PINTOS DE CORTE.**

Dayane Lilian Pires
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA INOCULAÇÃO VIA ESOFÁGICA DE
MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A HEMATOLOGIA,
DESENVOLVIMENTO E INTEGRIDADE INTESTINAL DE
PINTOS DE CORTE.**

Dayane Lilian Pires

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel C. Boleli

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Produção Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2008

P667e Pires, Dayane Lilian
Efeito da inoculação via esofágica de microbiota intestinal sobre a hematologia, desenvolvimento e integridade intestinal de pintos de corte / Dayane Lilian Pires. – – Jaboticabal, 2008
i, 96 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Isabel Cristina Boleli
Banca examinadora: Renato Luiz Furlan, Luciana Thie Seki Dias
Bibliografia

1. Microbiota intestinal. 2. Pintos de corte. 3. Hematologia. 4.
Intestino Delgado. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.5:591.11

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DAYANE LILIAN PIRES – Nasceu em Ribeirão Preto– SP no dia 30 de dezembro de 1980, graduou-se em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal em julho de 2005. Em agosto de 2005 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia pela FCAV – Campus de Jaboticabal, na área de Biologia de Desenvolvimento Animal.

A Deus, por sempre iluminar e permitir meu percurso neste caminho, por me dar forças para enfrentar os obstáculos e conceder-me a graça de dispor da ajuda e amizade de muitas pessoas;

Aos meus pais, Valdir e Sandra, aos meus irmãos Régis, Larissa e Murilo, pelo apoio, confiança, amizade, compreensão e amor;

À minha orientadora, prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Boleli, pela orientação, disposição, ajuda e amizade.

DEDICO

Ao meu companheiro, Eduardo, por todo o amor dedicado, ajuda incondicional, paciência, companheirismo, apoio nos momentos mais difíceis, confiança, carinho e respeito.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista – “Julio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Produção Animal), pela excelência para minha formação.

Aos professores Dr^a. Luciana Thje Seki Dias e Dr. Renato Luiz Furlan pela colaboração e esclarecimentos.

Ao Sr. Orandi, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, pela grande ajuda técnica e amizade.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos colegas que muito me ajudaram, Elton, Viviane, Vanessa, Flávia, Michaela e especialmente a grande amiga Eliana.

À Tiêko, funcionária da biblioteca, pela ajuda na correção das revisões bibliográficas.

Aos funcionários do aviário Robson, Izildo, Vicente e Sr. João, pela ajuda durante a criação das aves.

Aos amigos Pricila, Luana, Aline, Eliana, Ary e Marita que mesmo distante estão sempre presentes em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Objetivo	9
Referências.....	10
CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO VIA ESOFÁGICA DE MICROBIOTA INTESTINAL DE AVES ADULTAS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PINTOS DE CORTE	18
Introdução	20
Material e Métodos	21
Resultados	23
Discussão	36
Conclusões	38
Referências.....	39
CAPÍTULO 3 – AQUISIÇÃO PRECOCE DE MICROBIOTA INTESTINAL AUMENTA A DEFESA DO INTESTINO DELGADO DE PINTOS DE CORTE	42
Introdução	44
Material e Métodos	45
Resultados	49
Discussão	63
Conclusões	66
Referências.....	68
CAPÍTULO 4 – AQUISIÇÃO DE MICROBIOTA INTESTINAL INFLUENCIA A ALTURA E DENSIDADE DOS VILOS E A PROFUNDIDADE DAS CRIPTAS DO INTESTINO DELGADO DE PINTOS DE CORTE.....	72
Introdução	74
Material e Métodos	75
Resultados	77
Discussão	90
Conclusões	93
Referências.....	94

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

A avicultura de corte vem apresentando constante crescimento nos últimos anos. O crescimento da industrialização e a existência de um mercado globalizado têm exigido dos produtores rurais a utilização de modernas tecnologias relacionadas à produção animal.

Antes da introdução dos sistemas de produção intensiva atualmente preconizados, os pintainhos recém eclodidos permaneciam junto às mães, ingerindo microorganismos existentes no solo, incluindo, os presentes nas fezes das aves adultas, o que lhes proporcionava a aquisição de uma microbiota intestinal já nos primeiros dias de vida. No sistema de produção avícola atual, com a eliminação do contato entre a geração paternal e sua prole e a utilização de um sistema de higiene e desinfecção eficientes, ocorre um atraso na aquisição e desenvolvimento da microbiota intestinal, o que deixa os pintainhos vulneráveis a infecções por enteropatógenos (FOWLER & MEAD, 1989).

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro, podendo ser modulada pela composição da dieta (TANNOCK, 1998). Grandes variações na digestibilidade de nutrientes ocorrem em função da idade do animal (NIR *et al.* 1988; DOESCHATE *et al.* 1993), as quais, segundo BENÍCIO (1996), são determinadas pela quantidade e pelo tipo de microorganismos que colonizam o trato gastrointestinal.

A população microbiana normal do trato intestinal age no hospedeiro como uma barreira de defesa, através da criação de um meio ambiente nocivo aos microorganismos patogênicos (MILES, 1993). Esse efeito protetor da microbiota intestinal contra a colonização por patógenos é conhecido há muitos anos e tem sido amplamente aceito (PARRA, 1994).

Atualmente faz-se necessário utilizar alternativas para suprir essa deficiência na aquisição da microbiota intestinal natural (VAZQUEZ, 1997), o que tem despertado o interesse pelo uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. Os probióticos são introduzidos como aditivos na ração e contribuem para um melhor estabelecimento e manutenção de populações microbianas no trato digestório dos animais, competindo com microrganismos indesejáveis, especialmente os patogênicos, por espaço e nutrientes (LIMA *et al.* 2003). Quando são usados na alimentação de aves, os probióticos melhoram a eficiência alimentar, proporcionam melhor qualidade ao alimento, atuam como promotor natural de crescimento, diminuem as perdas devido a doenças infecciosas e reduzem os sintomas de estresse (KOZASA, 1989).

Outra forma de suprir a deficiência na colonização do trato digestório de pintos recém-eclodidos é a inoculação via esofágica de microbiota intestinal natural de aves adultas utilizada no método de exclusão competitiva para impossibilitar que uma população de microrganismos patógenos se estabeleça no intestino (DAY, 1992).

Microbiota Intestinal Natural

A microbiota intestinal desempenha importância vital no que se refere à nutrição, fisiologia e imunologia do animal hospedeiro. Esta microbiota intestinal é composta de uma mistura complexa de microrganismos, incluindo bactérias, protozoários ciliados e flagelados, fungos e bacteriófagos (LEEDLE, 2000).

GEDEK (1986) relatou que a microbiota natural do trato gastrointestinal é de difícil definição e composta por aproximadamente 400 espécies em equilíbrio entre si e com o hospedeiro. Estima-se que noventa por cento da microbiota intestinal seja composta por bactérias facultativas (aeróbicas e anaeróbicas) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*), incluindo as bactérias exclusivamente aeróbicas como os *Bacterioides spp*, *Fusobacterium spp* e *Eubacterium spp*. Os dez por centos restantes desta microbiota intestinal são constituídos de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas a *Escherichia coli*, *Clostridium spp*.

Como já mencionado anteriormente, em condições naturais, aves jovens obtêm sua microbiota intestinal por contato direto com a mãe e com o meio ambiente. A formação desta microbiota intestinal se dá imediatamente após o nascimento, e aumenta durante as primeiras semanas de vida (MACHADO, 2000). Segundo SAVAGE (1987) e MILES (1993), os microrganismos que primeiro se estabelecem, na maioria dos casos, são aqueles que colonizam e persistem durante toda a vida do animal.

O equilíbrio entre os diferentes componentes da microbiota intestinal parece ser fundamental para o funcionamento normal e saudável da função digestiva e geral do hospedeiro. Sendo assim, a presença da microbiota intestinal normal, em equilíbrio, é tão necessária quanto benéfica para o bem-estar do animal (CORNELI, 2004).

A colonização intestinal por inoculação de microbiota nas primeiras horas após o nascimento desenvolve-se rapidamente, formando uma barreira de defesa que previne o estabelecimento e multiplicação das bactérias patogênicas, como as *Salmonella* (FOWLER & MEAD, 1989; OLIVEIRA *et al.* 2000; STERZO *et al.* 2005), *E. coli* (HOFACRE *et al.* 2002; SOERJADI-LIEM *et al.* 1981; WEINACK *et al.* 1981; WEINACK *et al.* 1982; WEINACK *et al.* 1984; STAVRIC *et al.* 1992 e HAKKINEN & SCHNEITZ, 1996), *Yersinia enterocolitica* (SOERJADI-LIEM *et al.* 1984b) e *Campylobacter jejuni* (SOERJADI-LIEM *et al.* 1982; SOERJADI-LIEM *et al.* 1984a; HAKKINEN & SCHNEITZ, 1999; STERN *et al.* 2001).

STERZO (2007) analisou a eficácia da utilização da inoculação via esofágica de microbiota intestinal de ave adulta antes e após infecção experimental por *Salmonella enteritidis*, verificando que a colonização intestinal realizada precocemente, ou seja, antes da infecção, evita a colonização intestinal pela bactéria patogênica.

Além do controle do patógeno, GOREN *et al.* (1984) relataram que inoculação intestinal de microbiota de aves adultas, o tratamento de exclusão competitiva (EC), melhora o crescimento e diminui a mortalidade das aves. De acordo com os mesmos autores, houve melhoria na taxa de crescimento de frangos que foram pulverizadas com microflora intestinal. Inoculação de microbiota

cecal após eclosão promove maior peso corporal, melhor conversão alimentar, e menor mortalidade (ABU-RUWAIDA *et al.* 1995 ; BOLDER *et al.* 1995 ; CORRIER *et al.* 1995).

Conforme descrito por FULLER (1989), os probióticos são produtos constituídos por microorganismos vivos que, uma vez introduzidos no organismo animal, influenciam benéficamente o hospedeiro através da melhoria do balanço microbiano intestinal.

Isso tem levado vários pesquisadores a analisar os efeitos da introdução de probióticos como aditivos na alimentação de frangos de corte. ANDREATTI FILHO & SAMPAIO (1999) relataram que os probióticos devem ser utilizados o mais cedo possível nas aves, a fim de que as bactérias presentes nos mesmos colonizem e multipliquem-se no trato intestinal das aves, iniciando suas atividades benéficas ao hospedeiro antes desse ser contaminado por algum patógeno.

Os mecanismos de ação dos probióticos na melhoria da digestibilidade e, conseqüentemente, na melhora no desempenho de frangos de corte podem ser resumidos à redução do pH, resultante da produção de ácidos orgânicos, e ao crescimento e desenvolvimento diferenciados das bactérias, criando-se um ambiente de exclusão competitiva (CORNELI, 2004).

Trato Gastrintestinal

Na eclosão, o sistema digestório da ave está anatomicamente completo, mas sua capacidade funcional de digestão e absorção ainda está imatura, se comparado à de aves adultas (OVERTON & SHOUP, 1964; CHAMBERS & GREY, 1979 citados por MAIORKA *et al.* 2002). Assim, pós-eclosão, o trato gastrintestinal sofre grandes alterações, como maturação funcional do intestino, as quais envolvem mudanças morfológicas e fisiológicas que proporcionam um aumento na área de superfície de digestão e de absorção. Segundo IMONDI & BIRD (1966), BARANYIOVA (1972) e BARANYIOVA & HOLMAN (1976), as alterações morfológicas mais significativas são: aumento no comprimento do intestino, na altura e densidade dos vilos e, conseqüentemente, no número de enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas.

As vilosidades ou vilos, que as aves apresentam ao longo do intestino proporcionam aumento na superfície interna do órgão, ou seja, na área de digestão e absorção intestinal. Para que essas áreas funcionem plenamente é fundamental a presença de alimento no intestino delgado (BARANYOVA, 1972; BARANYOVA & HOLMAN, 1976). A altura e a forma do vilo variam ao longo do intestino, sendo que, no duodeno os vilos são normalmente mais longos e digitiformes, enquanto que no jejuno e íleo geralmente se apresentam de forma lameliformes com aspecto folheáceo. Os vilos são revestidos por epitélio simples, constituído por três tipos celulares estruturais: as células caliciformes, os enterócitos e as células enteroendócrinas, que são responsáveis pela defesa, digestão e absorção, e regulação desses processos pela proliferação e diferenciação dos mesmos (BOLELI *et al.* 2002).

O processo de desenvolvimento da mucosa intestinal consiste primariamente de dois eventos citológicos associados: renovação celular e perda de células. O equilíbrio entre esses dois processos chama-se *turnover* celular. A mucosa do trato gastrointestinal tem uma característica única entre os tecidos do frango de corte que é a de ter a mais alta taxa de *turnover* de todos tecidos do corpo.

Conforme mencionado por MAIORKA *et al.* (2002), o equilíbrio entre esses dois processos (proliferação e extrusão) possibilita a manutenção do tamanho dos vilos e, portanto, a manutenção da capacidade digestiva e absorptiva.

Quando o intestino responde a algum agente com desequilíbrio da renovação celular ("*turnover*") a favor de um desses processos, ocorre modificação na altura dos vilos. Assim, se ocorrer aumento na taxa de mitose com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, deverá haver aumento no número de células e, conseqüentemente, aumento no tamanho dos vilos. Se o estímulo levar ao aumento na taxa de extrusão, havendo manutenção ou diminuição da taxa de proliferação, o intestino deverá responder com redução no tamanho dos vilos e, conseqüentemente, com diminuição em sua área de digestão e absorção. O maior ou menor desenvolvimento da mucosa intestinal é avaliado por meio de dados morfométricos do tamanho e número de vilos, da profundidade

das criptas, altura do epitélio, altura e número de microvilos enterocíticos e integridade da mucosa ou perda de epitélio (STERZO, 2007).

Tem sido estimado que, para a manutenção do epitélio intestinal e estruturas de suporte anexas, o custo em energia representa aproximadamente 20% da energia bruta consumida pela ave (McBRIDE & KELLY, 1990, citado por MAIORKA *et al.* 2002).

Desta forma, a manutenção da mucosa intestinal em condições fisiológicas normais, tem custo energético elevado para o frango. A energia economizada pelo reduzido *turnover* de células no epitélio intestinal poderá ser utilizada para o desenvolvimento da massa muscular.

Em frangos de corte, é observado aumento mais acentuado na altura dos vilos no duodeno, o crescimento começa ainda no ovo, do 17º dia de incubação até o 7º dia pós-eclosão. No jejuno e íleo o crescimento continua até o 14º dia, resultando em aumento no número de enterócitos por vilo (UNI *et al.* 1998).

De maneira geral, o sistema digestório da ave nos primeiros dias de idade cresce mais rapidamente que o restante do corpo ou até mesmo os órgãos essenciais como coração e pulmões (NITSAN *et al.* 1991).

O intestino delgado é o principal órgão responsável pela digestão e absorção de nutrientes, assim quanto antes as aves alcançarem sua capacidade funcional, mais cedo poderão utilizar os nutrientes da dieta, crescer eficientemente e demonstrar seu potencial genético, resistir a infecções e doenças metabólicas (UNI & FERKET, 2004).

Segundo STERZO (2007), a inoculação via esofágica de microbiota intestinal de ave adulta, antes ou após a infecção por *Salmonella*, age sobre o epitélio do intestino delgado de pintos acentuando o processo de renovação celular. Este mesmo autor também verificou que a inoculação antes da infecção evita os efeitos negativos desta última sobre o desenvolvimento dos vilos duodenais e do íleo.

Várias pesquisas realizadas nos últimos anos mostraram resultados extremamente promissores pela adição de probióticos na dieta de frangos de corte. A administração de *Bacillus cereus* var. *toyoii* (CUEVAS *et al.* 2000) e

Bacillus subtilis (SANTOSO *et al.* 1995; FRITTS *et al.* 2000) na ração, aumentou o ganho de peso e melhorou a conversão alimentar de frangos de corte.

Bactérias do gênero *Lactobacillus*, adicionadas à ração, aumentaram o ganho de peso e melhoraram a conversão alimentar dos animais suplementados (JIN *et al.*, 1998a; JIN *et al.*, 1998b; KALAVATHY *et al.*, 2003). Da mesma forma, MORENO *et al.* (2002) comprovaram os efeitos positivos de probióticos de *Lactobacillus* sobre a digestibilidade e ganho de peso em frangos de corte.

Hematologia

O emprego da hematologia e de química sanguínea possibilita o estabelecimento de um diagnóstico rápido e definitivo, permitindo orientar e aprofundar a natureza de diversas situações fisiopatológicas que afetam as aves (CHARLES NORIEGA, 2000).

O hemograma fornece dados sobre a série vermelha ou eritrocítica [contagem de glóbulos vermelhos (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT) e volume corpuscular médio (MCV)] os quais fornecem dados sobre deficiências nutricionais e respiratórias, e dados da série branca ou leucocitária (contagem total e diferencial de leucócitos) que fornecem dados sobre a resposta imunocitária do organismo (NAKAGE, 2007).

Nas aves, os monócitos, macrófagos, heterófilos e linfócitos constituem os componentes celulares das respostas imunológicas (ELSBACH, 1980; POWELL, 1987; MORGULIS, 2002). Os trombócitos são células altamente fagocíticas (CAMPBELL & DEIN, 1984; CHARLES NORIEGA, 2000), enquanto que os monócitos possuem capacidade de fagocitar partículas estranhas, mas pouca capacidade regulatória (MORGULIS, 2002). A principal função dos heterófilos é de fagocitose (MORGULIS, 2002), e estes são importantes mediadores da imunidade natural das aves (HARMON, 1998). Os trombócitos circulam em grande número no sangue das aves e são células importantes na resposta imune inespecífica (GRECCHI *et al.*, 1980), e sua principal característica é a função fagocítica (CAMPBELL & DEIN, 1984; CHARLES NORIEGA, 2000).

O hematócrito permite avaliar a parte globular em uma amostra de sangue. Os valores normais variam com a idade. Baixo índice de hematócrito pode ser observado em doenças agudas ou crônicas, septicemias e doenças hemorrágicas (CAMPBELL & DEIN, 1984).

A concentração da hemoglobina é importante para determinar a capacidade de oxigenação tissular que prevalece nos seres vivos (CHARLES NORIEGA, 2000) e também para classificar um processo anêmico (STURKIE, 1976).

Os índices de Wintrobe (WINTROBE, 1933) - hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (MCV) - detectam a presença de anemia e avaliam a capacidade que a medula óssea tem de produzir hemácias de tamanho e capacidade metabólica normais, assim como o conteúdo de hemoglobina (citado por CARDOSO & TESSARI, 2003).

Conforme citado por HODGES (1977), o número de hemácias varia de acordo com as diferentes espécies aviárias, idade, sexo, influências hormonais e meio ambiente. CHARLES NORIEGA (2000) relatou que a contagem total de leucócitos é necessária para poder interpretar com maior certeza a natureza de uma infecção viral ou bacteriana quando se associa com a interpretação da contagem diferencial de leucócitos ou também quando se avalia o estado geral de um animal.

A contagem diferencial de leucócitos é de extrema importância para o diagnóstico de doenças aviárias (ANDERSON & STEPHENS, 1970) por estabelecer a porcentagem e a quantidade de cada tipo de leucócito que se encontra em uma determinada circunstância, e em conjunto com a contagem total é possível determinar o diagnóstico de maneira mais precisa (CHARLES NORIEGA, 2000).

A razão heterófilo: linfócito (H/L) tem sido considerada indicadora de estresse em vários estudos (GROSS & SIEGEL, 1980; DAVIDSON & FLACK, 1981; GROSS & SIEGEL, 1983; GONZALES *et al.* 2003; THRALL *et al.* 2004) e tem sido aplicada como critério de avaliação do desempenho na produção e reprodução de frangos (AL-MURRANI *et al.* 2006).

Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito da aquisição precoce de microbiota intestinal proveniente de aves adultas e saudáveis, poedeiras e de corte, sobre os parâmetros sangüíneos (hemograma) e intestinais (número de células caliciformes, altura e densidade de vilo, renovação epitelial e profundidade de cripta) de pintos de corte machos, durante a primeira semana pós-eclosão.

Referências

- ABU-RUWAIDA, A. S.; HUSSEINI, M.; BANAT, I. M. *Salmonella* exclusion in broiler chicks by the competitive action of adult gut microflora, **Microbios**, Cambridge, v. 83, n. 334, p. 59–69, 1995.
- AL-MURRANI, W. K.; AL-RAWI, A. J.; AL-HADITHI, M. F.; AL-TIKRITI, B. Association between heterophil/lymphocyte ratio, a marker of resistance to stress, and some production and fitness traits in chickens. **Br. Poult. Sci.**, London, v. 47, n. 4, p. 443-448, 2006.
- ANDERSON, E. L.; STEPHENS, J. F. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. **J. Appl. Microbiol.** Oxford, v. 19, n. 5, p. 726-730, 1970.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SAMPAIO H. M. Probióticos e prebióticos: Realidade na avicultura industrial moderna. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP.**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 59-71, 1999.
- BARANYIOVA, E. Influence of deutectomy, food intake and fasting on liver glycogen content in chickens after hatching. **Acta Vet. (Brno)**, Brno, v. 41, n. 1, p. 149-159, 1972.
- BARANYIOVA, E.; HOLMAN, J. Morphological changes in the intestinal wall in fed fasted chicken in the first week after hatching. **Acta Vet. (Brno)**. Brno, v. 45, p. 151-158, 1976.
- BENÍCIO, L. A. S. Restrição ao uso de aditivos (promotores de crescimento) em rações de aves – visão da indústria, São Paulo, SP, 1996. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS – APINCO, 1996, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: APINCO, 1996. p.17-26.
- BOLDER, N. M.; VEREIJKEN, P. F. G.; PUTIRULAN, F. F.; MULDER, R. W. A. W. The effect of competitive exclusion on the *Salmonella* contamination of broilers (a field study). In: THE ANNUAL MEETING OF EC COST WORKING GROUP, 2., 1995, Zaragoza. **Proceedings...** Zaragoza: Graficas Imprinter, 1995, p. 89-97.

- BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório
In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLES, E. (Ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 75-95.
- CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. Avian hematology. The basics. **Vet. Clin. North Am. J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 223-248, 1984.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 419-424, 2003.
- CHAMBERS, C.; GREY, R. D. Development of the structural components of the brush border in absorptive cells of the chick intestine. **Cell Tissue Res.**, New York, v. 204, n. 3, p. 387-405, 1979.
- CHARLES NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematología aviar**: material didático para curso de hematologia aviária. Cidade do México: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Producción Animal: Aves, 2000. 70 p. Apostila.
- CORNELI, J. **Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte**. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.
- CORRIER, D. E.; NISBET, D. J.; SCANLAN, C. M.; HOLLISTER, A. G.; DELOACH, J. R. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria, **Poult. Sci.**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 916–924, 1995.
- CUEVAS, A. C.; GONZÁLES, E. A.; HUGUENIN, M. T. C.; DOMINGUEZ, S. C. El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. **Veterinaria México**, México, v. 31, n. 4, p. 301-308, 2000.
- DAVIDSON, T. F.; FLACK, I. H. Changes in the peripheral blood leucocyte populations following an injection of corticotropin in the immature chicken. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 30, p. 79-82, 1981.
- DAY, C.A. *Competitive exclusion in poultry*: a review. Worcessershire: Life-Care Production, 1992. p. 18.

DOESCHATE, R. A. H. M.; SCHEELE, C. W.; SCHREURS, V. V. A. M.; VANDER KLIS, J. D. Digestibility studies in broiler chickens: influence of genotype, age, sex and method of determination. **Br. Poult. Sci.**, London, v. 34, n. 1, p. 131-146, 1993.

ELSBACH, P. Degradation of microorganisms by phagocytic cells. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 2, n. 1, p. 106-128, 1980.

FOWLER, N. G.; MEAD, G. C. Competitive exclusion and *Salmonella* in poultry. **Vet Rec.**, London, v. 11, n. 20, p. 512, 1989.

FRITTS, C.A.; KERSEY, J. H.; MOTL, M. A.; KROGER, E. C.; YAN, F.; SI, J.; JIANG, Q.; CAMPOS, M. M.; WALDROUP, A. L.; WALDROUP, P. W. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. **J. Appl. Poult. Res.**, Athens, v. 9, n. 2, p. 149-155, 2000.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GEDEK, B. Probiotics in animal feeding. Effects on performance and animal health. **Feed Manage.**, Sea Isle City, v. 3, p. 21-24, 1986.

GONZALES, E.; KONDO, N.; SALDANHA, E. S.; LODDY, M. M.; CAREGHI, C.; DECUYPERE, E. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1250-1256, 2003.

GOREN, E.; DE JONG, W. A.; DOORNENBAL, P.; KOOPMAN, J. P. AND KENNIS, H. M. Protection of chicks against *Salmonella* infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery, **Vet. Q.**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 73-79, 1984.

GRECCHI, R.; SALIBA, A. M.; MARIANO, M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. **J. Pathol.**, Sussex, v. 130, n. 1, p. 23-31, 1980.

GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 27, n.4, p. 972-979, 1983.

- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S.; DUBOUSE, R.T. Some effects of feeding corticosterone to chickens. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 59, n. 3, p. 516-522, 1980.
- HAKKINEN, M.; SCHNEITZ, C. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against chicken pathogenic *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7, **Vet. Rec.**, London, v. 139, n. 6, p. 139-141, 1996.
- HAKKINEN, M.; SCHNEITZ, C. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against *Campylobacter jejuni*, **Br. Poult. Sci.**, London, v. 40, n. 5, p. 619-621, 1999.
- HARMON, B. G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 972-977, 1998.
- HODGES, R. D. Normal avian (poultry) haematology. In: ARCHER, R.K.; JEFFCOTT, L.B. (Ed.). **Comparative clinical haematology**. London: Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 483-517.
- HOFACRE, C. L.; JOHNSON A. C.; KELLY B. J.; FROYMAN, R. Effect of a commercial competitive exclusion culture on reduction of colonization of an antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* in day-old broiler chickens, **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 46, n. 1, p. 198–202, 2002.
- IMONDI, A. R.; BIRD, F. H. The turnover of intestinal epithelium in the chick. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 45, n. 1, p. 142-146, 1966.
- JIN, L. Z. HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 77, n. 9, p. 1259-1265, 1998b.
- JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; ALI, M. A.; JALALUDIN, S. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 197-209, 1998a.
- KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y. W. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **Br. Poult. Sci.**, London, v.44, n.1, p.139-144, 2003.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, Paris, v. 8, n. 2, p. 517-531, 1989.

LEEDLE, J. Probiotics and DFM's – mode of action in the gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2000. p. 25-40.

LIMA, A. C. F.; PIZAULO JÚNIOR, J. M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E. B. Efeito do Uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 200-207, 2003.

MACHADO, J. N. Tendências atuais e futuras de colonizadores bacterianos intestinais na avicultura industrial. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AVIÁRIAS, 4., 2000, Campinas. **Anais....** p. 18-27.

MAIORKA, A.; MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 113-123.

McBRIDE, B. W.; KELLY, J. M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: A review. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2997-3010, 1990.

MILES, R. D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonisation by pathogens. In: ALTECH BIOTECHNOLOGY in THE FEED INDUSTRY, 1993, Florida. **Procceding...** p. 133-150.

MORENO, J. E. G. et al. Adición de dos tipos de probiótico en el agua de bebida de pollos de engorde y su efecto en el comportamiento productivo, metabólico, anatomopatológico e inmunológico. **Exped. Cient. Cult.**, v. 8, 2002.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 231-245.

NAKAGE, E. S. **Respostas fisiológicas de pintos submetidos a diferentes períodos de jejum: parâmetros hematológicos e intestinais**. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

NIR, I.; NITSAN, Z.; BEM-AVRAHAM, G. Development of the intestine, digestive enzymes and internal organs of newly hatched chicks. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 18., 1988, Nagoya. **Proceedings...** Nagoya : Japan Poultry Science Association, 1988. p. 970-971.

NITSAN Z.; BEN-AVRAHAM G.; ZOREF Z.; NIR I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **Br. Poult. Sci.**, London, v. 32, n. 3, p. 515-523, 1991.

OLIVEIRA G. H.; BERCHIERI JR., A.; BARROW, P. A. Prevention of *Salmonella* infection by contact using intestinal flora of adults birds and/or a mixture of organic acids. **Braz. J. Microbiol.**, São paulo, v. 31, n. 2, p. 116-120, 2000.

OVERTON, J.; SHOUP, J. Fine structure of cell surface specializations in the maturing duodenal mucosa of the chick. **J. Cell Biol.**, New York, v. 21, n. 1, p. 75, 1964.

PARRA, F. E. Exclusion competitive in Salmonellosis: Revisión In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIAR, 1994, Athenas. **Anais...** p. 433-469.

POWELL, P. C. Immune mechanisms in infections of poultry. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 15, n. 1-2, p. 87-113, 1987.

SANTOSO, U. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. **Brit. J. Nutrit.**, V.74, n.4, p.523-529. 1995.

SAVAGE D. C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. **F Tech.**, v. 41, n. 7, p. 82-87, 1987.

SOERJADI-LIEM, A. S.; STEHMAN, S. M.; SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M.; SMYSER, C.F. The influence of lactobacilli on the competitive exclusion of paratyphoid salmonellae in chickens. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 25, n. 4, p. 1027-1033, 1981.

SOERJADI-LIEM, A. S.; SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M. Intestinal colonization and competitive exclusion of *Campylobacter fetus* subsp. jejuni in young chicks. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 26, n. 3, p. 520-524, 1982.

SOERJADI-LIEM, A. S.; SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M. Comparative studies on competitive exclusion of three isolates of *Campylobacter fetus* subsp.

jejuni in chickens by native gut microflora. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 28, n. 1, p. 139–146, 1984a.

SOERJADI-LIEM, A. S.; SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M. Establishment and competitive exclusion of *Yersinia enterocolitica* in the gut of monoxenic and holoxenic chicks. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 28, n. 1, p. 256–260, 1984b.

STAVRIC, S.; BUCHANAN, B.; GLEESON, T. M. Competitive exclusion of *Escherichia coli* O157:H7 from chicks with anaerobic cultures of faecal microflora, **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 14, p. 191–193, 1992.

STERN, N. J.; COX, N. A.; BAILEY, J. S.; BERRANG M. E.; MUSGROVE, M. T. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens, **Poult. Sci.**, Champaign, v. 80, n. 2, p. 156–160, 2001.

STERZO, E. V. **Avaliação morfológica do intestino e hematológica de aves de corte (*Gallus gallus domesticus*) infectados experimentalmente por *Salmonella enteritidis* e submetidos ao tratamento por exclusão competitiva.** 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

STERZO, E. V.; PENHA FILHO. R. A. C.; PAIVA, J. B.; BERCHIERI JR, A. Time required to protect the intestinal tract of chicks against *Salmonella* enterica serovar enteritidis using competitive exclusion. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 119-122, 2005.

STURKIE, P. D. Blood: physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: STURKIE, P.D. (Ed.). **Avian Physiol.**, New York: Springer-Verlag, 1976. p. 53-75.

TANNOCK, G. W. Studies of the Intestinal Microflora: A Prerequisite for the Development of Probiotics. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 527-533, 1998.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D. B.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary hematological and clinical chemistry.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 518 p.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 75-82, 1998.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 60, n. 1, p. 101-111, 2004.

VAZQUEZ, R. Exclusión competitiva: nuevo sistema para el control de enfermedades en las aves. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 15., 1997. Cancun. **Memorias...** Cancún: ALA, 1997. p. 382-384.

WEINACK, O. M.; SNOEYENBOS, G. H.; SMYSER, C. F.; SOERJADI-LIEM, A. S. Competitive exclusion of intestinal colonization of *Escherichia coli* in chicks. Sites of bacterial attachment. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 25, n. 3, p. 696–705, 1981.

WEINACK, O. M.; SNOEYENBOS, G. H.; SMYSER, C. F.; SOERJADI-LIEM, A. S. Reciprocal competitive exclusion of *Salmonella* and *Escherichia coli* by native intestinal microflora of the chicken and turkey. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 26, n. 3, p. 585-595, 1982.

WEINACK, O. M.; SNOEYENBOS, G. H.; SMYSER, C. F.; SOERJADI-LIEM, A. S. Influence of *Mycoplasma gallisepticum*, infectious bronchitis, and cyclophosphamide on chickens protected by native intestinal microflora against *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 28, n. 2, p. 416-425. 1984.

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

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO VIA ESOFÁGICA DE MICROBIOTA INTESTINAL DE AVES ADULTAS SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PINTOS DE CORTE

RESUMO - Foram avaliados os parâmetros hematológicos de pintos submetidos à inoculação de microbiota intestinal de aves adultas poedeiras e de corte. Para isso, foi feito um experimento para testar o efeito da técnica de inoculação via esofágica. E este não afetou os parâmetros hematológicos. Num segundo experimento, foram utilizados pintos machos recém eclodidos (linhagem COBB). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, seguindo fatorial 3 x 4, sendo 3 tratamentos [sem inoculação (Controle), inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte (IMIFC), inoculação de microbiota intestinal de aves de postura adultas criadas em gaiola (IMIP)] e 4 períodos (1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação). A cada período, cinco aves por tratamento foram pesadas e sacrificadas para análise dos seguintes parâmetros: contagem total de eritrócitos (RBC, $\times 10^6/\text{mm}^3$), hemoglobina (HGB, g/dL), hematócrito (HCT, %), volume corpuscular médio (MCV, μm^3), contagem total e diferencial de leucócitos e relação heterófilo:linfócito. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey. Houve resposta temporária dos pintos que receberam inóculo independente do tipo de microbiota. Essa resposta foi observada através do aumento do RBC, HCT e HGB que durou até o 3º dia. Não ocorreu depressão do sistema imune, apenas variação da porcentagem de heterófilos e linfócitos na circulação.

Palavras-Chave: hematologia, microbiota intestinal, pintos de corte

CHAPTER 2 - INFLUENCE OF ESOPHAGEAL INOCULATION OF ADULT CHICKENS INTESTINAL MICROBIOTA ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN BROILER CHICKS

SUMMARY – Two experiments were conducted to determine if the technique of esophageal inoculation (Experiment I) and the esophageal inoculation of intestinal microbiota evaluated of adult birds influence the haematological parameters of male broiler chicks. In experiment I, technique of inoculation had no significant effects on haematological parameters [erythrocytes (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), counting total and differential leukocyte and the rate heterophil: lymphocyte]. In experiment II, the experimental design was entirely randomly, following factorial 3 x 4, [3 treatments: no inoculation (Control), inoculation of intestinal microbiota of broiler chickens (IIMBC), inoculation of intestinal microbiota of layer hens (IIMLH); 4 periods: 1, 3, 5 and 7 days post-inoculation]. Inoculation of intestinal microbiota caused a increase in the RBC, HCT and HGB already in the 1st day post-inoculation. This effect remained until the 3rd day, but only in the chicks of the treatment IIMBC. In the 3rd day, an increase in the heterophil percentage and a reduction in the lymphocyte percentage were also observed. The results showed that inoculation of intestinal microbiota caused an immediate and temporary heamatological response.

Keywords: hematology, intestinal microbiota, broiler chicks

Introdução

Embora a hematologia aviária ainda não esteja bem desenvolvida como a dos mamíferos, a mesma vêm ganhando importância e começando a ser melhor entendida (ANDERSON & STEPHENS, 1970; CAMPBELL & DEIN, 1984).

O hemograma possibilita detectar anormalidades e estabelecer um diagnóstico definitivo, ajudando a orientar e aprofundar a natureza de diversas situações fisiopatológicas importantes que afetam as aves e que se refletem no sangue (CHARLES NORIEGA, 2000).

Os dados sobre a série vermelha ou eritrocítica [contagem de glóbulos vermelhos (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT) e volume corpuscular médio (MCV)] fornecem dados sobre deficiências nutricionais e respiratórias, enquanto que os dados da série branca ou leucocitária (contagem total e diferencial de leucócitos) fornecem dados sobre a resposta imunocitária do organismo (NAKAGE, 2007).

Os monócitos, macrófagos, heterófilos, trombócitos e linfócitos constituem os componentes celulares das respostas imunológicas nas aves (ELSBACH, 1980; POWELL, 1987; MORGULIS, 2002).

Muitos dados de literatura demonstram que os probióticos, microorganismos vivos que atuam no organismo animal melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989), possuem efeito imunomodulador (COPPOLA & TUNES, 2004) e que seus efeitos não estão restritos ao sistema imune local da mucosa intestinal (ERICKSON & HUBBARD, 2000; PERDIGON *et al.* 1995).

Probiótico têm capacidade de induzir respostas imunes sistêmicas, aumentando o número e atividade de células fagocíticas do hospedeiro. O tecido linfático espalhado ao longo do trato intestinal das aves (placas de Peyer, tonsilas cecais, além da Bolsa de Fabrício) captam antígenos disponibilizados no trato digestório, que estimulam as células B precursoras de IgA e, células T colaboradoras das placas de Peyer, para desenvolvimento de uma imunidade geral e inespecífica. Pelo estímulo imunológico da mucosa, ocorre produção de

anticorpos tipo IgA, que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (FURLAN *et al.* 2004). Além disso, o probiótico ativa a ação de macrófagos e a proliferação de células T (SILVA, 2000).

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da aquisição precoce de microbiota intestinal de aves poedeiras e de corte, adultas, sobre os parâmetros sanguíneos de pintos de corte.

Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido no galpão experimental do Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal – SP. Ele consistiu de dois experimentos, nos quais foram utilizados pintos de corte recém-eclodidos, linhagem Cobb-500, machos, com peso médio de 44,40 g, obtidos de incubatório comercial.

O primeiro experimento foi realizado para verificarmos se a técnica de inoculação em si influenciava o hemograma. Nele, 120 pintos foram divididos em 2 tratamentos [sem inoculação (controle) e com inoculação de água destilada (Inoculação)], sendo 4 repetições de 15 aves/tratamento. A inoculação de água (100µl) foi realizada com seringa de insulina.

O segundo experimento foi realizado para analisarmos o efeito da aquisição precoce de microbiota intestinal sobre os parâmetros sanguíneos. Nele, 225 pintos foram divididos em 3 tratamentos [sem inoculação (controle), inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte (IMIFC) e inoculação de microbiota intestinal de poedeiras (IMIP)], distribuídas em 5 repetições por tratamento (15 pintos/repetição/tratamento). O preparo da cultura de microbiota intestinal de aves adultas e a inoculação via esofágica da mesma foram efetuados seguindo a metodologia adotada por OLIVEIRA *et al.* (2000). Inicialmente, amostras de fezes cecais frescas de aves adultas saudáveis da linhagem Isabrown (poedeiras com 33 semanas de idade) e Cobb (frangos com 35 dias de idade)(N=10aves/linhagem) foram coletadas e utilizadas para o preparo das duas

suspensões de cultura cecal, misturando-se as fezes cecais com caldo nutriente (OXOID CM 67, 1:10 Peso/Volume). Em seguida, as suspensões foram incubadas à 37°C durante 24 horas, para crescimento da microbiota intestinal. Então, cerca de 100 µL da parte líquida foi inoculada via esofágica, com uma seringa de insulina, em pintos de um dia de idade.

Em ambos os experimentos, as aves foram alojadas em galpão experimental de alvenaria, cujos boxes mediam 2,50 m de comprimento X 1,50 m de largura (totalizando 3,75 m²) continham cama de maravalha e lâmpadas infravermelhas (250 W) para aquecimento. A distribuição das aves nos boxes foi baseada no peso médio do lote, visando a homogeneidade entre os tratamentos. Elas foram alimentadas *ad libitum* com água e ração inicial comercial (22% PB, 2.900 Kcal EM / Kg, sem adição de antimicrobianos).

Ao final do 1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação, as aves foram pesadas (balança Marte eletrônica; 0,0001) e 5 aves por tratamento (1 de cada repetição) foram utilizadas para coleta do sangue. O sangue foi coletado da veia jugular, acondicionado em tubos plásticos (tipo Eppendorf) de 1,5 mL contendo EDTA (15µl/1mL de sangue) e mantidos sob gelo para a obtenção dos dados do eritrograma [contagem total de eritrócitos (RBC, x10⁶/mm³), hemoglobina (HGB, g/dL), hematócrito (HCT, %) e volume corpuscular médio (MCV, µm³)]. Foram realizadas duas leituras de sangue por ave, em um contador automático de células sangüíneas (Mod. 550, Celm, Barueri, SP), utilizando 20µL de sangue por ave para cada leitura.

Para as contagens totais de leucócitos (LEU), utilizou-se uma amostra de sangue e a solução de NATT & HERRICK (1952), em uma diluição de 1:100, realizando-se a contagem (nº leucócitos/µL de sangue) em câmara de Neubauer.

A contagem diferencial de leucócitos e a relação heterófilo/linfócito (H/L) foram obtidas pelas análises de esfregaços sangüíneos, corados individualmente com o kit Panótico Rápido LB (Laborclin). Os dados de contagem diferencial (monócitos, linfócitos, heterófilos, basófilos e eosinófilos) foram obtidos analisando-se e contando-se um total de 100 leucócitos e os valores foram expressos em porcentagem. Os dados referentes à relação H/L foram obtidos

dividindo-se a porcentagem de heterófilos pela de linfócitos (segundo MCKEE & HARRISON 1995).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram distribuídos em um arranjo fatorial 2x4, para o primeiro experimento, e 3x4 para o segundo experimento.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo cada ave considerada uma parcela. A comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Experimento 1- Efeito da técnica de inoculação de microbiota via esofágica e da idade sobre os parâmetros sanguíneos de pintos de corte

A contagem de glóbulos vermelhos (RBC), a concentração de hemoglobina (HGB) e o volume corpuscular médio (MCV) foram influenciados apenas pelo período de tratamento ($p < 0,05$). Os valores de RBC foram maiores no 1º dia pós-inoculação. Os valores de HGB no 1º dia pós-inoculação foram maiores que os apresentados no 7º dia pós-inoculação. Os valores de MCV foram menores no 1º dia pós-inoculação do que no 3º, 5º e 7º dias pós-inoculação, nos quais os pintos apresentaram valores similares de MCV (Tabela 1).

Não houve interação entre tratamento e período de tratamento ($p > 0,05$) para os valores de RBC, hematócrito (HCT), HGB e MCV (Tabela 1).

Na Tabela 2 constam os dados de contagem diferencial de leucócitos. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do tratamento sobre nenhum dos tipos de leucócitos (monócitos, basófilos, eosinófilos, heterófilo, linfócitos, trombócitos) e nem sobre a relação heterófilo/linfócito (H/L), mas ocorreu efeito significativo ($p < 0,05$) da idade sobre a porcentagem de heterófilos, linfócitos, trombócitos e, conseqüentemente, sobre H/L. As porcentagens de heterófilos foram significativamente ($p < 0,05$) reduzidas já do 1º ao 3º dia pós-inoculação, foram

reduzidas também do 3º para o 5º dia, pós-inoculação mantendo-se menores e constantes do 5º até o 7º dia pós-inoculação. Dados similares foram obtidos para a relação H/L e trombócitos, enquanto que para linfócitos dados inversos foram registrados.

Com relação à contagem total de leucócitos (LEU), não ocorreu efeito significativo ($p > 0,05$) do tratamento e nem do período de tratamento. Também não houve interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e dias pós-inoculação para este parâmetro (Tabela 3).

Tabela 1. Efeito dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de água destilada: Inoculação), e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre a contagem global de hemácias (RBC, $\times 10^6/\text{mm}^3$), taxa de hematócrito (HCT, %), concentração de hemoglobina (HGB, g/dL) e volume corpuscular médio (MCV, μm^3) em pintos de corte.

	RBC	HCT	HGB	MCV
Tratamentos (T)				
Controle	1,81	17,33	8,43	92,71
Inoculação	1,82	17,39	8,35	92,73
DPI				
1	2,09 a	18,16	10,66 a	88,63 b
3	1,73 b	16,01	8,61 ab	94,04 a
5	1,72 b	17,61	7,78 ab	94,11 a
7	1,72 b	17,65	6,50 b	94,09 a
Probabilidade				
T	0,805 NS	0,928 NS	0,930 NS	0,960 NS
DPI	< 0,01	0,137 NS	0,014	<0,01
T x DPI	0,990 NS	1,000 NS	0,999 NS	1,000 NS

a-b: comparação nas colunas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 2. Efeito dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de água destilada: Inoculação), e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre as porcentagens de monócitos (%), basófilos (%), eosinófilos (%), trombócitos (%), heterófilos (%), linfócitos (%) e sobre a relação Heterófilos/Linfócitos, em pintos de corte machos.

	Monócitos	Basófilos	Eosinófilos	Trombócitos	Heterófilos	Linfócitos	H/L
Tratamentos (T)							
Controle	3,34	3,12	3,30	14,38	25,62	64,62	0,39
Inoculação	3,24	3,02	3,07	14,06	25,66	65,01	0,39
DPI							
1	4,03	3,25	3,41	22,38 a	37,81 a	51,51 c	0,73 a
3	3,50	3,67	3,31	25,13 b	34,21 b	55,30 b	0,62 b
5	3,03	2,88	3,00	4,75 c	15,34 c	75,76 a	0,20 c
7	2,61	2,48	3,00	4,63 c	15,20 c	76,70 a	0,20 c
Probabilidades							
T	0,792 NS	0,770 NS	0,667 NS	0,669 NS	0,961 NS	0,684 NS	0,823 NS
DPII	0,089 NS	0,119 NS	0,921 NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
T x DPI	0,960 NS	0,825 NS	0,924 NS	0,966 NS	0,990 NS	0,990 NS	0,857 NS

a-c: comparação nas colunas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si (p<0,05). NS: não significativo.

Tabela 3. Efeitos dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de água destilada: Inoculação), e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre a contagem total de leucócitos (LEU, $10^3/\mu\text{L}$), em pintos de corte machos.

	LEU
Tratamentos (T)	
Controle	10,75
Inoculação	10,96
DPI	
1	10,87
3	10,74
5	11,09
7	10,73
Probabilidades	
T	0,957 NS
DPI	0,734 NS
T xDPI	0,589 NS

NS: não significativo.

Experimento 2 – Efeito da inoculação de microbiota intestinal de aves adultas sobre os parâmetros sanguíneos de pintos de corte

Ocorreram interações significativas ($p < 0,05$) entre tratamento e dias pós-inoculação para a contagem de glóbulos vermelhos (RBC), o hematócrito (HCT) e a concentração de hemoglobina (HGB) (Tabelas 4 e 5). Ao longo do período experimental, os pintos Controle apresentaram redução de RBC do 1º para o 3º dia pós-inoculação, manutenção dos valores até o 5º dia e aumento dos mesmos do 5º para o 7º dia, recuperando os valores apresentados no 1º dia. Os pintos do tratamento IMIFC apresentaram uma redução contínua do 1º ao 5º dia, cujos valores foram mantidos até o 7º. Por sua vez, nos pintos do tratamento IMIP, a RBC foi reduzida do 1º ao 3º dia pós-inoculação, a partir do qual os valores foram mantidos. Ainda de acordo com a interação entre tratamento e dias pós-inoculação, houve efeito do inóculo sobre os valores de RBC apenas até o 3º dia pós-inoculação. No 1º dia, os valores de RBC foram significativamente ($p < 0,05$) maiores nos pintos dos tratamentos IMIFC e IMIP do que nos pintos Controle, sendo os valores para o tratamento IMIP maior do que para o tratamento IMIFC. Já no 3º dia, os valores de RBC apresentados pelos pintos Controle e pelos pintos do tratamento IMIP foram similares entre si, mas significativamente ($p < 0,05$) menores do que os registrados para pintos do tratamento IMIFC. Dados similares aos descritos para RBC foram encontrados para HCT. Em relação aos valores de HGB, a interação entre tratamento e dias pos-inoculação (Tabela 5) mostrou que os pintos Controle apresentaram valores constantes do 1º ao 7º dia pós-inoculação, enquanto que os pintos dos tratamentos IMIFC e IMIP tiveram as reduções nos valores de HGB registradas para RBC e HCT.

O volume corpuscular médio (MCV) foi influenciado apenas pelo período de tratamento ($p < 0,05$), e não houve interação entre tratamento e dias pós-inoculação ($p > 0,05$) (Tabela 4). Os valores de MCV foram menores com um dia do que com 3, 5 e 7 dias pós-inoculação, nos quais os pintos apresentaram valores similares de MCV.

Não ocorreu efeito significativo ($p > 0,05$) do tratamento e nem do período de tratamento sobre a contagem total de leucócitos (LEU), nem houve interação

significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e dias pós-inoculação para este parâmetro (Tabela 6).

Os dados de contagem diferencial de leucócitos constam na Tabela 7. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do tratamento sobre nenhum dos tipos de leucócitos (monócitos, basófilos, eosinófilos, heterófilo, linfócitos, trombócitos) e nem sobre a relação H/L, mas ocorreu efeito significativo ($p < 0,05$) do período de tratamento sobre a porcentagem de heterófilos, linfócitos, trombócitos e, conseqüentemente, sobre H/L. As porcentagens de heterófilos foram mantidas do 1º ao 3º dia pós-inoculação, mas foram significativamente ($p < 0,05$) reduzidas do 3º para o 5º dia, mantendo-se menores e constantes do 5º até o 7º dia pós-inoculação. Dados similares foram obtidos para trombócitos, enquanto que para linfócitos dados inversos foram registrados.

Contudo, houve interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamento e dias pós-inoculação para heterófilos, linfócitos e H/L (Tabela 7). De acordo com a interação (Tabela 8), apenas os pintos do tratamento IMIFC apresentaram os efeitos do período de tratamento sobre as porcentagens de heterófilos descritos anteriormente. Os pintos Controle apresentaram redução significativa ($P < 0,05$) e progressiva nas porcentagens de heterófilos do 1º para o 5º dia pós-inoculação, mantendo os valores deste último até o 7º dia, enquanto que os pintos do tratamento IMIP tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) nas porcentagens de heterófilos do 1º para o 3º dia pós-inoculação, mantendo valores similares até o 7º dia. A interação entre tratamento e dias pós-inoculação também mostrou efeito do período de tratamento sobre as porcentagens de heterófilos no 3º dia, sendo que as mesmas foram menores ($p < 0,05$) nos pintos do tratamento IMIP do que pintos Controle e do tratamento IMIFC, que não diferiram ($p > 0,05$) entre si.

Em relação às porcentagens de linfócitos (Tabela 8), a interação entre tratamento e dias pós-inoculação mostrou que os efeitos principais do período de tratamento foram apresentados pelos pintos Controle e do tratamento IMIFC, enquanto que os pintos do tratamento IMIP apresentaram um aumento progressivo e significativo ($p < 0,05$) até o 5º dia pós-inoculação, cujos valores foram mantidos até o 7º dia. Além disso, também foram mostrados efeitos do

tratamento sobre as porcentagens de linfócitos no 3º dia pós-inoculação, no qual pintos Controle e do tratamento IMIFC tiveram porcentagens similares de linfócitos, porém menores ($p < 0,05$) do que as porcentagens registradas para pintos do tratamento IMIP.

No que diz respeito aos valores de H/L (Tabela 8), a interação entre tratamento e período de tratamento mostrou que os efeitos significativos do tratamento e idade sobre H/L foram similares aos registrados para as porcentagens de heterófilos, com a diferença de que os pintos do tratamento IMIP tiveram efeitos similares aos apresentados pelos pintos Controle, ou seja, redução significativa ($p < 0,05$) e gradativa até o 5º dia pós-inoculação e manutenção dos valores até o 7º dia.

Tabela 4. Efeito dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre a contagem global de hemácias (RBC, $\times 10^6/\text{mm}^3$), taxa de hematócrito (HCT, %), concentração de hemoglobina (HGB, g/dL) e volume corpuscular médio (MCV, μm^3) em pintos de corte.

	RBC	HCT	HGB	MCV
Tratamentos				
(T)				
Controle	1,66	14,69	6,58	89,21 a
IMIFC	2,26	19,72	9,19	87,59 a
IMIP	2,72	23,40	12,14	88,00 a
DPI				
1	3,56	30,08	15,54	84,63 b
3	1,80	15,81	7,85	88,37 a
5	1,59	14,29	6,51	89,91 a
7	1,89	16,90	7,31	90,17 a
Probabilidade				
T	<0,01	<0,01	<0,01	0,146
DPI	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
T x DPI	<0,01	<0,01	<0,01	0,273

a-b: comparação nas colunas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 5. Interações entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre a contagem global de hemácias (RBC, $\times 10^6/\text{mm}^3$), taxa de hematócrito (HCT, %) e concentração de hemoglobina (HGB, g/dL) em pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				p	CV (%)
	1	3	5	7		
RBC						
Controle	1,85 cA	1,49 bB	1,48 aB	1,84 aA	<0,01	9,69
IMIFC	3,15 bA	2,39 aB	1,51 aC	1,98 aBC	<0,01	15,14
IMIP	5,70 aA	1,53 bB	1,79 aB	1,86 aB	<0,01	10,49
p	<0,01	<0,01	0,155 NS	0,624 NS		
CV (%)	8,87	14,79	16,30	12,96		
HCT						
Controle	15,92 cAB	13,16 bC	13,50 aBC	16,18 aA	<0,01	9,52
IMIFC	26,88 bA	20,68 aB	13,36 aC	17,96 aBC	<0,01	13,12
IMIP	47,44 aA	13,60 bB	16,00 aB	16,56 aB	<0,01	9,57
p	<0,01	<0,01	0,177 NS	0,367 NS		
CV (%)	7,13	12,78	16,43	11,88		
HGB						
Controle	7,22 cA	6,10 bA	6,04 aA	6,96 aA	<0,01	10,91
IMIFC	13,28 bA	9,92 aB	6,18 aC	7,38 aBC	<0,01	16,93
IMIP	26,12 aA	7,52 abB	7,30 aB	7,60 aB	<0,01	11,10
p	<0,01	<0,01	0,197 NS	0,634 NS		
CV (%)	8,21	19,37	17,39	17,47		

a-c: comparação nas colunas. A-C: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 6. Efeitos dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre a contagem total de leucócitos (LEU, $10^3/\mu\text{L}$), em pintos de corte machos.

	LEU
Tratamentos (T)	
Controle	10,78
IMIFC	11,25
IMIP	11,54
DPI	
1	11,32
3	11,18
5	11,08
7	11,38
Probabilidades	
T	0,996 NS
DPI	0,660 NS
T x DPI	0,587 NS

NS: não significativo.

Tabela 7. Efeitos dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre as porcentagens de monócitos (%), basófilos (%), eosinófilos (%), trombócitos (%), heterófilos (%), linfócitos (%) e sobre a relação Heterófilos/Linfócitos, em pintos de corte machos.

	Monócitos	Basófilos	Eosinófilos	Trombócitos	Heterófilos	Linfócitos	H/L
Tratamentos (T)							
Controle	2,75	3,42	2,50	14,92 a	21,08	55,33	0,477
IMIFC	2,75	4,33	2,67	13,92 a	19,75	56,58	0,423
IMIP	3,17	4,25	3,08	13,92 a	18,33	57,25	0,378
DPI							
1	2,78	3,89	2,56	23,78 a	29,00	38,00	0,771
3	3,11	4,89	2,78	25,78 a	22,11	41,33	0,552
5	3,22	4,00	2,89	3,56 b	13,67	72,67	0,189
7	2,44	3,22	2,78	3,89 b	14,11	73,56	0,191
Probabilidades							
T	0,451 NS	0,140 NS	0,313 NS	0,441 NS	0,646 NS	0,214 NS	0,669 NS
DPII	0,574 NS	0,054 NS	0,897 NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
T x DPI	0,435 NS	0,615 NS	0,104 NS	0,525 NS	<0,01	<0,01	<0,01

a-b: comparação nas colunas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 8. Interações entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre a porcentagem de heterófilos (%), porcentagem de linfócitos (%) e relação heterófilos/linfócitos (H/L) em pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				p	CV (%)
	1	3	5	7		
Heterófilos						
Controle	31,33 aA	25,33 aB	14,00 aC	13,67 aC	<0,01	10,60
IMIFC	27,00 aA	25,00 aA	12,67 aB	14,33 aB	<0,01	10,64
IMIP	28,67 aA	16,00 bB	14,33 aB	14,33 aB	<0,01	8,62
p	0,181 NS	<0,01	0,623 NS	0,831 NS		
CV (%)	8,60	7,54	15,62	10,82		
Linfócitos						
Controle	36,67 aB	37,67 bB	71,33 aA	75,67 aA	<0,01	4,81
IMIFC	40,00 aB	39,00 bB	73,67 aA	73,67 aA	<0,01	4,97
IMIP	37,33 aC	47,33 aB	73,00 aA	71,33 aA	<0,01	4,19
p	0,418 NS	<0,01	0,565 NS	0,189 NS		
CV (%)	7,99	5,53	3,61	3,42		
H/L						
Controle	0,86 aA	0,67 aB	0,20 aC	0,18 aC	<0,01	9,18
IMIFC	0,68 aA	0,64 aA	0,17 aB	0,19 aB	<0,01	17,02
IMIP	0,77 aA	0,34 bB	0,20 aC	0,20 aC	<0,01	10,06
p	0,123 NS	<0,01	0,643 NS	0,640 NS		
CV (%)	11,44	7,55	18,68	13,31		

a-b: comparação nas colunas. A-C: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Discussão

O estresse pode causar neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e, algumas vezes, monocitoses (HALL, 1982). Além disso, segundo GROSS & SIEGEL (1983) THRALL *et al.* (2004), elevação na relação H/L pode ser utilizado como indicador de estresse. Os dados do primeiro experimento (presente estudo) mostraram que a técnica de inoculação via esofágica não altera os valores das séries eritrocitária (RBC, HCT, HGM e MCV) e leucocitária. Esses dados indicam que a técnica de inoculação utilizada não estressa as aves inoculadas e que. Portanto. Os dados obtidos no experimento 2 são resultantes da solução de microbiota intestinal inoculada.

De acordo com os dados do 2º experimento, os pintos que receberam inoculação de microbiota intestinal apresentaram valores maiores de RBC, HCT e HGB, em comparação com os pintos Controle, já no 1º dia pós-inoculação, indicando uma reação imediata ao recebimento de microbiota intestinal adulta via esofágica. O aumento nos parâmetros eritrocitários, entretanto, foi muito maior nas aves IMIP do que nas IMIFC. Tal reação foi mantida até o 3º dia pós-inoculação pelos pintos que receberam o tratamento IMIFC, caracterizando uma resposta adaptativa à aquisição de microbiota intestinal mais lenta nas aves deste tratamento do que nas do tratamento IMIP. Nas aves, como nos mamíferos, o HCT é afetado pela alteração no volume plasmático, bem como pelo RBC e MCV (THRALL *et al.* 2004). Considerando que não houve alteração dos valores de MCV (presente trabalho), o aumento de HCT deve ter ocorrido em função do aumento de RBC. Foi observado que os pintos ficavam ofegantes após a inoculação de microbiota intestinal. Sendo assim, é possível que o aumento no RBC, HCT e HGB dos pintos seja resultante de um aumento na taxa respiratória e/ou redução no volume plasmático.

Aumento dos valores de RBC, HCT e HGB também foi registrado por CETIN, GUCLU & CETIN (2005), para perus adultos que receberam ração complementada com probiótico a partir do 15º dia de idade. Resposta hematológica similar também foi observada em cães adultos que receberam

probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) por BAILLON *et al.* (2004). Por outro lado, ZHOU *et al.* (2000) não constataram modificação nos valores de RBC, HGB e HCT em camundongos que receberam suplementação de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*). Da mesma forma, OZCAN *et al.* (2003) também não observaram alteração nos valores de RBC, HGB, PCV, nos frangos (Ross-308) que receberam probiótico (*Enterococcus faecium* Cernelle 68) desde o início do alojamento. Tais diferenças nas respostas a microrganismos intestinais entre os autores podem estar relacionadas com tipo e concentração das suplementações e/ou inoculações.

Em relação ao leucograma, nossos dados não mostraram efeito da inoculação de microbiota intestinal sobre as porcentagens de monócitos, basófilos e eosinófilos. Os basófilos são granulócitos capazes de fagocitar após determinados estímulos imunológicos e que podem aumentar em alguns tipos de parasitismo, enquanto que os eosinófilos não são encontrados nas reações imunológicas, indicando que as aves não respondem de forma similar aos mamíferos (MORGULIS, 2002), o que pode estar relacionado a ausência de alterações nas porcentagens de tais leucócitos nos pintos que receberam inóculo (IMIFC, IMIP).

De acordo com nossos dados, apenas as porcentagens de heterófilos e linfócitos, e H/L foram alteradas, mas somente pelo tratamento IMIP e no 3º dia pós-inoculação. Pintos que receberam o tratamento IMIP apresentaram menor porcentagem de heterófilos, maior porcentagem de linfócitos e menor H/L que os demais tratamentos. Tais dados mostram um efeito tardio e curto da inoculação de microbiota intestinal de poedeiras mantidas em gaiola sobre as porcentagens de heterófilos e linfócitos circulantes, não constatado em pintos que receberam microbiota intestinal de frangos mantidos em sistema de cama. Considerando que linfócitos são células do sistema imunocitário produzidas em resposta à presença de organismos e/ou corpos estranhos, esses dados indicam que a microbiota existente na IMIFC, por ser a mesma que seria adquirida pelos pintos ao longo de seu período de crescimento, não desencadeou nenhuma resposta por parte dos mesmos.

Heterófilos são fagócitos importantes mediadores da imunidade natural das aves, especialmente em aves jovens que ainda não desenvolveram a imunidade adquirida (KOGUT *et al.* 1998). O acúmulo dos mesmos no local lesado ou estimulado representa a primeira linha de defesa celular das aves (MORGULIS, 2002). Sendo assim, a redução da porcentagem de heterófilos nos pintos que receberam IMIP pode ser resultante de uma migração de tais células para a mucosa intestinal. Além disso, os heterófilos tornam-se funcionalmente maduros nos primeiros dias pós-eclosão (MORGULIS, 2002), o que parece explicar a resposta dos pintos à IMIP apenas no 3º dia pós-inoculação.

Dados similares aos do presente trabalho foram observados por SWANSON *et al.* (2002) em cães alimentados com FOS acrescido de MOS, ou seja, não houve alteração na CTL e ocorreu diminuição de neutrófilos e aumento de linfócitos. Da mesma forma, OZCAN *et al.* (2003) também não observaram diferença significativa na contagem total de leucócitos e trombócitos em frangos que receberam probiótico (*Enterococcus faecium* Cernelle 68). O mesmo ocorreu com CETIN *et al.* (2005), observaram que contagem total e diferencial de leucócitos não foram influenciadas por suplementação de probiótico. Estas conclusões são semelhantes às relatadas por ALVAREZ *et al.* (2002) e ZHOU *et al.* (2000), em camundongos.

Conclusões

Aquisição de microbiota intestinal promove uma alteração hematológica imediata e temporária nos pintos, a qual consiste no aumento de RBC, HCT e HGB, bem como aumento na porcentagem de linfócitos e redução na de heterófilos e na relação H/L.

Não ocorreu depressão do sistema imune, o que foi verificado pela não alteração na contagem total de leucócitos. Mas o sistema imune foi temporariamente ativado pela microbiota de poedeira o que é mostrado pela variação das células (heterófilos e linfócitos) na circulação.

Referências

- ALVAREZ, S.; HERRERO, C.; BRU, E.; PERDIGON, G. Effect of *Lactobacillus casei* and yogurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. **J. Food Prot.**, Ames, v. 64, n. 11, p. 1768–1774, 2002.
- ANDERSON, E. L.; STEPHENS, J. F. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 726-730, 1970.
- BAILLON, M. L.; MARSHALL-JONES, Z. V.; BUTTERWICK, R. F. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 65, n. 3, p. 338-343, 2004.
- CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. Avian Hematology. The Basics. Vet. Clin. North **Am. J. Small Anim. Pract.**. Oxford, v. 14, n. 2, p. 223- 248, 1984.
- CETIN, N.; GUCLU, B. K.; CETIN, E. The Effects of Probiotic and Mannanoligosaccharide on some Haematological and Immunological Parameters in Turkeys. **J. Vet. Med. A.**, v. 52, n. 6, p. 263–267, 2005.
- CHARLES NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematología aviar**: material didático para curso de hematologia aviária. Cidade do México: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Producción Animal: Aves, 2000. 70 p. Apostila.
- COPPOLA, M. M.; TUNES, C.G. Probióticos e resposta imune. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
- ELSBACH, P. Degradation of microorganisms by phagocytic cells. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.2, n. 1, p.106-128, 1980.
- ERICKSON, K. L.; HUBBARD, N. E. 2000. Symposium: Kitagaw, H.; Iratsuka, Y. H.; Imagawa, T. and Uehara, M. Probotic bacteria: implication for human health. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Am. Soc. Nutr. Sci.**, v. 130, p. 403-409, 2000.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 365-78, 1989.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO

DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriú, SC, **Anais...** p. 6-27.

GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 27, n.4, p. 972-979, 1983.

HALL, R.L. Respostas e alterações leucocitárias. In HALL, R.L. (Ed.). **Manual de prática clínica veterinária**. Cap. 14. Rio de Janeiro: Guanabara. 413p. 1982.

KOGUT, M. H.; LOWRY, K.; MOYSES, R. B.; BOWDEN, L. L.; BOWDEN, R.; GENOVESE, K.; DELOACH, J.R. Lymphokine-augmented activation of avian heterophils. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 964-971, 1998.

MCKEE, J. S.; HARRISON, P. C. Effect of supplemental ascorbic acid on the performance of broilers chickens exposed to multiple concurrent stressors. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 74, n. 11, p. 1772-1785, 1995.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p 231-245.

NAKAGE, E. S. **Respostas fisiológicas de pintos submetidos a diferentes períodos de jejum: parâmetros hematológicos e intestinais**. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 1, p. 735-737, 1952.

OLIVEIRA G. H.; BERCHIERI JR, A.; BARROW, P. A. Prevention of *Salmonella* infection by contact using intestinal flora of adults birds and/or a mixture of organic acids. **Braz. J. Microbiol.**, São paulo, v. 31, n. 2, p. 116-120, 2000 .

OZCAN, M.; ARSLAN, M.; MATUR, E.; COTELIOGLU, U.; AKYAZI, I.; ERARSLAN, E. The effects of *Enterococcus faecium* Cernelle 68 (SF 68) on output properties and some haematological parameters in broilers. **Med. Weter.**, Warsaw, v. 59, n. 6, p. 496-500, 2003.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO, G.; GOBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 78, n. 7, p. 1597-1606, 1995.

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

SAS INSTITUTE. **SAS® user's guide: statistics**. 2002. SAS., Cary. 2002.

SILVA, E.N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. p. 241-251.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; HEALY H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R.; FAHEY, G. C. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. **Arch. Tierernahr.**, Berlim, v. 56, n. 4, p. 309-318, 2002.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D. B.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 518 p.

ZHOU, J. S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J.; BIRTLES, M. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. Acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/C mice. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 87-96, 2000.

CAPÍTULO 3 - AQUISIÇÃO PRECOCE DE MICROBIOTA INTESTINAL AUMENTA A DEFESA DO INTESTINO DELGADO DE PINTOS DE CORTE

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar se a aquisição precoce de microbiota intestinal influenciava o número de células caliciformes (NCC) produtoras de mucinas neutras e ácidas, e a integridade epitelial dos vilos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de pintos de corte. Foram utilizados pintos machos de 1 dia de idade (COBB). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, fatorial 3 x 4, 3 tratamentos [sem inoculação (controle), inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte (IMIFC), inoculação de microbiota intestinal de poedeiras (IMIP)] e 4 períodos (1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação). Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A IMIFC aumentou o NCC-PAS+ no duodeno (3º e 7º dia), jejuno (3º dia) e íleo (1º - 7º dia). Com a IMIP, o NCC-PAS+ aumentou também no duodeno (1º-7º dia), no jejuno (1º e 3º dia) e no íleo (1º e 3º dia). O NCC-AB+ aumentou com a IMIFC no duodeno (1º e 3º dia) e no jejuno (3º dia) e diminuiu no íleo (7º dia). Com a IMIP, o NCC-AB+ aumentou no duodeno (1º ao 5º dia) e no jejuno (1º-3º dia). No íleo, ele diminuiu no 1º dia e aumentou no 5º dia. Com a IMIFC e IMIP, a perda de epitélio duodenal começou no 3º dia e foi menor que nas aves Controle. No jejuno a perda de epitélio ocorreu apenas no 3º dia, como nas aves Controle, mas foi menor. No íleo, a IMIFC evitou a perda de epitélio apresentada pelas aves Controle no 3º dia. A IMIP, por sua vez, retardou a perda de epitélio para o 5º dia, mas foi mais acentuada. IMIFC e IMIP aumentaram o NCC nos três segmentos intestinais e diminuíram a renovação epitelial, aumentando o número de vilos com extrusão graus 0 e 1.

Palavras-Chave: células caliciformes, intestino delgado, microbiota intestinal, mucina, pintos de corte

CHAPTER 3 - EARLY ACQUISITION OF MICROBIOTA INTESTINAL INCREASE INTESTINAL PROTECTION OF BROILER CHICKS

SUMMARY – We analysed whether early acquisition of intestinal microbiota of adult birds influences the goblet cells number (GCN) and the epithelial integrity of the intestinal villus (duodenum, jejunum and ileum) of broiler chicks. In experiment, 1 -d- old male chicks were used. The experimental design was a completely randomized, factorial 3 x 4, [3 treatments: no inoculation (control), inoculation of intestinal microbiota of broiler chickens (IIMBC), inoculation of intestinal microbiota of laying hens (IIMLH)] and 4 periods (1, 3, 5 and 7 days post-inoculation). Inoculation of IIMBC increased the GCN-PAS+ in the duodenum (3rd and 7th day), jejunum (3rd day) and ileum (1st to 7th day). Inoculation of IMLH also increased the GCN-PAS+ in the duodenum (1st to 7th day), jejunum (1st and 3rd day) and ileum (1st and 3rd day). Inoculation of IMBC increased GCN-AB+ in the duodenum (1st to 3rd day) and jejunum (3rd day), but decreased it in the ileum (7th day). After inoculation of IMLH, GCN-AB+ increased in the duodenum (1st to 5th day) and jejunum (1st to 3rd day). In the ileum, GCN-AB+ decreased in the 1st day and increased in the 5th day post-inoculation. In chicks inoculated with IMBC and IMLH, duodenum epithelium loss occurred from the 3rd day and was lower than in chicks Control. Jejunum epithelium loss occurred only on day 3, similarly to observed for chicks Control, but in a lower percentage. In the ileum, inoculation of IMBC avoided epithelium loss presented by the Control chicks in the day 3. Inoculation of IMLH, in turn, delayed ileum epithelium loss for the 5th day, but it was more intense. The results showed that inoculation of intestinal microbiota increased the GCN in the three intestinal segments and decreased the intestinal epithelial renovation, increasing the intestinal mucosa protection of the chicks.

Keywords: goblet cells, small intestine, intestinal microbiota, mucin, broiler chicks

Introdução

Os vilos intestinais são revestidos por epitélio simples constituído por enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas, responsáveis pela digestão final e absorção, produção de muco e controle da atividade celular do epitélio, respectivamente. Tais células são originárias de células totipotentes, localizadas nas criptas, cujas células filhas diferenciam-se dando origem aos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio (CHENG & LEBLOND, 1974).

A capacidade digestiva, absorptiva e de proteção da mucosa intestinal estão relacionadas com a densidade e tamanho de vilos, a altura do epitélio da mucosa, a densidade e tamanho dos microvilos enterocíticos, a densidade de células caliciformes e a produção e secreção de mucinas pelas mesmas (MACARI, 1999) e com o grau de renovação e preservação celular dos vilos.

A proteção do epitélio intestinal contra atritos provocados pela passagem da digesta, ação das enzimas digestivas, suco gástrico e agentes patogênicos é exercida pela camada de muco que recobre o epitélio na luz intestinal. A camada de muco protege os microvilos (FORSTNER & FORSTNER, 1994; FORSTNER *et al.* 1995), e evita a perda de água através da parede intestinal (MURPHY, 2002). Ela também possui função transportadora e seletiva (UNI *et al.* 2003).

O principal componente da camada de muco são mucinas glicoprotéicas (SMIRNOV *et al.* 2006), as quais podem ser ácidas ou neutras (UNI *et al.* 2003). A mucina ácida funciona como barreira bacteriana (FONTAINE *et al.* 1996; ROBERTON & WRIGHT, 1997) ou sítio de ligação a microbiota intestinal.

Com a ingestão da dieta exógena, o trato gastrointestinal passa a ser colonizado por microbiota, a qual exerce papel fundamental na prevenção contra enfermidades entéricas, juntamente com as funções digestórias, a barreira de muco, a integridade da mucosa e a resposta imune. A integridade da mucosa do trato gastrintestinal confere ao frango de corte condições adequadas para a digestão e absorção dos nutrientes. (PELICANO *et al.* 2003).

É conhecido que o intestino apresenta alterações morfo-funcional pós-eclosão em adaptação à ração exógena ingerida, bem como em adaptação à

exposição e à colonização intestinal por microbiota (KELLY *et al.* 1992; NOY & SKLAN, 1997; KOJIMA *et al.* 1999).

Considerando que a manutenção da sanidade do trato gastrintestinal é fundamental para o bem estar animal e alto nível de produção, estudos sobre a manutenção da integridade e maior e melhor desenvolvimento funcional do mesmo se tornam indispensáveis. Assim, os objetivos do presente estudo foram analisar o efeito da inoculação de microbiota intestinal de aves poedeiras e de corte, adultas, sobre a integridade da mucosa intestinal e quantificar as células caliciformes (produtoras de mucinas neutras e ácidas), no intestino delgado de pintos de corte, durante a primeira semana pós-eclosão.

Material e Métodos

Foram utilizados 60 pintos de corte machos (linhagem Cobb-500), recém-eclodidos, com peso médio de 44,40 g, obtidos de incubatório comercial. Os pintos foram divididos em 3 tratamentos [sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, e inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP. O preparo da cultura de microbiota intestinal de aves adultas e a inoculação via esofágica da mesma foram efetuados seguindo a metodologia adotada por OLIVEIRA *et al.* (2000). Inicialmente, amostras de fezes cecais frescas de aves adultas saudáveis da linhagem Isabrown (poedeiras com 33 semanas de idade) e Cobb (frangos com 35 dias de idade)(N=10aves/linhagem) foram coletadas e utilizadas para o preparo das duas suspensões de cultura cecal, misturando-se as fezes cecais com caldo nutriente (OXOID CM 67, 1:10 Peso/Volume). Em seguida, as suspensões foram incubadas à 37°C durante 24 horas, para crescimento da microbiota intestinal. Então, cerca de 100 µL da parte líquida foi inoculada via esofágica, com uma seringa de insulina, em pintos de um dia de idade. Em seguida, as aves de cada um dos tratamentos (75 pintos por tratamento) foram distribuídas em 5 boxes (2,50 m x 1,5 m) (15 pintos por box), em galpão de alvenaria, com cama de maravalha, com

aquecimento feito por lâmpadas infra-vermelhas de 250W, seguindo normas tradicionais de manejo em avicultura de corte. Elas foram alimentadas com água e ração inicial, comercial (22% PB, 2.900 Kcal EM / Kg, Purina), *ad libitum*.

Ao final do 1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação, as aves foram pesadas (balança Marte eletrônica; 0,0001) e 5 aves por tratamento (1 de cada repetição, sendo 5 repetições) foram sacrificadas por decapitação para coleta do intestino delgado.

Para a quantificação das células caliciformes, de acordo com o tipo de mucina produzida (neutra e ácida), foram retirados fragmentos de aproximadamente 2,0 cm de comprimento dos três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) e fixados em Dietrick (4% de formalina, 28% de etanol, 0,34 N de ácido acético glacial). Cortes semi-seriados, de 7µm de espessura, foram corados com PAS (para determinação da mucina neutra) ou Alcian Blue pH 2,5 (para determinação da mucina ácida), segundo McMANUS (1948) e LEV & SPICER (1964) (citado por UNI *et al.* 2003). O número de células caliciformes PAS positivas (PAS+) e Alcian Blue positivas (AB+) foi obtido como o número de células em 300 µm de epitélio. Foram realizadas cerca de dez contagens por segmento/ave/tratamento, utilizando um sistema analisador de imagens (Leica-DM 2500).

A análise da perda de epitélio pelos vilos foi realizada sobre eletromicrografias de varredura. Para isso, amostras com 3 cm de comprimento (do duodeno, jejuno e íleo) foram abertas longitudinalmente, lavadas com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (para retirada do muco intestinal) e estiradas sobre papel e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato por 24 horas a 4°C. Em seguida, foram lavadas na solução tampão e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato, por duas horas. As amostras foram lavadas novamente em tampão fosfato e desidratadas em série de concentração crescente de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 100%). Após a secagem em ponto crítico, os fragmentos foram metalizados com ouro e eletromicrografados em microscópio eletrônico de varredura (modelo Jeol JSM 25II®). Os dados referentes ao número total de vilos por área (densidade de vilos e de vilos apresentando os diferentes graus de perda

de epitélio/área/região do intestino foram obtidos a partir da contagem sobre 10 eletromicrografias (com área equivalente a $1.855.213,7 \mu\text{m}^2$) por região/ave, num total de 5 aves/tratamento/idade.

Os graus de perda de epitélio foram determinados segundo GOMIDE JR *et al* (2004) (Figura 1), como: **grau 0**, sem extrusão aparente (vilo normal); **grau 1**, pequena extrusão no ápice do vilo ou pontos de extrusão na porção apical e ao longo do vilo (vilo normal); **grau 2**, perda de epitélio com exposição do tecido conjuntivo no ápice do vilo; **grau 3**, perda de epitélio na porção apical do vilo e exposição do tecido conjuntivo, assemelhando-se à extremidade de uma língua; **grau 4**, perda do epitélio de metade do vilo com exposição do tecido conjuntivo; **grau 5**, perda total do epitélio com exposição total do tecido conjuntivo do interior do vilo, assemelhando a uma língua totalmente exposta; e **grau 6**, perda do tecido conjuntivo e conseqüente perda do vilo (vilo quebrado).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 3x4, sendo 3 tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e 4 períodos (1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação entre médias, considerando-se um nível de significância de 5%.

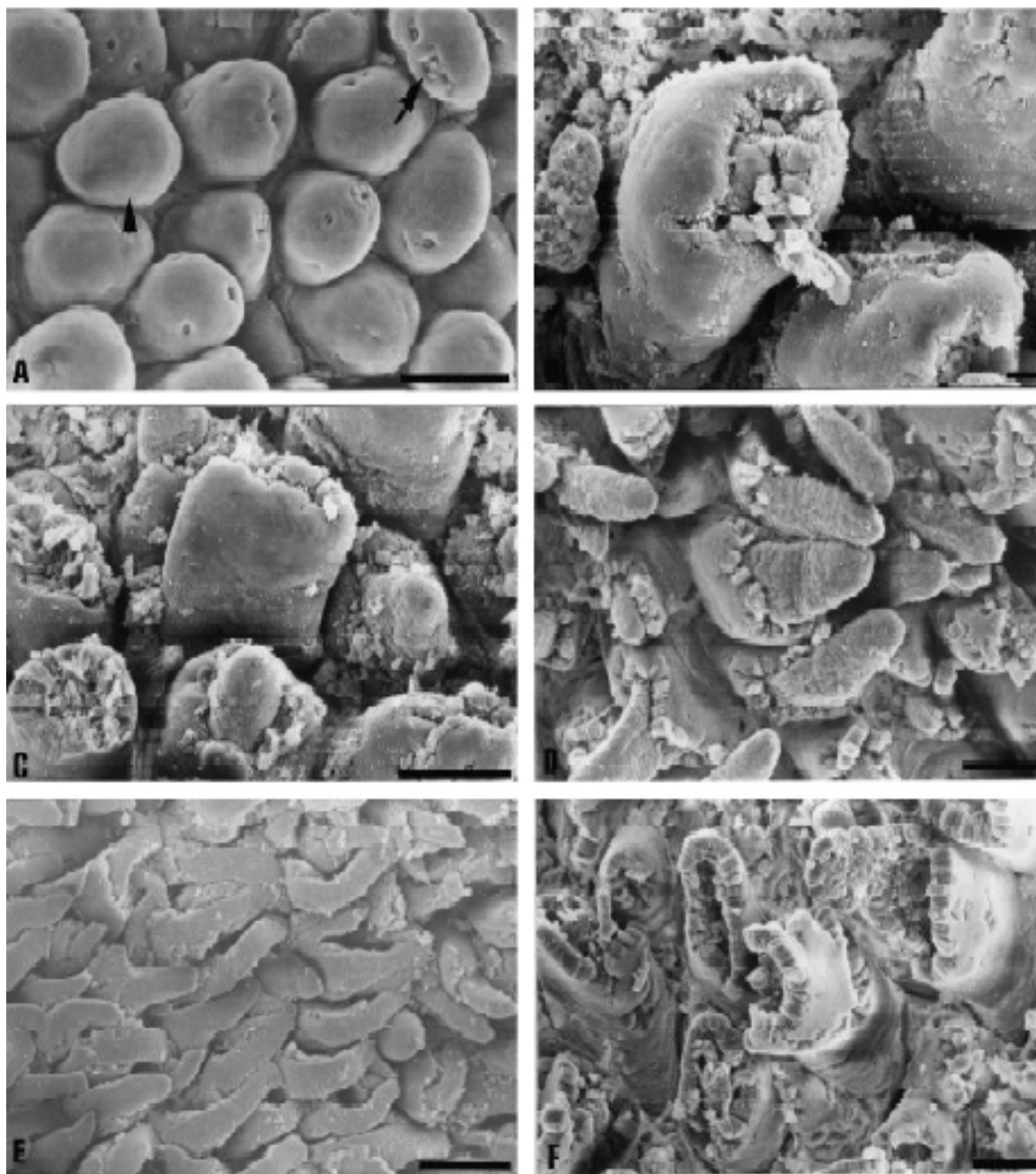


Figura 1. A – F: Graus de perda de epitélio em vilos intestinais de pintos. A: graus 0 e 1, B: grau 2, C: grau 3, D: grau 4, E: grau 5 e F: grau 6. Barras: A, C, D e F = 50 μ m; B = 10 μ m; E = 100 μ m (GOMIDE JÚNIOR *et al.*, 2004).

Resultados

De acordo com os dados do presente trabalho, houve interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos e dias pós-inoculação para o número de células caliciformes (NCC) PAS+ nos três segmentos intestinais (Tabela 1). Como mostrado pelos dados da Tabela 2, no duodeno, as aves do tratamento IMIFC apresentaram maior NCC PAS+ que as aves Controle no 3º e 7º pós-inoculação, enquanto que as aves do tratamento IMIP tiveram maior NCC PAS+ do que as aves Controle e do tratamento IMIFC em todas as idades analisadas (do 1º ao 7º dia). Análise temporal (Tabela 2) mostrou que as aves Controle apresentaram aumento gradativo e significativo ($p < 0,05$) no NCC PAS+ a partir do 3º dia, enquanto que nas aves inoculadas (IMIFC e IMIP) esse aumento ocorreu já a partir do 1º dia pós-inoculação.

No jejuno (Tabela 2), não foi registrado diferença significativa ($p > 0,05$) no NCC PAS+ entre os dois tratamentos de aves inoculadas em nenhum dos períodos de tratamento analisados. Entretanto, tais aves (IMIFC e IMIP) apresentaram maior ($p < 0,05$) NCC PAS+ do que as aves Controle até o 3º dia pós-inoculação. Nos demais dias (5º e 7º), não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) entre os três tratamentos para NCC PAS+. Ainda para jejuno, de acordo com os dados da Tabela 2, nas aves Controle ocorreu um aumento gradativo e significativo ($p < 0,05$) no NCC PAS+ apenas até o 5º dia, cujos valores foram mantidos até o 7º dia. Nas aves do tratamento IMIFC, o NCC PAS+ aumentou ($p < 0,05$) do 1º para o 3º dia pós-inoculação, manteve-se constante do 3º ao 5º dia, e aumentou novamente do 5º para o 7º dia pós-inoculação. Já nas aves do tratamento IMIP também foi observado aumento gradativo e significativo ($p < 0,05$) no NCC PAS+ e ao longo dos 7 dias pós-inoculação.

No íleo (Tabela 2), foi registrado maior ($p < 0,05$) NCC PAS+ nas aves inoculadas (IMIFC e IMIP) do que nas aves Controle no 1º, 3º e 7º dia pós-inoculação. Do ponto de vista temporal, nas aves Controle, ocorreu aumento gradativo e significativo ($p < 0,05$) no NCC PAS+ do íleo a partir do 3º dia. Nas aves do tratamento IMIFC também houve aumento gradativo e significativo

($p < 0,05$) no NCC PAS+, mas ao longo de todo o período experimental, enquanto que nas aves do tratamento IMIP foi constatado um aumento significativo ($p < 0,05$) do 1º para o 2º dia, manutenção dos valores do 3º para o 5º dia, e um novo aumento do 5º para o 7º dia pós-inoculação.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que também ocorreu Interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos e dias pós-inoculação para NCC AB+ nos três segmentos intestinais.

Como mostrado na Tabela 3, de acordo com a interação, houve diferença significativa ($p < 0,05$) no NCC AB+ duodenal entre as aves inoculadas e as aves Controle até o 5º dia. Mais precisamente, aves dos tratamentos IMIFC e IMIP apresentaram maior NCC AB+ no duodeno do que as aves Controle até o 3º e 5º dia, respectivamente. Os dois tratamentos de aves inoculadas diferiram entre si apenas no 5º dia, sendo que as aves do tratamento IMIFC tiveram menor ($p < 0,05$) NCC AB+ do que as do tratamento IMIP. Os dados da Tabela 3 também mostram que nas aves Controle ocorreu um aumento gradativo no NCC AB+ do 3º ao 7º dia pós-inoculação, enquanto que nas aves inoculadas, de ambos os tratamentos (IMIFC e IMIP), o NCC AB+ permaneceu inalterado ao longo do período analisado (1º ao 7º dia).

Em relação ao NCC AB+ no jejuno (Tabela 3), não foi constatado diferença significativa ($p < 0,05$) entre as aves dos tratamentos de inoculação em nenhum dos períodos de tratamento. Por outro lado, aves do tratamento IMIFC apresentaram maior NCC AB+ do que as aves Controle no 3º dia pós-inoculação, enquanto que maior NCC nas aves do tratamento IMIP em comparação às aves Controle ocorreu no 1º e 3º dia. Ainda de acordo com a interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos e dias pós-inoculação (Tabela 3), nas aves Controle, o NCC AB+ aumentou do 3º para o 5º dia, mantendo-se inalterado até o 7º dia pós-inoculação. Nas aves do tratamento IMIFC, ocorreu aumento no NCC AB+ do 1º para o 3º dia pós-inoculação e do 5º para o 7º. Já nas aves do tratamento IMIP, ocorreu aumento apenas do 5º para o 7º dia pós-inoculação.

Os dados da Tabela 3 também mostram que as aves do tratamento IMIFC diferiram das aves Controle no NCC AB+ do íleo apenas no 7º dia, apresentando

menor NCC AB+ do que as últimas. As aves do tratamento IMIP, por sua vez, diferiram das aves Controle quanto ao NCC AB+ no 1º e 5º dias, apresentando menor e maior NCC do que as mesmas, respectivamente. Diferenças significativas ($p < 0,05$) no NCC AB+ entre as aves dos tratamentos de inoculação também foram registradas. As aves do tratamento IMIFC apresentaram maior NCC AB+ no 1º dia e menor no 5º e 7º dia pós-inoculação do que as aves do tratamento IMIP. Análise temporal (Tabela 3) mostra que as aves Controle tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) no NCC AB+ do 1º para o 3º dia e do 5º para o 7º dia pós-inoculação. Nas aves do tratamento IMIFC foi registrado aumento significativo ($p < 0,05$) do 1º para o 3º dia, ficando os valores inalterados até o 7º dia pós-inoculação. Apenas nas aves do tratamento IMIP, o NCC AB+ aumentou gradativa e significativamente ($p < 0,05$) ao longo do período experimental.

Como mostrado na Tabela 4, ocorreu interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e dias pós-inoculação para porcentagem de vilos normais (PVN) (sem ou com extrusão normal de epitélio, graus 0 e 1, respectivamente) nos três segmentos intestinais.

Os dados da interação para PVN no duodeno (Tabela 5) mostram que aves do tratamento IMIFC diferiram significativamente ($p < 0,05$) das aves Controle na PVN até o 3º dia pós-inoculação, apresentando maior PVN que as mesmas. As aves do tratamento IMIP, por sua vez, diferiram ($p < 0,05$) das aves Controle na PVN durante todo o período experimental. Elas apresentaram maior PVN que as aves Controle até o 5º dia pós-eclosão e menor no 7º dia. Também houve diferença significativa ($p < 0,05$) na PVN no duodeno entre as aves dos tratamentos de inoculação no 3º e 7º dia pós-inoculação. No 3º dia, aves do tratamento IMIFC apresentaram maior PVN que as aves do tratamento IMIP, enquanto que no 7º dia dado inverso foi registrado. É importante ressaltar que, no 1º dia pós-inoculação, as aves inoculadas (IMIFC e IMIP) apresentaram 100% dos vilos duodenais normais.

Do ponto de vista temporal (Tabela 4 e 5), aves Controle apresentaram em torno de 67% de vilos duodenais normais no 1º dia pós-eclosão, tiveram uma queda significativa ($p < 0,05$) e acentuada na PVN no 3º dia, seguida de um

aumento significativo ($p<0,05$) acentuado do 3º para o 5º dia e manutenção das porcentagens do 5º até o 7º dia, mas não ultrapassando 87%. As aves do tratamento IMIFC, por sua vez, apresentaram 100% dos vilos duodenais normais no 1º dia, uma queda significativa ($p<0,05$) em torno de 15% no 3º dia, seguida de um aumento significativo ($p<0,05$) do 3º para o 5º dia, cujo valor foi mantido até o 7º dia e em torno dos 90%. As aves do tratamento IMIP apresentaram praticamente 100% de vilos duodenais normais até o 5º dia pós-inoculação, e tiveram uma redução em torno de 30% na PVN no duodeno do 30% do 5º para o 7º dia.

De acordo com os resultados constantes na Tabela 5, houve diferença significativa ($p<0,05$) na PVN no jejuno entre os tratamentos apenas no 3º dia, no qual as aves inoculadas, de ambos os tratamentos, apresentaram PVN similares e maiores que as aves Controle. Ainda de acordo com os dados da Tabela 5, ao contrário do observado no duodeno, no jejuno, as aves Controle apresentaram quase que 100% dos vilos normais ao longo de todo o período experimental. Houve apenas uma queda significativa ($p<0,05$) em torno de 8% na PVN no 3º dia. Dados similares foram registrados para as aves inoculadas. No tratamento IMIFC, as aves apresentaram 100% de vilos jejunais normais no 1º, 5º e 7º dia, e uma leve, mas significativa ($p<0,05$), queda de aproximadamente 3% na PVN do jejuno no 3º dia. No tratamento IMIP, a queda foi significativa ($p<0,05$) e de apenas 2%.

No íleo (Tabela 5), houve diferença significativa ($p<0,05$) na PVN entre os tratamentos no 3º e 5º dia pós-inoculação. No 3º dia, as aves inoculadas (IMIFC e IMIP) não diferiram ($p>0,05$) entre si quanto à PVN no íleo (100 % de vilos normais), e apresentaram maior ($p<0,05$) PVN do que as aves Controle (3%). No 5º dia, as aves Controle e do tratamento IMIFC tiveram 100% de vilos normais no íleo e, portanto, maior ($p<0,05$) PVN (9%) que as aves do tratamento IMIP. Análise temporal (Tabela 5) mostra que as aves Controle apresentaram 100% de vilos ilíacos normais no 1º e 5º dia pós-inoculação e duas quedas pequenas, mas significativas ($p<0,05$) (3%) na PVNI, uma no 3º e outra no 7º dia pós-inoculação. As aves do tratamento IMIFC apresentaram 100% de vilos ilíacos normais em todas as idades analisadas. As aves do tratamento IMIP, por sua vez,

apresentaram 100% de vilos íliacos normais durante quase todo o período experimental. Apenas no 5º dia foi registrada uma queda (30%) na PVN.

As Tabelas 6, 7 e 8 mostram as porcentagens de vilos de acordo com os respectivos graus de perda de epitélio, no duodeno, jejuno e íleo, respectivamente.

Com relação ao duodeno, no 1º dia, as aves Controle apresentaram 32,79 % de vilos alterados com perda de epitélio de grau 2 a 5, sendo que a maior parte deles (28,18 %) possui perda de epitélio grau 2. No 3º dia, essas aves apresentaram 65,22 % de vilos duodenais alterados, sendo 43,83% de grau 2 e 21,39% de grau 3. No 5º dia, elas tiveram uma porcentagem bem menor de vilos duodenais alterados (15,95 %), possuindo principalmente perda de epitélio de graus 2 e 3, (6,09% e 9,23%, respectivamente) e uma pequena porcentagem (1,61%) de grau 5. Já no 7º dia, as aves Controle ainda apresentaram 13,28% de vilos alterados, com perda de epitélio graus, 2 (2,33%), 3 (8,29%) e 6 (2,66%).

As aves do tratamento IMIFC apresentaram perda de epitélio nos vilos duodenais a partir do 3º dia. No 3º dia, elas tiveram cerca de 14,92% de vilos com perda de epitélio, sendo 10,48% de grau 2 e 4,44% de grau 3. No 5º dia, a porcentagem de vilos alterados foi apenas 7,52% e de grau 2. No 7º dia, a porcentagem de vilos alterados aumentou para 11,26% e de grau 6.

As aves do tratamento IMIP, por sua vez, também começaram a apresentar perda de epitélio a partir do 3º dia. Entretanto, nestas aves, a porcentagem de vilos alterados no duodeno ficou abaixo de 1% dos vilos no 3º e 5º dia. Apenas no 7º dia, ocorreu uma alta porcentagem (24%) de vilos com perda de epitélio de grau 1 à grau 6 (7,06% grau 2; 1,43% grau 3; 7,75% grau 4; 37,09% grau 5 e 3,97% grau 6).

Os resultados de perda de epitélio pelos vilos no jejuno apresentados na Tabela 7 mostram que, no 1º dia pós-inoculação, as aves Controle e as inoculadas tiveram praticamente 100% de vilos normais, registrando apenas 0,45% dos vilos com perda de epitélio grau 6 nas aves do tratamento IMIFC e 0,51% de vilos com grau 2 nas aves do tratamento IMIP. No 3º dia, as aves de todos os tratamentos passaram a ter vilos com um grau maior de perda de epitélio. As aves Controle

tiveram 7,45% de vilos com grau 2, enquanto que as do tratamento IMIFC tiveram 3,51% dos vilos com grau 3 e as do tratamento IMIP 2,36% de vilos com grau 4. No 5º dia, apenas nas aves Controle e do tratamento IMIFC foram observados vilos alterados (2,30% com grau 2 e 3,51% com grau 3, respectivamente). Por sua vez, no 7º dia, apenas as aves Controle ainda apresentaram vilos alterados, sendo 1,60% de vilos com perda de epitélio de grau 6.

No íleo (Tabela 8), as aves Controle apresentaram baixa porcentagem de vilos com perda de epitélio ao longo do período experimental e apenas no 3º e 7º dia pós-inoculação. No 3º dia, as aves Controle apresentaram 3,29% de vilos ilíacos com perda de epitélio e de grau 2. No 7º dia, estas aves voltaram a apresentar vilos alterados (3,65%), sendo 1,49% de grau 4 e 2,16% de grau 6.

Como mostrado na Tabela 8, as aves do tratamento IMIFC não apresentaram grau de perda de epitélio acima de 2. Já as aves do tratamento IMIP apresentaram vilos ilíacos com perda de epitélio a partir do 5º dia. No 5º dia, elas tiveram 24,36% dos vilos com perda de epitélio grau 2 e 4,67% com grau 3. No 7º dia, as aves do tratamento IMIP apresentaram uma reduzida porcentagem de vilos ilíacos alterados (3,55%) e com perda de epitélio grau 2.

Tabela 1. Efeitos dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre o número de células caliciformes (PAS+ e AB+) do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), de pintos de corte machos.

	Células Caliciformes PAS+			Células Caliciformes AB+		
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
Tratamentos (T)						
Controle	11,61	14,57	16,65	9,19	11,01	14,90
IMIFC	11,64	15,13	17,19	10,44	11,37	14,20
IMIP	13,72	14,99	17,07	10,82	11,77	14,88
DPI						
1	10,45	12,87	15,83	9,35	10,82	12,56
3	11,99	14,54	16,48	10,17	11,12	14,41
5	12,95	15,71	17,29	10,28	11,51	15,27
7	13,91	16,46	18,29	10,81	12,09	16,43
Probabilidades						
T	<0,01	0,456 NS	0,255 NS	<0,01	0,126NS	0,294NS
DPI	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
T x DPI	<0,01	0,021	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

a-d: comparação nas colunas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 2. Interação entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre o número de células caliciformes (PAS+) do duodeno, jejuno e íleo, de pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				P	CV (%)
	1	3	5	7		
Duodeno						
Controle	9,92 bC	10,54 cC	12,10 bB	12,64 cA	<0,01	3,19
IMIFC	10,30 bC	11,44 bB	12,18 bAB	13,90 bA	<0,01	2,62
IMIP	11,14 aC	13,98 aB	14,58 aAB	15,20 aA	<0,01	4,08
P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		
CV (%)	4,26	3,46	21,73	2,55		
Jejuno						
Controle	12,34 bC	14,02 bB	15,70 aA	16,24 aA	<0,01	2,83
IMIFC	13,04 abC	15,04 aB	15,66 aB	16,78 aA	<0,01	1,87
IMIP	13,24 aD	14,56 aC	15,78 aB	16,38 aA	<0,01	2,71
P	0,022	<0,01	0,868NS	0,081NS		
CV (%)	3,54	2,09	2,29	2,15		
Íleo						
Controle	15,36 bC	15,56 bC	17,08 aB	18,02 bA	<0,01	1,74
IMIFC	16,14 aC	16,82 aBC	17,78 aAB	18,60 aA	<0,01	1,58
IMIP	16,00 aC	17,04 aB	17,02 aB	18,24 abA	<0,01	3,24
P	<0,01	<0,01	0,060NS	0,029		
CV (%)	2,14	2,50	2,88	1,62		

a-c: comparação nas colunas, A-C: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 3. Interação entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre o número de células caliciformes (AB+) do duodeno, jejuno e íleo, de pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				P	CV (%)
	1	3	5	7		
Duodeno						
Controle	8,14 bC	8,27 bC	9,41 bB	10,95 aA	<0,01	5,12
IMIFC	10,21aA	11,12 aA	10,12 bA	10,29 aA	<0,01	6,51
IMIP	9,69 aA	11,12 aA	11,30 aA	11,18 aA	0,317NS	8,77
P	<0,01	<0,01	<0,01	0,1005 NS		
CV (%)	5,28	10,54	5,40	5,71		
Jejuno						
Controle	10,01 bB	10,16 bB	11,72 aA	12,16 aA	<0,01	6,46
IMIFC	10,88 abC	11,55 aAB	11,09 aBC	11,95 aA	0,032	2,61
IMIP	11,56 aB	11,65 aAB	11,71 aAB	12,16 aA	<0,01	5,18
P	<0,01	<0,01	0,045	0,598NS		
CV (%)	5,18	5,19	3,49	3,06		
Íleo						
Controle	13,09 aC	14,30 aB	14,98 bB	17,26 aA	<0,01	2,80
IMIFC	12,74 aB	14,38 aA	14,68 bA	15,02 bA	<0,01	2,60
IMIP	11,85 bD	14,54 aC	16,16 aB	17,00 aA	<0,01	2,50
P	<0,01	0,626NS	<0,01	<0,01		
CV (%)	3,22	2,72	1,57	2,89		

a-b: comparação nas colunas, A-C: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 4. Efeitos dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dos dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre a porcentagens de vilos normais na mucosa do duodeno, jejuno e íleo, de pintos de corte machos.

	Porcentagens de vilos normais		
	Duodeno	Jejuno	Íleo
Tratamentos (T)			
Controle	68,19	97,16	98,26
IMIFC	91,58	99,01	100,00
IMIP	92,34	99,28	91,85
DPI			
1	89,07	99,68	100,00
3	73,05	95,56	98,90
5	91,89	99,23	90,32
7	82,13	99,47	97,59
Probabilidades			
T	<0,01	<0,01	<0,01
DPI	<0,01	<0,01	<0,01
T x DPI	<0,01	<0,01	<0,01

Tabela 5. Interações entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre a porcentagens de vilos normais na mucosa do duodeno, jejuno e íleo, de pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				P	CV (%)
	1	3	5	7		
Duodeno						
Controle	67,21 bB	34,77 cC	84,04 bAB	86,72 aA	<0,01	15,02
IMIFC	100,00 aA	85,07 bC	92,47 abB	88,76 aBC	<0,01	5,55
IMIP	100,00 aA	99,31 aA	99,15 aA	70,90 bB	<0,01	3,07
P	<0,01	<0,01	0,014	<0,01		
CV (%)	9,25	6,11	7,41	10,42		
Jejuno						
Controle	100,00 aA	92,55 bB	97,69 aA	98,40 aA	<0,01	2,27
IMIFC	99,54 aAB	96,49 aB	100,00 aA	100,00 aA	0,011	1,11
IMIP	99,48 aAB	97,63 aB	100,00 aA	100,00 aA	<0,01	0,87
P	0,518	<0,01	0,048	0,138		
CV (%)	0,75	2,24	1,48	1,35		
Íleo						
Controle	100,00 aA	96,70 bB	100,00 aA	96,34 aB	<0,01	1,78
IMIFC	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	-	-
IMIP	100,00 aA	100,00 aA	70,96 bB	96,45 aA	<0,01	9,23
P	-	<0,01	<0,01	0,124		
CV (%)	-	1,25	10,48	3,02		

a-b: comparação nas colunas, A-B: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 6. Porcentagens de vilos, de acordo com o grau de perda de epitélio (0+1, 2, 3, 4, 5 e 6) (segundo GOMIDE JR *et al.*, 2004) no duodeno de pintos de corte, machos, de acordo com os tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias).

Tratamentos	Grau 0+1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5	Grau 6
1º Dia pós-inoculação						
Controle	67,21	28,18	3,38	0,49	0,74	0,00
IMIFC	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIP	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3º Dia pós-inoculação						
Controle	34,78	43,83	21,39	0,00	0,00	0,00
IMIFC	85,08	10,48	4,44	0,00	0,00	0,00
IMIP	99,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69
5º Dia pós-inoculação						
Controle	84,05	6,09	9,23	0,00	1,61	0,00
IMIFC	92,48	7,52	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIP	99,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85
7º Dia pós-inoculação						
Controle	86,72	2,33	8,29	0,00	0,00	2,66
IMIFC	88,76	0,00	0,00	0,00	0,00	11,24
IMIP	76,00	7,06	1,43	7,75	3,79	3,97

N = 5 aves/tratamento.

Tabela 7. Porcentagens de vilos, de acordo com o grau de perda de epitélio (0+1, 2, 3, 4, 5 e 6) (segundo GOMIDE JR *et al.*, 2004) no jejuno de pintos de corte, machos, de acordo com os tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias).

Tratamentos	Grau 0+1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5	Grau 6
1º Dia pós-inoculação						
Controle	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIFC	99,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45
IMIP	99,49	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00
3º Dia pós-inoculação						
Controle	92,55	7,45	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIFC	96,49	0,00	3,51	0,00	0,00	0,00
IMIP	97,64	0,00	0,00	2,36	0,00	0,00
5º Dia pós-inoculação						
Controle	97,70	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIFC	96,49	0,00	3,51	0,00	0,00	0,00
IMIP	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7º Dia pós-inoculação						
Controle	98,40	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60
IMIFC	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIP	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

N = 5 aves/tratamento.

Tabela 8. Porcentagens de vilos, de acordo com o grau de perda de epitélio (0+1, 2, 3, 4, 5 e 6) (segundo GOMIDE JR *et al.*, 2004) no íleo de pintos de corte, machos, de acordo com os tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias).

Tratamentos	Grau 0+1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5	Grau 6
1º Dia pós-inoculação						
Controle	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIFC	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIP	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3º Dia pós-inoculação						
Controle	96,71	3,29	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIFC	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIP	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5º Dia pós-inoculação						
Controle	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIFC	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIP	70,97	24,36	4,67	0,00	0,00	0,00
7º Dia pós-inoculação						
Controle	96,34	0,00	0,00	1,49	0,00	2,16
IMIFC	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IMIP	96,45	3,55	0,00	0,00	0,00	0,00

N = 5 aves/tratamento.

Discussão

As células caliciformes sintetizam e secretam uma camada de muco composto predominantemente de mucinas glicoprotéicas que recobre o epitélio do trato intestinal (SMIRNOV *et al.* 2004). Essa camada de muco age como medida de proteção, lubrificação, e transporte entre o conteúdo luminal e as células epiteliais (FORSTNER *et al.* 1995). Em suma, age como uma barreira entre o conteúdo luminal e o sistema absorptivo do intestino (YAGI *et al.* 1990).

Trabalhos recentes sugerem que mucinas ácidas (AB+) protegem contra a translocação bacteriana (FONTAINE *et al.*, 1996; ROBERTON & WRIGHT, 1997). Esta idéia é reforçada com a observação de que células caliciformes em regiões intestinais densamente colonizadas por microorganismos expressam predominantemente mucinas ácidas (DEPLANCKE *et al.* 2000; ROBERTON & WRIGHT, 1997; NIEUW AMERONGEN, *et al.* 1998).

No presente estudo, entretanto, tanto o NCC neutras (PAS+) quanto o NCC ácidas (AB+) foi aumentado pelos tratamentos de inoculação de microbiota intestinal de aves adultas (IMIFC e IMIP), e o NCC neutras foi, aparentemente, maior do que o NCC ácidas, diferindo assim das observações dos autores anteriores. Nossos dados corroboram com UNI *et al.* (2003), no que se refere a população microbiana poder afetar o tipo de mucina e a quantidade produzida. Entretanto, eles sugerem uma maior relação das células caliciformes neutras, do que das ácidas, com a microbiota intestinal inoculada. Considerando que, no presente estudo, foi realizada inoculação de microbiota intestinal de aves adultas e, portanto, uma microbiota intestinal que seria adquirida teoricamente pelos pintos ao longo de sua fase que crescimento, nossos dados sugerem que aquisição de microbiota intestinal natural também induz um aumento no NCC (neutras e ácidas) na mucosa do intestino delgado dos pintos e, principalmente, de células caliciformes sintetizando mucina neutra. Nossos dados reforçam os de CAMPOS (2006), os quais também mostraram uma relação das mucinas neutras com a colonização intestinal pela microbiota e não exatamente com a ação protetora da mucina.

De acordo com os dados do presente trabalho, o efeito do tratamento IMIP sobre o NCC neutras e ácidas foi, em alguns segmentos, mais imediato, intenso e longo do que o do tratamento IMIFC. Entretanto, houve aumento, embora temporário, no NCC em todos os segmentos. Tais dados podem ser resultantes do fato da microbiota intestinal do tratamento IMIFC ser mais próxima da que os pintos adquirem, já que são criados em sistema similar, e da diferença entre os inóculos dos tratamentos, visualizada inicialmente pela diferença de coloração entre as mesmas durante o preparo. SMIRNOV *et al.* (2001), verificaram que dieta contendo probiótico aumentou significativamente o número de células caliciformes em toda a área do intestino delgado. Dessa forma, nossos dados, como os dos autores anteriormente citados, indicam que microbiota intestinal altera o processo de biossíntese da mucina e/ou degradação mediada por alterações na população bacteriana intestinal. Segundo SMIRNOV *et al.* (2001), essa modificação na dinâmica da mucina influencia nas funções e sanidade do trato digestivo.

Houve diferença de resposta quanto ao NCC entre os três segmentos intestinais. O duodeno foi o segmento que apresentou influência mais longa dos tratamentos sobre o NCC. Isso pode ser explicado pelo fato do duodeno ser a porção do intestino delgado que apresenta as maiores taxas de proliferação e migração celular, e responder a agressões e estímulos da mucosa de maneira mais acentuada (UNI *et al.* 1998; OLIVEIRA *et al.* 2000; GEYRA *et al.* 2001).

No presente estudo também foi observado aumento no NCC PAS+ e AB+ com o aumento da idade, independentemente do tratamento. Nossos dados concordam com os achados de NAKAGE (2007), UNI *et al.* (2003) e CAMPOS (2006), os quais observaram aumento no NCC após a eclosão, mais precisamente, de 1 a 5, 1 a 8 e de 1 a 21 dias de idade em frangos de corte. Quando há aumento na proliferação celular e atividade microbial, a composição das mucinas das células caliciformes podem ser alteradas. Um aumento na proliferação celular irá reduzir a idade e maturidade das células caliciformes, o que pode afetar o tipo de mucina, produzida por estas células (YAGHOB FAR *et al.* 2007). A primeira semana de vida dos pintos, período de execução do presente

estudo, corresponde à fase de maior taxa de crescimento intestinal (MURAKAMI *et al.* 1992). Assim sendo, o aumento no NCC observado no presente estudo deve estar relacionado com o crescimento dos vilos.

Em relação à integridade dos vilos intestinais, a dinâmica de renovação do epitélio intestinal apresentada pelos pintos Controle foi precoce, acentuada e contínua (1-7 dias), no duodeno; branda, tardia e contínua (3-7 dias), no jejuno; e branda, tardia e descontínua (3º e 7º dia) no íleo, envolvendo perdas de epitélio principalmente de grau 2 a 3.

Mudanças na dieta ou hábito alimentar induzem a um período de adaptação no trato gastrointestinal da ave, que envolve alterações morfo-funcionais, que proporcionam um aumento da área de superfície de digestão e absorção intestinal (OVERTON & SHOUP, 1964; BARANYIOVA & HOLMAN, 1976; MORAN, 1985). Neste contexto, nossos dados indicam que renovação celular é um dos processos envolvidos na maturação morfo-funcional do intestino delgado dos pintos na pós-eclosão frente à alimentação exógena. Além disso, eles mostram que a taxa de renovação ocorre de forma decrescente ao longo do intestino delgado. As diferenças registradas entre os segmentos intestinais podem estar relacionadas com a função dos mesmos. Segundo MAIORKA *et al.* (2002), a maior taxa de renovação da mucosa duodenal pode ser explicada pelo fato de ser uma região extremamente importante para o processo digestivo, pois é onde ocorre a liberação das secreções biliar e pancreática exógenas, e também por ser o primeiro segmento do intestino a receber estímulos físicos, químicos e hormonais, desencadeados pela presença de alimento no lúmen.

Em comparação com as aves Controle, as aves inoculadas com microbiota intestinal de aves adultas (presente estudo) também apresentaram renovação celular no duodeno, jejuno e íleo, mas tardia e branda, embora tenha sido registrado certa porcentagem de vilos com perda de epitélio grau 6 no duodeno, indicando uma renovação também mais rápida. Esse atraso e redução na dinâmica de renovação celular pode significar maior eficácia na digestão e absorção de alimentos na primeira semana de vida, pois segundo VISEK (1978), e STÁBILE (1996), quanto mais tardia e lenta a renovação celular ou menor o

turnover, mais eficaz é a absorção de nutrientes. Por outro lado, considerando que o intestino delgado é o principal órgão responsável pela digestão e absorção de nutrientes, assim quanto antes as aves alcançarem sua capacidade funcional, mais cedo poderão utilizar os nutrientes da dieta, crescer eficientemente e demonstrar seu potencial genético, resistir a infecções e doenças metabólicas (UNI & FERKET, 2004). Do ponto de vista da sanidade avícola, entretanto, nossos dados parecem ter um significado especial já que uma renovação mais e tardia e branda pode representar uma maior integridade intestinal e, portanto, uma maior proteção à ação de entero-patógenos.

Além de registrarem uma dinâmica funcional distinta entre os segmentos intestinais, nossos dados também mostram que a dinâmica de renovação epitelial foi alterada pelos inóculos, devendo ser uma adaptação à exposição e à colonização intestinal por microbiota, conforme KELLY *et al.* (1992), NOY & SKLAN (1997) e KOJIMA *et al.* (1999).

O presente estudo também mostra que a inoculação de microbiota intestinal normal de aves adultas de corte e postura agem sobre o epitélio intestinal dos pintos de forma similar, atrasando o processo de renovação celular intestinal.

Os dados obtidos sugerem que a aquisição precoce de microbiota intestinal aumenta o NCC, retarda e reduz a renovação celular, caracterizando uma maior proteção intestinal. De acordo com STERZO (2007), aquisição de microbiota intestinal de aves adultas antes de infecção por *Salmonella* impede a colonização intestinal por esta bactéria entero-patógena. Dessa forma, nossos dados mostram que aumento no NCC e menor perda de epitélio são processos envolvidos na proteção dos pintos contra bactérias entero-patogênicas.

Conclusões

Os dados do presente estudo mostram que inoculação via esofágica de microbiota intestinal de ave adulta induz aumento no NCC e retarda o processo de renovação celular nos vilos do intestino delgado de pintos de corte. Do ponto de

vista prático, eles mostram que os pintos respondem à aquisição de microbiota intestinal aumentando sua defesa intestinal.

Referências

- BARANYIOVA, E.; HOLMAN, J. Morphological changes in the intestinal wall in fed fasted chicken in the first week after hatching. **Acta Vet. (Brno)**, Brno, v. 45, p. 151-158, 1976.
- CAMPOS, D. M. B. **Efeito do sorgo sobre o desempenho zootécnico, características da carcaça e o desenvolvimento da mucosa intestinal de frango de corte**. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cells in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **Am. J. Anat.**, Philadelphia, v. 141, n. 4, p. 537-561, 1974.
- DEPLANCKE, B.; HRISTOVA, K.R.; OAKLEY, H.A.; et al. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 66, p. 2166–74, 2000.
- FONTAINE, N.; MESLIN, J. C.; LORY, S.; ANDRIEUX, C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: Effect on insulin in the diet. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v. 75, n. 6, p. 882-892, 1996.
- FORSTNER, J. F.; FORSTNER, G. G. Gastrointestinal mucus. In: Johnson, L.R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1994. p. 1255-1283.
- FORSTNER, J. F.; OLIVER, M. G.; SYLVESTER, F. A. Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Guerrant, R.L. **Infections of gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1995. p. 71-88.
- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v. 86, p. 53–61, 2001.

- GOMIDE JR, M. H.; STERZO, E. V.; MACARI, M.; BOLELI, I. C. Use of Scanning Electron Microscopy for the Evaluation of Intestinal Epithelium Integrity. **Rev. Br. Zootec. – Br. J. Anim. Sci.**, v. 33, n. 6, p. 1500-1505, 2004.
- KELLY, D; McFADYEN, M.; TRAVIS, A.J. Characterization and autoradiographic localization of the epidermal growth factor receptor in the jejunum of neonatal and weaned pigs. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 4, n. 2, p.183-191, 1992.
- KOJIMA, T.; NISHIMURA, M.; YAJIMA, T.; KUWATA, T.; SUZUKI, Y.; GODA, T.; TAKASE, S.; HARADA, E. Developmental changes in the regional Na⁺ / glucose transporter mRNA along the small intestine of suckling rats. **Comp. Biochem. Physiol. B- Biochem. Mol. Biol.**, v. 122, n. 1, p. 89-95, 1999.
- LEV, R.; SPICER, S. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 12, p.309, 1964.
- MACARI, M. A fisiologia do sistema digestivo das aves (I). **Aves e Ovos**, São Paulo, n. 8-9, p. 12-21, 1999.
- McMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technol.**, Baltimore, v. 23, p. 99-108. 1948.
- MORAN, Jr., E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **J. Nutr.**, Philadélphia, v. 115, p. 665-674, 1985.
- MURPHY, J. High-quality post-weaning diet is critical to piglet's transition to grain-based diet. **Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs**. Ontário. 10jul. 2002. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/swine/facts/postwean.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2007.
- NAKAGE, E. S. **Respostas fisiológicas de pintos submetidos a diferentes períodos de jejum: parâmetros hematológicos e intestinais**. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- NIEUW AMERONGEN A. V.; BOLSCHER, J. G. M.; BLOEMENA, E.; VEERMAN, E. C. I. Sulfomucins in the human body. **Biol. Chem.**, Berlin, v. 379, p.1–18, 1998.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of poultry. **J. Appl. Poult. Res.**, Athens, v. 6, n.3, p. 344-354, 1997.

- OLIVEIRA G. H.; BERCHIERI JR., A.; BARROW, P. A. Prevention of *Salmonella* infection by contact using intestinal flora of adults birds and/or a mixture of organic acids. **Braz. J. Microbiol.**, São paulo, v. 31, n. 2, p. 116-120, 2000.
- OVERTON, J.; SHOUP, J. Fine structure of cell surface specializations in the maturing duodenal mucosa of the chick. **J. Cell Biol.**, New York, v. 21, n. 1, p. 75, 1964.
- PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e Ultra-Estrutura da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte alimentados com Dietas contendo diferentes Probióticos. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, Lisboa, v. 98, n. 547, p. 125-134, 2003.
- ROBERTON, A.M.; WRIGHT, D.P. Bacterial glycosulfatases and sulfomucin degradation. **Can. J. Gastroenterol.**, Oakville, v. 11, p. 361-366, 1997.
- SAS INSTITUTE. **SAS® user's guide: statistics**. 2002. SAS., Cary. 2002.
- SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **J. Nutr.**, Philadélphia, v. 134, n. 4, p. 736-742, 2004.
- SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo feeding of carbohydrates. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 85, n. 4, p. 669-673, 2006.
- STABILE, L. A. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em rações de aves, visão da indústria. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, 1996. p. 17-26.
- UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 75-82, 1998.
- UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 82, n. 2, p. 320-327, 2003.
- UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **Worlds Poult. Sci. J.**, Champaign, v. 60, p. 101-111, 2004.
- VISEK, W. J. The mode of growth promotion by antibiotics. **J. Anim. Sci.**, v. 46,

suppl. p. 1447-1469, 1978.

YAGHOBFAR, A.; BOLDADI, F.; SHRIFI, S.D. Effects of enzyme supplement on nutrient digestibility, metabolizable energy, egg production, egg quality, and intestinal morphology of the broiler chicks and layer hens fed hull-less barley based diets. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 10, n. 14, p. 2257-2266, 2007.

YAGI, T., MIYAWAKI, Y., NISHIKAWA, A., HORIYAMA, S., YAMUCHI, K. & KUWANO, S. Prostaglandin E2-mediated stimulation of mucus synthesis and secretion by rhenin anethone, the active metabolite of sennosides A and B in mouse colon. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 42, p. 542–545, 1990.

CAPÍTULO 4 – AQUISIÇÃO DE MICROBIOTA INTESTINAL INFLUENCIA A ALTURA E DENSIDADE DOS VILOS E A PROFUNDIDADE DAS CRIPTAS DO INTESTINO DELGADO DE PINTOS DE CORTE

RESUMO - Neste estudo foi avaliado o efeito da aquisição precoce de microbiota intestinal de aves adultas sobre o comprimento do intestino delgado, altura de vilo (AV) e densidade de vilo (DV) e profundidade de cripta (PC), para duodeno, jejuno e íleo em pintos de corte. Para isso, foram utilizados pintos de 1 dia, machos (COBB). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, fatorial 3 x 4, 3 tratamentos [sem inoculação (controle), inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte (IMIFC), inoculação de microbiota intestinal de poedeiras (IMIP)] e 4 períodos (1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, significância de 5%. IMIFC causou redução na AV duodenais no 3º dia e diminuição na PC no 1º e 7º dia. No jejuno, ela promoveu diminuição na AV no 1º dia. No íleo, a AV foi reduzida no 1º dia e aumentada no 7º dia, a DV foi reduzida no 1º dia e aumentada a partir do 3º dia, e a PC aumentada no 7º dia. IMIP causou diminuição na AV duodenal no 3º dia e na DV no 1º, 3º e 7º dia. No jejuno, ela promoveu aumento na AV no 5º e 7º dia e diminuição na DV no 3º dia seguido de aumento a partir do 5º dia. No íleo, IMIP resultou em diminuição da AV no 1º e 7º dia e aumento no 5º dia, aumento na DV no 3º dia seguida de diminuição no 5º dia. Tais dados mostram que a IMIFC não influenciou crescimento do vilo no duodeno e no jejuno, mas aumenta a AV no íleo, enquanto que a IMIP promoveu aumento imediato e temporário na largura dos vilos nos três segmentos intestinais e aumento na altura dos mesmos no jejuno e íleo a partir do 5º dia.

Palavras-Chave: intestino delgado, microbiota intestinal, pintos de corte, vilosidade intestinal

CHAPTER 4 – ESOPHAGEAL INOCULATION OF INTESTINAL MICROBIOTA EARLY IN LIFE INFLUENCE THE VILLUS GROWTH OF BROILER CHICKS

SUMMARY - This study evaluated the effect of early acquisition of intestinal microbiota of adult birds on small intestine of broiler chicks (duodenum, jejunum and ileum villus, height (VH) and density (VD) and crypt depth (CD), and intestine length). In experiment, 1-d-old male was used. The experimental design was a completely randomized, factorial 3 x 4, [3 treatments: no inoculation (control), inoculation of intestinal microbiota of broiler chickens (IIMBC), inoculation of intestinal microbiota of laying hens (IIMLH); 4 periods (1, 3, 5 and 7 days post - inoculation)]. Inoculation of IMBC reduced duodenal VH at 3rd day and duodenal CD at 1st and 7th day, and jejunum, VH at 1 day. In the ileum, VH was reduced on day 1 and increased on the 7th day, VD was reduced at 1 day and increased from day 3, and CD increased on the 7th day. Inoculation of IMLH decreased duodenal VH on day 3 and duodenal VD at 1, 3 and 7 day. In the jejunum, it occurred increase in the VH at 5 and 7 day and decrease in the VD on Day 3 followed by increase from the 5th day. Inoculation of IMLH reduced ileum VH at 1 and 7 day and increased it in the 5th day, increased ileum VD on day 3 and decreased in the 5th day. These data showed that inoculation of IMBC did not influence duodenum and jejunum villus growth, but increased ileum VH, while inoculation of IMLH promoted immediate and temporary increase in the villus width in the three intestinal segments, and increased in the jejunum and ileum VH from the 5th day.

Keywords: small intestine, intestinal microbiota, broiler chicks, intestinal villus

Introdução

As aves recém-eclodidas apresentam sistema digestório completo (OVERTON & SHOUP, 1964), mas com capacidade funcional de digestão e absorção ainda imatura, se comparada com aves adultas. Dessa forma, quanto antes o sistema digestório dos pintainhos alcançarem sua capacidade funcional, mais cedo estes poderão utilizar os nutrientes da dieta com maior eficácia, crescer eficientemente demonstrando seu potencial genético, bem como resistir a infecções e a doenças metabólicas (UNI & FERKET, 2004).

Após a eclosão, o trato gastrointestinal sofre grandes alterações morfológicas e fisiológicas, que proporcionam aumento da área de superfície de digestão e absorção intestinais (OVERTON & SHOUP, 1964). Entre essas alterações, destacam-se os aumentos no comprimento do intestino, na altura e densidade dos vilos e, conseqüentemente, no número de enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas (BARANYIOVA & HOLMAN, 1976). Esse processo decorre primariamente de dois eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação) resultantes das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes ("stem cell") localizadas na cripta e ao longo dos vilos (UNI *et al.* 1998), e perda de células (extrusão), que ocorre normalmente no ápice dos vilos.

Conforme mencionado por MAIORKA *et al.* (2002), o equilíbrio entre os processos de proliferação e extrusão possibilita a manutenção do tamanho dos vilos e, portanto, a manutenção da capacidade digestiva e absorptiva. Quando o intestino responde a algum agente com um desequilíbrio da renovação celular a favor de um desses processos, ocorre uma modificação na altura dos vilos. Assim, se ocorrer aumento na taxa de mitose com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, deverá haver aumento no número de células e, conseqüentemente, aumento no tamanho dos vilos. Se o estímulo levar ao aumento na taxa de extrusão, havendo manutenção ou diminuição da taxa de proliferação, o intestino deverá responder com redução no tamanho dos vilos e,

conseqüentemente, com diminuição em sua área de digestão e absorção (NAKAGE, 2007).

Relatos de COOK & BIRD (1973) indicaram que aves criadas em ambientes livres de microorganismos apresentaram redução na altura dos vilos, bem como na profundidade das criptas, sugerindo que o crescimento normal do epitélio intestinal depende também do equilíbrio da microbiota ali existente.

De acordo com alguns autores, a utilização dos probióticos propicia a colonização do trato digestório, mantendo ou incrementando a flora natural do mesmo, prevenindo a colonização de microorganismos patogênicos e mantendo a ótima utilização dos alimentos (FULLER, 1989; VANBELLE *et al.* 1990; HOUDIJK *et al.* 1999).

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da aquisição precoce de microbiota intestinal de aves adultas, poedeiras e de corte, sobre o comprimento do intestino delgado, altura e densidade dos vilos e profundidade das criptas do intestino delgado de pintos de corte.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no galpão experimental do Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal – SP.

Foram utilizados pintos de corte recém-eclodidos, machos, da linhagem Cobb-500, com peso médio de 44,40 g, provenientes de incubatório comercial. Os pintos foram divididos em 3 tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP. O preparo da cultura de microbiota intestinal de aves adultas e a inoculação via esofágica da mesma foram efetuados seguindo a metodologia adotada por OLIVEIRA *et al.* (2000). Inicialmente, amostras de fezes cecais frescas de aves adultas saudáveis da linhagem Isabrown (poedeiras com 33 semanas de idade) e Cobb (frangos com 35 dias de

idade)(N=10aves/linhagem) foram coletadas e utilizadas para o preparo das duas suspensões de cultura cecal, misturando-se as fezes cecais com caldo nutriente (OXOID CM 67, 1:10 Peso/Volume). Em seguida, as suspensões foram incubadas à 37°C durante 24 horas, para crescimento da microbiota intestinal. Então, cerca de 100 µL da parte líquida foi inoculada via esofágica, com uma seringa de insulina, em pintos de um dia de idade. Em seguida, os pintos foram distribuídos em 5 boxes (2,50 m de comprimento X 1,50 m de largura, totalizando 3,75 m²) por tratamento (5 repetições de 15 pintos), em galpão de alvenaria contendo cama de maravalha, seguindo normas tradicionais de manejo em avicultura de corte. Os animais foram distribuídos com base no peso médio do lote visando homogeneidade entre as aves dos tratamentos. Estes receberam aquecimento através de lâmpadas infravermelhas (250 W), objetivando manter a temperatura próxima de 32°C. Eles foram alimentados com água e ração inicial comercial (22% PB, 2.900 Kcal EM / Kg, Purina) *ad libitum*.

Ao final do 1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação, as aves foram pesadas e 5 aves por tratamento (1 de cada repetição) foram sacrificadas por decapitação para coleta do intestino delgado.

Os parâmetros intestinais analisados foram o comprimento do duodeno e jejuno + íleo, a altura e a densidade de vilos (número total de vilos por área) e a profundidade das criptas do duodeno, jejuno e íleo. Para as análises de altura dos vilos e profundidade das criptas, amostras de 1,5 a 2,0 cm de comprimento foram coletadas do duodeno (a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal), jejuno (a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel) e íleo (porção anterior aos cecos), abertas longitudinalmente, estiradas e fixadas imediatamente em solução de Bouin. Elas foram processadas pelo método histológico de rotina para microscopia de luz, ou seja, desidratadas em série de concentração crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. De cada segmento intestinal foram realizados e analisados 8 cortes histológicos longitudinais dos vilos, de 7µm de espessura, corados com hematoxilina:eosina (HE). Foram realizadas 25 mensurações de cada parâmetro por segmento intestinal por ave. Os dados referentes à altura dos vilos e

profundidade das criptas intestinais foram obtidos por meio de um programa de análise de imagens (Leica-DM 2500).

Os dados referentes à densidade de vilos foram obtidos pela contagem dos mesmos sobre eletromicrografias de varredura. Para isso, amostras do duodeno, jejuno e íleo, com 3 cm de comprimento foram abertas longitudinalmente, lavadas com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (para retirada do muco intestinal), estiradas sobre papel e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato por 24 horas a 4°C. Em seguida, foram lavadas na mesma solução tampão e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato por duas horas. As amostras foram lavadas novamente com tampão fosfato e desidratadas em série de concentração crescente de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 100%). Após a secagem em ponto crítico, os fragmentos foram metalizados com ouro e eletromicrografados em um microscópio eletrônico de varredura (modelo Jeol JSM 25II®). Os dados referentes ao número total de vilos do intestino foram obtidos a partir da contagem sobre 10 eletromicrografias (com área equivalente a 1.855.213,7 μm^2) por região/ave, num total de 5 aves/tratamento/período.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 3x4, sendo 3 tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e 4 períodos (1º, 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação).

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação entre médias, considerando-se um nível de significância de 5%.

Resultados

O comprimento do duodeno (CD) (Tabela 1) foi influenciado ($p < 0,05$) apenas pelo período de tratamento e não houve interação ($p > 0,05$) entre tratamentos e dias pós-inoculação. Os pintos apresentaram um aumento significativo e progressivo no comprimento do duodeno até o 5º dia, cujo valor foi mantido do 5º até o 7º dia.

Por sua vez, houve interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos e dias pós-inoculação para o comprimento do jejuno+íleo (CJI). De acordo com a interação (Tabela 2), ocorreu aumento no CJI do 3º até o 7º dia pós-inoculação, independentemente dos tratamentos. Além disso, foram registradas diferenças entre os tratamentos experimentais e o tratamento Controle, mas restritas ao 3º e 5º dia, sendo o comprimento destes segmentos menor nos pintos do tratamento IMIFC do que nos pintos Controle no 3º dia e maior nos pintos do tratamento IMIP do que nos Controle no 5º dia.

A altura dos vilos foi influenciada pela interação significativa entre tratamentos e dias pós-inoculação nos três segmentos intestinais (Tabela 3).

A interação (Tabelas 3 e 4), mostrou que, nos pintos Controle, a altura de vilo do duodeno (AVD) aumentou significativa e progressivamente até o 7º dia pós-inoculação. A interação também mostrou a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos no 3º dia, no qual os pintos do tratamento IMIP apresentaram AVD menor do que os pintos dos outros dois tratamentos (Controle e IMIFC).

No jejuno, a altura dos vilos (AVJ) (Tabela 4) aumentou progressiva e significativamente ($p < 0,05$) até o 5º dia pós-inoculação, mantendo-se constante deste até o 7º dia, nos pintos Controle e do tratamento IMIP. Nos pintos do tratamento IMIFC, entretanto, a AVJ aumentou do 1º para o 3º dia pós-inoculação, manteve-se inalterada do 3º até o 5º e aumentou novamente do 5º até o 7º dia ($p < 0,05$). Em comparação aos pintos Controle, os pintos do tratamento IMIFC tiveram AVJ menores no 1º dia pós-inoculação, enquanto que os do tratamento IMIP a AVJ foi maior a partir do 5º dia.

No íleo, a altura dos vilos (AVI) aumentou significativo ($p < 0,05$) do 1º para o 7º dia pós-inoculação em todos os tratamentos (Tabela 4). Entretanto, os pintos do tratamento IMIP tiveram aumento significativo e progressivo na AVJ do 1º para o 7º dia, enquanto que nos pintos Controle e do tratamento IMIFC isso ocorreu do 3º para o 7º dia. No 1º dia pós-inoculação, os pintos inoculados (IMIFC e IMIP) apresentaram menor AVJ que os pintos Controle, mas a partir do 5º dia os valores apresentados pelos mesmos já eram significativamente maiores. No 7º dia, a AVI

foi maior ($p < 0,05$) inclusive nos pintos do tratamento IMIFC do que nos do tratamento IMIP.

Houve interação significativa entre tratamentos e dias pós-inoculação para a profundidade das criptas intestinais do duodeno e íleo (Tabela 3).

A profundidade das criptas duodenais (PCD) (Tabela 5) aumentou progressiva e significativamente ($p < 0,05$) até o 5º dia pós-inoculação, mantendo-se constante do 5º até o 7º dia, nos pintos inoculados (IMIFC e IMIP). Nos pintos Controle, a PCD se manteve constante até o 3º dia, aumentou do 3º para o 5º dia, e manteve-se inalterada do 5º ao 7º dia. Comparação entre tratamentos mostrou diferenças entre os mesmos no 1º e 7º dia pós-inoculação, sendo a PCD menor ($p < 0,05$) nos pintos IMIFC do que nos pintos Controle e nos do tratamento IMIP. Em relação ao íleo (Tabela 5), a profundidade das criptas aumentou progressiva e significativamente ($p < 0,05$) do 3º até o 7º dia pós-inoculação nos pintos Controle e do 1º ao 7º dia nos pintos do tratamento IMIFC, enquanto que nos pintos do tratamento IMIP o aumento ocorreu do 3º para o 5º dia, mantendo-se a altura constante até o 7º dia. Ao final do período experimental (7º dia pós-inoculação), os pintos do tratamento IMIFC apresentaram profundidade de cripta ílica maior dos que os pintos dos demais tratamentos.

As densidades de vilos dos três segmentos intestinais apresentaram interação entre tratamentos e dias pós-inoculação ($p < 0,05$) (Tabela 3).

A densidade de vilos duodenais (DVD) nos pintos Controle foi maior no 1º dia pós-inoculação do que nos demais dias (3º, 5º e 7º), os quais não diferiram entre si quanto a este parâmetro (Tabela 6). Nos pintos inoculados (IMIP e IMIFC), ocorreu diminuição progressiva e significativa ($p < 0,05$) na DVD até o 5º dia, deste até o 7º dia a DVD permaneceu inalterada.

No jejuno, de acordo com a interação entre tratamentos e dias pós-inoculação (Tabela 6), nos pintos Controle, houve diminuição gradativa e significativa da DVJ a partir do 3º dia pós-inoculação. Nos pintos dos tratamentos IMIFC e IMIP, a redução na DVJ também foi progressiva e significativa ($p < 0,05$), mas ocorreu do 1º ao 5º dia, ficando inalterada do 5º ao 7º dia.

Por sua vez, a densidade de vilos do íleo (DVI), de acordo com a interação entre tratamentos e dias pós-inoculação (Tabela 6), foi influenciada pelo tratamento em todas as idades. Os pintos do tratamento IMIFC apresentaram menor DVI do que os pintos Controle no 1º dia pós-inoculação, mas tiveram maior DVI do que os mesmos a partir do 3º dia e maior do que os pintos do tratamento IMIP a partir do 5º dia. Os pintos do tratamento IMIP, por sua vez, apresentaram maior DVI do que os pintos Controle no 3º e menor do que os mesmos no 5º dia. Em relação ao comportamento da DVI ao longo das idades, nos pintos Controle ocorreu redução progressiva e significativa ($p < 0,05$) até o 5º dia pós-inoculação e manutenção da mesma do 5º até o 7º dia. Nos pintos do tratamento IMIFC, a DVI diminuiu ($p < 0,05$) apenas do 5º para o 7º dia pós-inoculação. Já nos pintos do tratamento IMIP, a DVI diminuiu progressiva e significativamente ($p < 0,05$) até o 5º dia pós-inoculação, aumentando, em seguida, até o 7º dia.

Tabela 1. Efeitos dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (DPI) (1, 3, 5, 7 dias) sobre o comprimento (cm) do duodeno e comprimento do jejuno + íleo (cm), de pintos de corte machos.

	Comprimento	
	Duodeno	Jejuno + Íleo
Tratamentos (T)		
Controle	12,83	49,05
IMIFC	11,98	47,86
IMIP	13,60	52,80
DPI		
1	9,37 c	35,27
3	11,37 b	39,27
5	14,70 a	58,13
7	15,77 a	66,93
Probabilidades		
T	0,200 NS	0,510 NS
DPI	<0,01	<0,01
T x DPI	0,056 NS	<0,01

a-c: comparação nas colunas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 2. Interações entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre o comprimento do jejuno + íleo (cm) em pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				p	CV (%)
	1	3	5	7		
Comprimento Jejuno+Íleo						
Controle	35,20 aC	42,40 aC	54,40 bB	64,20 aA	<0,01	8,50
IMIFC	33,62 aC	36,60 bC	55,60 bB	65,60 aA	<0,01	6,69
IMIP	37,00 aC	38,80 abC	64,40 aB	71,00 aA	<0,01	5,91
p	0,358NS	0,0153	<0,01	0,057NS		
CV (%)	10,14	6,78	6,03	6,28		

a-b: comparação nas colunas, A-C: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 3. Efeitos dos tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre a altura dos vilos (μm), profundidade das criptas (μm) e densidade de vilos do duodeno, jejuno e íleo, de pintos de corte machos.

	Altura dos Vilos			Profundidade das Criptas			Densidade de Vilos		
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
Tratamentos (T)									
Controle	714,83	414,99	369,06	158,99	134,69	134,12	41,40	63,60	71,10
IMIFC	725,89	405,89	474,94	150,49	129,57	143,31	41,10	60,50	85,80
IMIP	696,13	447,57	402,26	164,33	143,43	135,21	45,25	57,80	73,20
DPI									
1	571,17	306,19	306,29	95,17	86,05 c	95,83	52,60	84,13	107,86
3	619,22	401,23	354,78	140,91	130,09 b	119,62	37,70	71,73	84,13
5	799,03	468,49	396,06	198,29	158,75 a	156,92	33,20	46,93	58,53
7	859,72	515,36	604,53	197,10	168,70 a	177,83	33,46	39,73	56,20
Probabilidades									
T	0,347 NS	0,294 NS	0,078 NS	0,060 NS	0,484 NS	0,668 NS	0,562 NS	0,216 NS	0,154 NS
DPI	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,0350	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
T x DPI	<0,01	<0,01	<0,01	0,010	0,563 NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

a-c: comparação nas colunas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 4. Interações entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre a altura dos vilos (μm) do duodeno, jejuno e íleo, de pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				p	CV (%)
	1	3	5	7		
Duodeno						
Controle	552,67 aD	674,02 aC	763,23 aB	869,38 aA	<0,01	6,01
IMIFC	572,79 aB	687,67 aAB	815,28 aA	827,83 aA	<0,01	7,43
IMIP	588,06 aB	495,96 bB	818,58 aA	881,94 aA	<0,01	12,34
p	0,596 NS	<0,01	0,455 NS	0,579 NS		
CV (%)	9,45	5,26	9,47	9,75		
Jejuno						
Controle	314,13 aC	402,16 aB	464,61 bA	479,08 bA	<0,01	6,26
IMIFC	268,38 bC	403,55 aB	424,58 bB	527,03 abA	<0,01	5,48
IMIP	336,05 aC	397,98 aB	516,28 aA	539,96 aA	<0,01	9,31
P	<0,01	0,962 NS	<0,01	0,026		
CV (%)	8,53	8,15	6,15	6,21		
Íleo						
Controle	330,12 aC	350,39 aBC	370,84 bB	424,87 cA	<0,01	5,51
IMIFC	289,58 bC	349,87 aBC	394,83 abB	865,46 aA	<0,01	7,24
IMIP	299,17 bD	364,06 aC	422,53 aB	523,27 bA	<0,01	8,97
P	<0,01	0,504 NS	<0,01	<0,01		
CV (%)	4,22	5,95	4,53	9,31		

a-b: comparação nas colunas, A-D: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 5. Interação entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre a profundidade das criptas (μm) do duodeno, em pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				P	CV (%)
	1	3	5	7		
Duodeno						
Controle	103,35 aB	127,36 aB	189,27 aA	215,58 aA	<0,01	9,59
IMIFC	87,93 bC	148,27 aB	190,32 aA	175,05 bAB	<0,01	12,03
IMIP	94,24 abC	147,12 aB	215,29 aA	200,67 abA	<0,01	12,76
P	<0,01	0,132NS	0,143NS	0,046		
CV (%)	6,60	12,02	10,95	11,62		
Íleo						
Controle	104,35 aC	113,29 aC	144,86 aB	173,94 bA	<0,01	7,45
IMIFC	90,85 aD	125,73 aC	162,82 aB	193,84 aA	<0,01	6,89
IMIP	92,27 aB	119,78 aB	163,08 aA	165,71 bA	<0,01	11,25
P	0,178NS	0,250NS	0,129NS	<0,01		
CV (%)	12,23	9,32	9,52	5,24		

a-b: comparação nas colunas, A-C comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Tabela 6. Interação entre tratamentos (sem inoculação: Controle, inoculação de microbiota intestinal de frangos de corte: IMIFC, inoculação de microbiota intestinal de poedeiras: IMIP) e dias pós-inoculação (1, 3, 5, 7 dias) sobre a densidade de vilos (nº vilos por área) no duodeno, jejuno e íleo, de pintos de corte machos.

Tratamentos	Dias pós-inoculação				P	CV (%)
	1	3	5	7		
Duodeno						
Controle	59,80 aA	38,20 aB	34,60 aB	33,00 abB	<0,01	10,51
IMIFC	52,00 abA	40,60 aB	34,40 aC	37,40 aBC	<0,01	8,60
IMIP	46,00 bA	34,40 bB	30,60 aC	30,00 bC	<0,01	7,54
P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		
CV (%)	13,08	8,98	5,62	6,46		
Jejuno						
Controle	86,20 aA	77,80 aA	52,40 bB	38,00 bC	<0,01	10,05
IMIFC	86,80 aA	68,20 abB	45,00 bC	42,00 bC	<0,01	7,59
IMIP	79,40 aA	59,20 bB	83,40 aA	59,20 aB	<0,01	8,28
p	0,049	0,010	<0,01	<0,01		
CV (%)	5,52	11,62	7,79	9,45		
Íleo						
Controle	109,00 aA	68,00 bB	53,20 bC	54,00 bC	<0,01	5,83
IMIFC	97,20 bA	91,40 aA	88,80 aA	65,80 aB	<0,01	7,11
IMIP	117,40 aA	93,00 aB	33,60 cD	48,80 bC	<0,01	9,44
p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		
CV (%)	5,22	8,23	12,56	6,37		

a-c: comparação nas colunas, A-C: comparação nas linhas. Médias com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Figura 1. Eletromicrografia da densidade de vilos (nº vilos por área) no duodeno de pintos de corte machos.

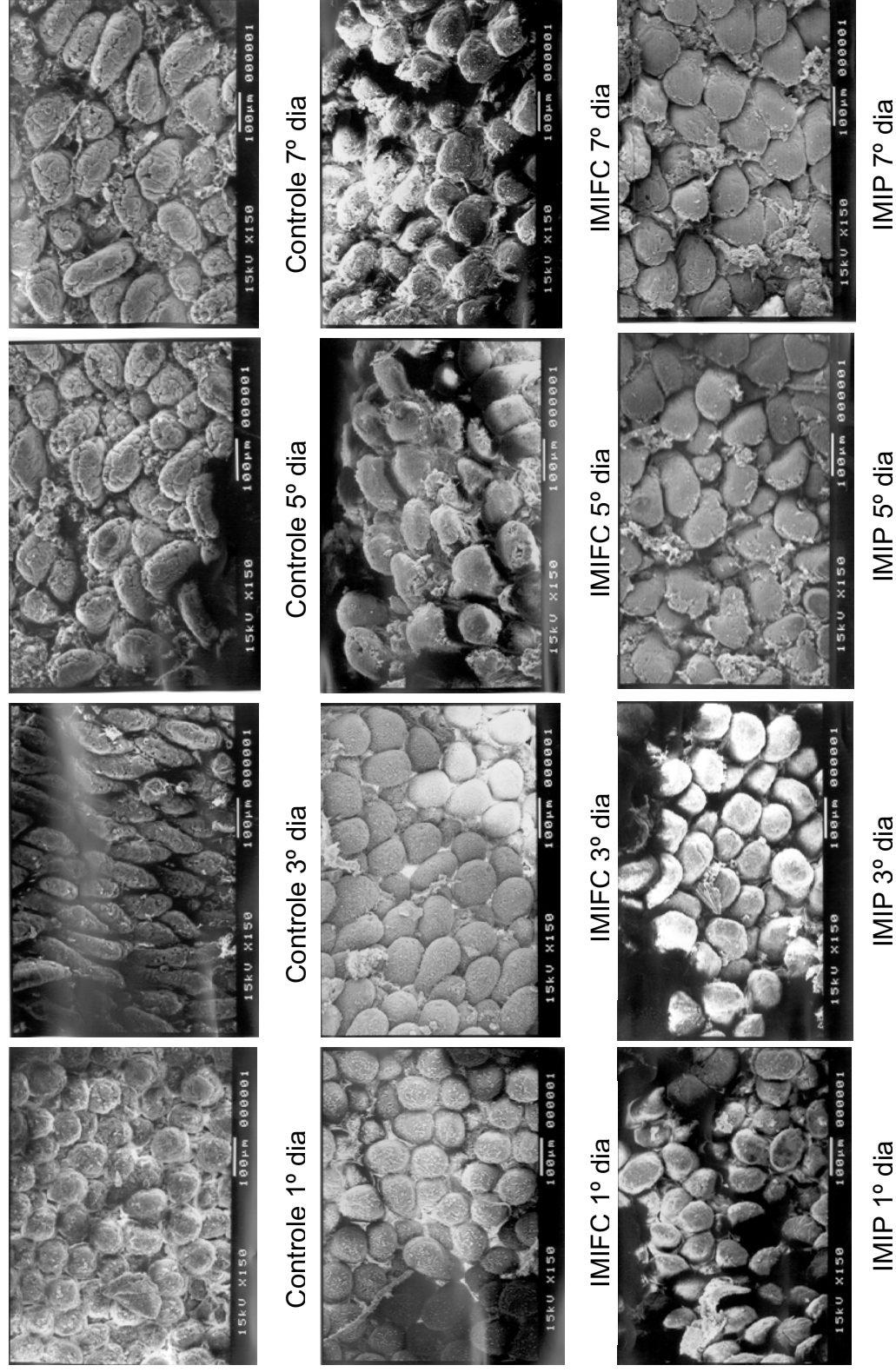


Figura 2. Eletromicrografia da densidade de vilos (nº vilos por área) no jejuno de pintos de corte machos.

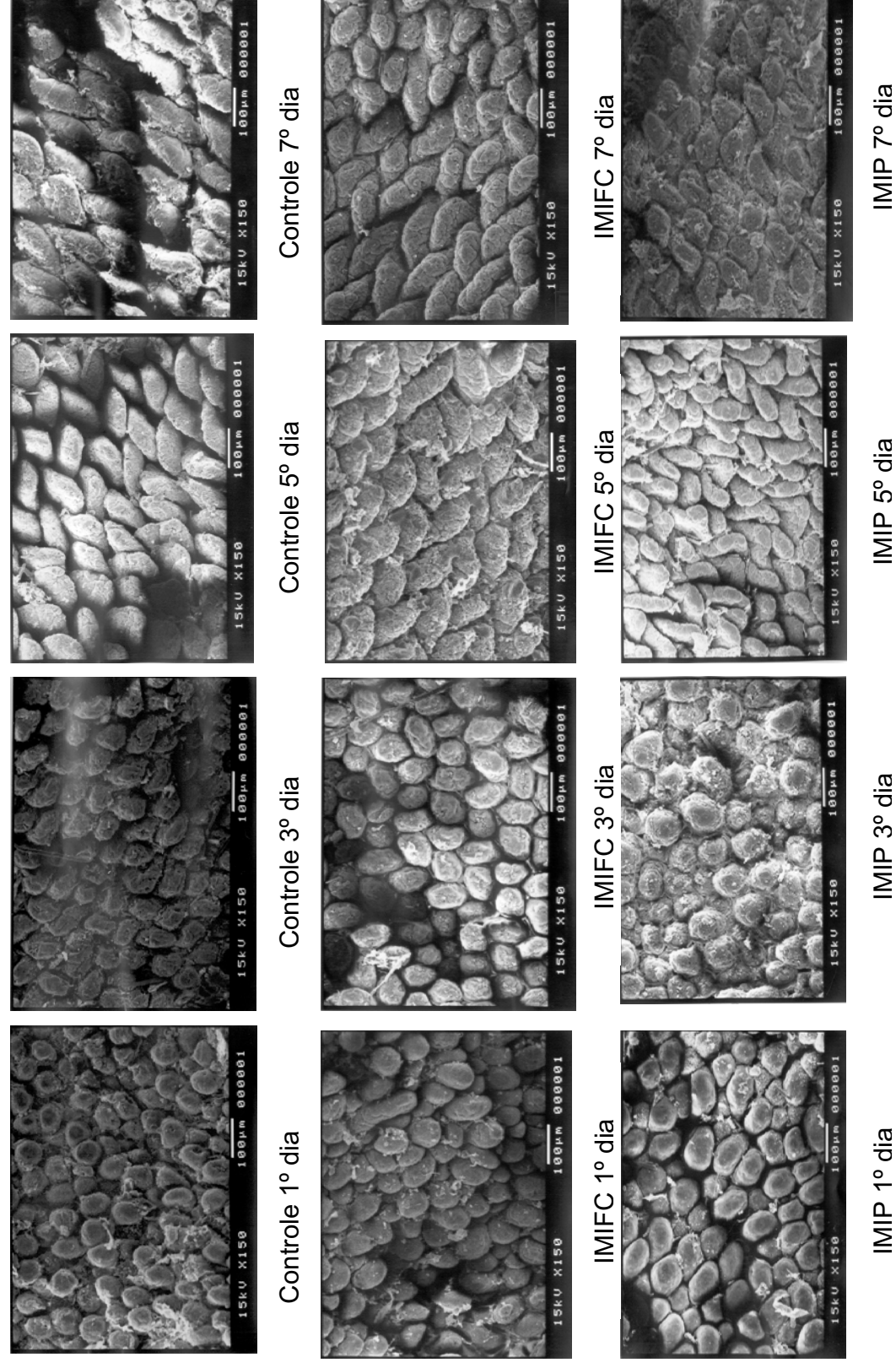
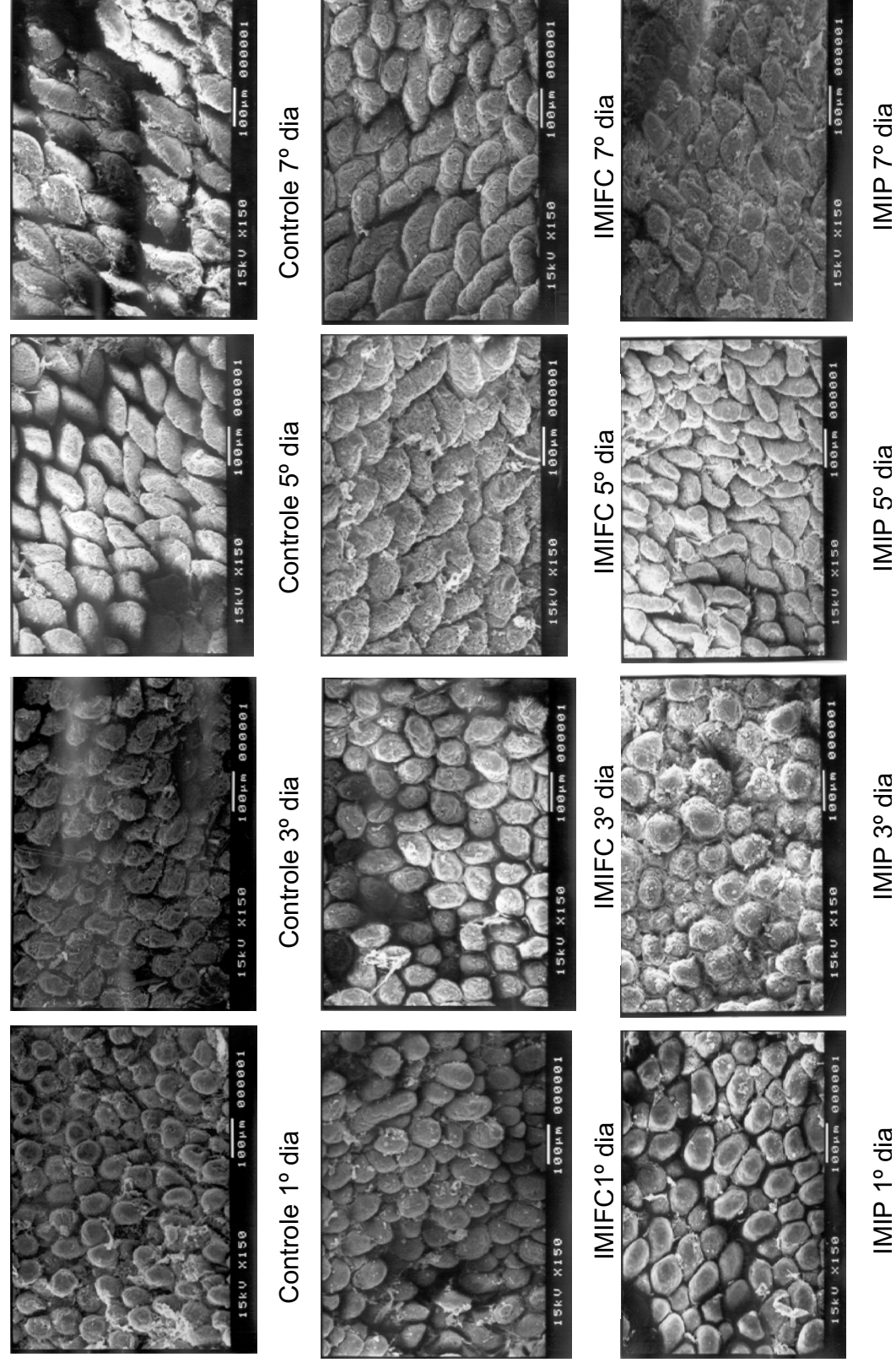


Figura 3. Eletromicrografia da densidade de vilos (n° vilos por área) no íleo, de pintos de corte machos.



Discussão

De acordo com os resultados, a inoculação de microbiota intestinal de aves adultas não influenciou o padrão de crescimento em comprimento do intestino delgado ao longo da primeira semana de vida dos pintos. Por outro lado, influenciou apenas o CJI e pontualmente, ocorrendo diminuição no CJI influenciado pelo tratamento IMIFC no 3º dia e aumento influenciado pelo tratamento IMIP no 5º dia pós-inoculação. Considerando que jejuno e íleo correspondem às regiões de absorção intestinal, os dados indicam que a inoculação de microbiota intestinal promoveu um aumento apenas temporário nesta área intestinal. ENGLAND *et al.* (1996) registraram comprimento intestinal inferiores para perus suplementados com probiótico em relação aos perus Controle. SATTO (2001), entretanto, não encontrou diferenças significativas no comprimento do intestino delgado de frangos de corte que receberam probiótico.

Em relação à altura dos vilos, os dados mostram que os três segmentos intestinais respondem de forma distinta à inoculação de microbiota intestinal dos tratamentos IMIFC e IMIP. A AVD foi influenciada apenas pelo tratamento IMIP e no 3º dia, quando as aves do mesmo apresentaram menor altura de vilo que os demais tratamentos. No jejuno, ocorreu influência imediata e do tratamento IMIFC, cujas aves apresentaram menor AVD que as dos demais tratamentos. Também houve efeito do tratamento IMIP no 5º e 7º dias pós-inoculação, nos quais as aves apresentaram maior AVJ, indicando um efeito tardio e mais longo deste tratamento em relação ao tratamento IMIFC. No íleo, por sua vez, a altura dos vilos foi influenciada negativamente de forma imediata e focal (no 1º dia pós-inoculação) por ambos os inóculos (tratamentos IMIFC e IMIP). Em seguida, entretanto, os tratamentos com inoculação de microbiota intestinal promoveram um aumento da AVI em relação ao controle no 5º (IMIP) e 7º (IMIFC e IMIP) dia pós-inoculação.

Altura dos vilos é um parâmetro indicativo de crescimento em altura dos mesmos. Dessa forma, aumento na altura dos vilos do jejuno e íleo sugerem aumento da área de superfície absorptiva, capaz de uma maior absorção dos nutrientes disponíveis (CASPARY, 1992; MORAN, 1985).

De um modo geral, os dados mostram um efeito inibitório inicial e imediato da inoculação de microbiota intestinal sobre o crescimento em altura dos vilos do jejuno e íleo, seguida por um efeito estimulador sobre o mesmo em ambos os segmentos, indicando, mais uma vez, o efeito dos tratamentos de inoculação sobre as regiões intestinais destinadas a absorção.

Em linhas gerais, a inoculação de microbiota intestinal não promoveu grandes alterações na profundidade das criptas intestinais. No duodeno, valores menores de profundidade de cripta foram verificados apenas para as aves do tratamento IMIFC e no 1º e 7º dias pós-inoculação, enquanto que no íleo criptas mais profundas foram registradas para as aves do tratamento IMIFC e apenas no 7º dia. Profundidade de cripta é um dado indicativo do crescimento dos vilos e da taxa de renovação celular, já que um aumento da mesma ocorre em função de um aumento na taxa de proliferação celular (mitoses). Tais dados estão dentro do esperado, considerando que a taxa de renovação celular (Capítulo 3) foi reduzida e retardada pela inoculação de microbiota intestinal. Além disso, no 7º dia, nas aves do tratamento IMIFC, parece haver uma relação positiva e temporal entre o aumento da profundidade de cripta e da altura dos vilos ílicos, cujos valores aumentaram acentuadamente do 5º para o 7º dia e em relação aos demais tratamentos.

Segundo COOK & BIRD (1973), aves criadas em ambientes convencionais apresentaram criptas 54% maiores do que aves “germ-free”. DOBROGOSZ *et al.* (1991) também obtiveram maior profundidade de cripta em aves suplementadas com *Bacillus reuteri*. BRADLEY *et al.* (1994), por sua vez, usando o probiótico *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram diminuição na profundidade da cripta. Nossos dados, entretanto, mostram efeito pontual da inoculação de microbiota intestinal sobre a profundidade de cripta e que o efeito da mesma difere entre os segmentos intestinais, podendo promover aumento, diminuição e, inclusive, não influenciar, como observado no jejuno. Tais diferenças entre os dados de diferentes autores podem estar relacionadas com o tipo e a concentração de microbiota intestinal utilizada, bem como com a técnica de fornecimento dos microrganismos.

Do ponto de vista temporal, assim como a altura de vilo, a profundidade de cripta também aumentou com a idade nos três segmentos intestinais. A cripta é responsável por 55% da capacidade de proliferação celular no intestino (BOLELI *et al.* 2002). Maiores valores de profundidade de cripta indicam maior potencial de proliferação celular para garantir adequada taxa de renovação epitelial (PLUSKE *et al.* 1997) e/ou crescimento dos vilos. Os dados do presente estudo estão de acordo com o esperado, desde que mostram uma relação temporal entre aumento da profundidade das criptas e crescimento dos vilos.

UNI *et al.* (1995) observaram mudanças na morfologia intestinal de frangos de corte no período de 4-21 dias de idade através de aumento na altura das vilosidades e profundidade de criptas em função da idade. CAMPOS (2006) também observou aumento na altura de vilos e profundidade de criptas conforme a idade.

LIMA (2000) verificou que tratamento contendo probiótico proporcionou maior altura de vilo aos 14 dias. Já para profundidade de cripta observou-se que a adição de probiótico aumentou significativamente o tamanho das criptas aos 7, 28 e 42 dias.

Segundo SELL (1996), durante as primeiras semanas de vida, o rápido crescimento do sistema digestório não apenas excede em muito aos outros sistemas de órgãos, mas também é essencial para que a ave atinja seu potencial genético. Por essas razões, danos na mucosa digestiva podem aumentar significativamente o requerimento de manutenção da ave. DIBNER *et al.* (1996) relataram que o vilo intestinal atingiu o comprimento de um vilo maduro por volta de 5 dias de idade, sugerindo que o crescimento inicial da ave pode ser limitado pela área de superfície do sistema gastrointestinal. A capacidade do trato digestivo dos frangos durante a primeira semana de vida pode ser considerada um fator limitante para o consumo de alimento, digestão e absorção de nutrientes para crescimento (SELL, 1996). Assim, substâncias que atuam no desenvolvimento da mucosa intestinal, estimulando o processo mitótico na região cripta/vilo, aumentando o número de células e o tamanho do vilo, aumentando sua

capacidade funcional, poderão propiciar melhor desempenho das aves pela maior capacidade de digerir e absorver os nutrientes da dieta.

Nossos dados mostram diminuição da densidade dos vilos ao longo da idade dos pintos, nos três segmentos intestinais e para os três tratamentos. A densidade de vilos é um parâmetro utilizado como indicativo do crescimento dos vilos em largura. Dessa forma, a diminuição na densidade dos vilos, citada anteriormente, juntamente com o aumento em altura dos vilos e maior profundidade das criptas já registradas indicam que a inoculação de microbiota intestinal dos tratamentos IMIFC e IMIP não inibiram o crescimento dos vilos na primeira semana de vida pós-eclosão, embora tenham influenciado a intensidade da mesma.

Conclusões

A IMIFC aumentou a altura de vilo no íleo a partir do 5º dia, enquanto que a IMIP promoveu aumento imediato e temporário na largura dos vilos nos três segmentos intestinais e aumento na altura dos mesmos no jejuno e íleo a partir do 5º dia. Do ponto de vista prático, o presente estudo mostra que aquisição de microbiota intestinal melhora o desenvolvimento da mucosa na primeira semana pós-eclosão de pintos de corte.

Referências

- BARANYIOVA, E.; HOLMAN, J. Morphological changes in the intestinal wall in fed fasted chicken in the first week after hatching. **Acta Vet. (Brno)**. Brno, v. 45, p. 151-158, 1976.
- BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLES, E. (Ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 75-95.
- BRADLEY, G. L.; SAVAGE, T. S.; TIMN, K. I. The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poult performance and ileal morphology. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 73, p. 1766-1770, 1994.
- CAMPOS, D. M. B. **efeito do sorgo sobre o desempenho zootécnico, características da carcaça e o desenvolvimento da mucosa intestinal de frango de corte**. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- CASPARY, W. F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **Am. J. Clin. Nutr.**, suppl., v. 55, n. 1, p. 299S-308S, 1992.
- COOK, R. H.; BIRD, F. H. Duodenal villus area and epithelial cellular migration in convention and germ-free chicks. **Poult. Sci.** Champaign, v. 52, p. 2276-2280, 1973.
- DIBNER, J. J.; KITCHELL, M. L.; ATWELL, C. A.; IVEY, F. J. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. **J. Appl. Poult. Res.**, Athens, v. 5, p. 70-77, 1996.
- DOBROGOSZ, W. J.; BLACK, B. L.; CASAS, I. A. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 70, suppl. 1, p. 158, 1991.
- ENGLAND, J. A.; WATKINS, S. E.; SALEH, E.; WALDROUP, P. W.; CASAS, I.; BURNHAM, D. Effects of *Lactobacillus reuteri* on live performance and intestinal development of male turkeys. **J. Appl. Poult. Res.**, Athens, v. 5, p. 311-324, 1996.

- FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **J. Appl. Bacteriol.** Oxford, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.
- HOUDIJK, J. G. M.; BOSCH, M. W.; TAMMINGA, S. Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. **J. Anim. Sci.** Champaign, v. 77, p. 148-158, 1999.
- LIMA, A. C. F. **Atividade de enzimas e morfometria intestinal de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com enzima e probiótico.** 2000. 78 f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- MAIORKA, A.; MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.** Jaboticabal: FUNEP, 2002. 113-123p.
- MORAN, Jr. E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **J. Nutr.**, Philadélphia, v. 115, p. 665-674, 1985.
- NAKAGE, E. S. **Respostas fisiológicas de pintos submetidos a diferentes períodos de jejum: parâmetros hematológicos e intestinais.** 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia – Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- OLIVEIRA G. H.; BERCHIERI JR. A.; BARROW P. A. Prevention of *Salmonella* infection by contact using intestinal flora of adults birds and/or a mixture of organic acids. **Braz. J. Microb.** São Paulo, v. 31, n. 2, p. 116-120; 2000.
- OVERTON, J.; SHOUP, J. Fine structure of cell surface specializations in the maturing duodenal mucosa of the chick. **J. Cell Biol.** New York, v. 21, p. 75, 1964.
- PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e Ultra-Estrutura da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte alimentados com Dietas contendo diferentes Probióticos. **Rev. Port. Ciênc. Vet.** Lisboa, v. 98, n. 547, p. 125-134, 2003.
- PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock. Prod. Sci.**, v. 51, p. 215-236, 1997.
- SAS INSTITUTE. **SAS® user's guide: statistics.** 2002. SAS., Cary. 2002.
- SATO, R. N. **Ação isolada e combinada de probiótico e antibiótico como**

promotores de crescimento em rações iniciais de frangos de corte. 2001. 48 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

SELL, J. L. Physiological limitations and potential for improvement in gastrointestinal tract function of poultry. **J. Appl. Poult. Res.** Athens, v. 5, p. 96-101, 1996.

STERZO, E. V. **Avaliação morfológica do intestino e hematológica de aves de corte (*Gallus gallus domesticus*) infectados experimentalmente por *Salmonella enteritidis* e submetidos ao tratamento por exclusão competitiva.** 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestines in heavy and light strain chicks. **Poult. Sci.**, Champaign, v. 74, p. 1622-1629, 1995.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poult. Sci.** Champaign, v. 77, n. 1, p. 75-82, 1998.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **Poult. Sci.** Champaign, v. 60, p. 101-111, 2004.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Arch. Anim. Nutr.** Berlin, v. 40, p. 477-484, 1990.

Apêndice

Inóculo de frangos de corte (IMIFC) e poedeiras (IMIP) adultos.



IMIFC

IMIP