

EFEITO DO PROBIÓTICO *Saccharomyces boulardii* NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DE FRANGOS DE CORTE

CAMILA VON MÜHLEN¹; NEIDA LÚCIA CONRAD²; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES³, FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁴; ALINE ARASSIANA PICCINI ROLL⁵; VICTOR FERNANDO BÜTTOW ROLL⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – camila_vonmuhlen@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – apiroll@yahoo.es

⁶Universidade Federal de Pelotas – roll2@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é segundo maior produtor e maior exportador de carne de frango do mundo (ABPA, 2023), consolidando-se como uma potência na indústria avícola. O sucesso da produção de frangos de corte está diretamente relacionado com a sanidade e o bem-estar do lote, portanto o surgimento de novas ideias é imprescindível para o aperfeiçoamento da produção.

Algumas das principais enfermidades que acometem a avicultura de corte atualmente são causadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* sp., e se tratando de uma zoonose, passa a ser uma barreira ao comércio internacional (PICKLER *et al.*, 2012). Outro gênero importante na produção avícola é a *Pasteurella multocida*, causadora da cólera aviária, doença que afeta o trato respiratório e que traz grandes prejuízos à produção (BAKSI *et al.*, 2018).

O uso de probióticos se tornou uma ferramenta para aprimorar o sistema de produção, estes, são classificados como microrganismos não patogênicos com capacidade de melhorar a estrutura intestinal e aumentar a imunidade dos animais (RAJPUT; LI, 2012). Em decorrência disso, esse efeito pode melhorar o desempenho e a saúde do animal, trazendo vantagens no sistema de produção.

As leveduras são microrganismos pertencentes ao reino Fungi, sendo *Saccharomyces* o gênero principal entre elas (RAJPUT *et al.*, 2013). Visto isso, *Saccharomyces boulardii* é uma das espécies que vem sendo utilizada como probiótico para melhorar a saúde intestinal, trazendo resultados para a produção (SOUZA *et al.*, 2021).

Outra razão para o uso de probióticos é sua função de estimular o sistema imunológico das aves, sendo também uma alternativa ao uso de antibióticos para combater agentes patogênicos que causam doenças (BRISBIN *et al.*, 2011). Além disso, o uso de probióticos também pode modular a resposta imunológica de vacinas comerciais.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta humoral e celular de frangos de corte vacinados contra cólera e tifo aviário e suplementados com dietas contendo *Saccharomyces boulardii*.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Prof. Renato Rodrigues Peixoto, do Departamento de Zootecnia da

Universidade Federal de Pelotas. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEA: 9053).

Foram utilizados 45 pintos de corte, com 1 dia de idade, da linhagem comercial Cobb. Os animais foram distribuídos em 3 grupos, contendo 15 animais em cada: T1 – vacinados e não suplementados; T2 – vacinados e suplementados com *Saccharomyces boulardii* e T3 – não vacinados e não suplementados.

As dietas, à base de milho e farelo de soja, foram adicionadas da levedura *on-top* na mistura dos ingredientes, sendo 1L de levedura para cada 100 kg de ração, resultando na concentração final de 1×10^7 UFC/g de ração, suplementadas durante todo período experimental.

Os animais foram vacinados com uma vacina comercial contra cólera e tifo aviário (*Pasteurella multocida* e *Salmonella gallinarum*). Amostras de sangue para obtenção do soro foram coletadas a partir de punção na veia ulnar nos dias 0 e 21 após a vacina.

A resposta imune humoral foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para isso placas de 96 cavidades (CRAL[®] Brasil) foram sensibilizadas com a vacina comercial diluída em tampão carbonato bicarbonato, e incubadas por 1h e 30 min a 37°C. Os soros coletados foram diluídos 1:100 e adicionados nas placas em duplicata. A seguir foi adicionado o anticorpo conjugado anti-IgY de galinha, diluído em 1:4000 em PBS. Por fim, foi adicionado 100µL de solução de revelação (10mL de tampão para substrato, 0,004g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) e 15µL de H₂O₂). As placas foram incubadas por 15 min no escuro a temperatura ambiente, e posteriormente para interromper a reação foram adicionados 50µL por cavidade de H₂SO₄ 3%. Entre cada etapa as placas foram lavadas 4X com PBS-T. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK) com filtro de 492 nm.

Para a resposta imune celular foi realizado o cultivo de esplenócitos a partir do baço dos frangos. Foram feitos dois diferentes estímulos *in vitro*: vacina e Concanavalina A (controle). Com 24 h de estímulo, foi realizada a coleta das células e extração de RNA das amostras a partir do protocolo do Trizol (Sigma-Aldrich) e síntese de cDNA para a realização da técnica de qPCR com os primers para *IFN γ* , *IL2*, *IL17A*, *IL12*, *IL22* e β -actina como controle endógeno.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism[®] 8.0.1. Os valores médios dos níveis de IgY obtidos por ELISA indireto foram submetidos à análise de variância (ANOVA de uma via), diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey. As diferenças entre os níveis de transcrição de citocinas dos grupos vacinados e não vacinados foram analisadas pelo teste t de Student.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação com o probiótico acentuou a resposta à vacina contra a cólera e tifo nos frangos de corte (Figura 1), o grupo suplementado apresentou maior níveis de anticorpos quando comparado ao grupo não suplementado. Esse resultado corrobora com os encontrados por SANTOS *et al.*, 2021 e ROOS *et al.*, 2010, onde relataram que a suplementação com *Saccharomyces boulardii* incrementou na resposta imune frente à diferentes vacinas em ovinos, e com NARI *et al.*, 2020 em que observaram um aumento no nível de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa em frangos de corte utilizando *Saccharomyces boulardii* como suplementação.

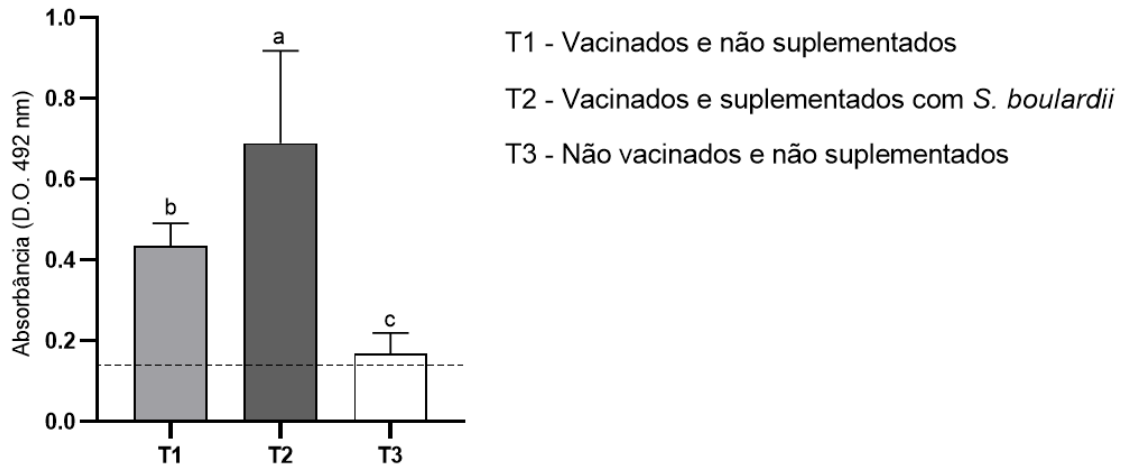


Figura 1: IgY total específica contra a vacina comercial de cólera e tifo aviário. Os dados representam a média das absorbâncias (+/- desvio padrão) de IgY em frangos de corte suplementados com *Saccharomyces boulardii* e controles vacinados ou não contra cólera e tifo. O *cut-off* foi determinado na média dos valores obtidos no dia 0 mais 3 vezes o desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A *IL2* teve um aumento de aproximadamente 15 vezes no grupo não vacinado em relação ao grupo vacinado (Figura 2), a transcrição das citocinas *IL17A*, *IL12* e *IL22* foram superiores 2.4, 6.0 e 1.9 vezes respectivamente quando comparados ao grupo não vacinado. As citocinas *IL17A*, *IL22* e *IL12* tem funções pró-inflamatórias, sinalizando e recrutando células do sistema imune. A transcrição de *IFN γ* não diferiu entre os grupos.

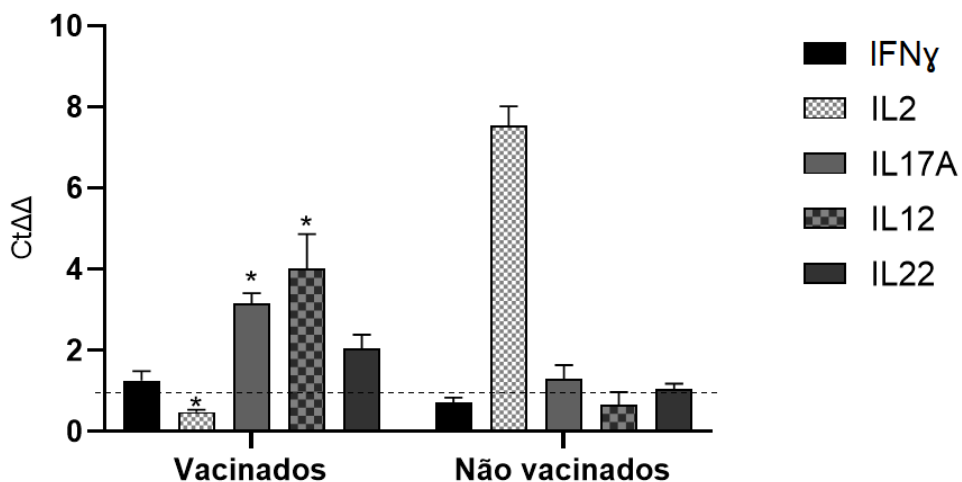


Figura 2: Transcrição relativa das citocinas *IFN γ* , *IL2*, *IL17A*, *IL12* e *IL22* em esplenócitos de frangos de corte nos grupos suplementados com *S. boulardii* e vacinados com vacina comercial contra cólera e tifo aviário e suplementados com *S. boulardii* não vacinados. As células foram estimuladas *in vitro* com o antígeno vacinal e a linha de *cut-off* foi traçada em 1 que representa as células sem estímulo. (*) = diferença significativa.

4. CONCLUSÕES

Os frangos de corte vacinados e suplementados com *Saccharomyces boulardii* apresentaram níveis de anticorpos significativamente ($p < 0,05$) superior ao grupo não suplementado. A transcrição relativa das citocinas demonstram a ativação de resposta celular. Assim, os resultados sugerem que a suplementação teve efeito imunomodulador a nível humoral e celular na resposta vacinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2023. Disponível em <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>.

BAKSI, S. *et al.* Efficacy of Inactivated Fowl Cholera Vaccine in Chickens. **PSM Veterinary Research**, v. 3, n. 2, p. 32–35, 2018.

BRISBIN, J. T. *et al.* Oral Treatment of Chickens with *Lactobacilli* Influences Elicitation of Immune Responses. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 9, p. 1447–1455, 2011.

NARI, N. *et al.* Intestinal microbial ecology, immune response, stress indicators, and gut morphology of male broiler chickens fed low-phosphorus diets supplemented with phytase, butyric acid, or *Saccharomyces boulardii*. **Livestock Science**, v. 234, p. 103975, 2020.

PICKLER, L. *et al.* Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis* e *Minnesota* e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2012.

RAJPUT, I. R. *et al.* Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 4, p. 956–965, 2013.

RAJPUT, I. R.; LI, W. F. Potential Role of Probiotics in Mechanism of Intestinal Immunity. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 3, p. 303-308, 2012.

ROOS, T. B. *et al.* Effect of *Bacillus cereus* var. *Toyo* and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v. 21, n. 2, p. 113–118, 2010.

SANTOS, F. D. S. *et al.* Immunomodulatory effect of short-term supplementation with *Bacillus toyonensis* BCT-7112T and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in sheep vaccinated with *Clostridium chauvoei*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 237, p. 110272, 2021.

SOUZA, H. F. de *et al.* On probiotic yeasts in food development: *Saccharomyces boulardii*, a trend. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e92321, 2021.