

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Avaliação da suplementação com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre respostas imunológicas, fisiológicas e microbiológicas em frangos de corte

Camila Von Mühlen

Pelotas, 2024

Camila Von Mühlen

Avaliação da suplementação com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre respostas imunológicas, fisiológicas e microbiológicas em frangos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, na Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Professor Dr. Victor Fernando Büttow Roll
Coorientador: Professor Ph.D. Fábio Pereira Leivas Leite
Coorientadora: Dra. Aline Arassiana Piccini Roll

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

M952a Mühlen, Camila Von

Avaliação da suplementação com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre respostas imunológicas, fisiológicas e microbiológicas em frangos de corte [recurso eletrônico] / Camila Von Mühlen ; Victor Fernando Büttow Roll, orientador ; Fábio Pereira Leivas Leite, Aline Arassiana Piccini Roll, coorientadores. — Pelotas, 2024.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Avicultura. 2. Imunidade. 3. Microbiota. 4. Probióticos. I. Roll, Victor Fernando Büttow, orient. II. Leite, Fábio Pereira Leivas, coorient. III. Roll, Aline Arassiana Piccini, coorient. IV. Título.

CDD 636.5

Camila Von Mühlen

Avaliação da suplementação com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre respostas imunológicas, fisiológicas e microbiológicas em frangos de corte

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de fevereiro de 2024.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Victor Fernando Büttow Roll (Orientador)
Doutor em Produção Animal pela Universidade de Zaragoza

Prof. Ph.D. Eduardo Gonçalves Xavier
Ph.D em *Animal Science* pela *University of Kentucky*

Prof. Ph.D. Fernando Rutz
Ph.D em *Animal Science* pela *University of Kentucky*

Profa. Dra. Fabiane Pereira Gentilini
Doutora em Fisiopatologia da reprodução pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Este trabalho apresenta resultados parciais do projeto de pesquisa (19/2551-0001985-8) apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS.

Agradecemos à IRGOVEL Indústria Riograndense de Óleos Vegetais Ltda., pelo fornecimento da casca de arroz utilizada como cama aviária.

Ao Sr. Raul Augusto Lopes Amaral e a Mig-PLUS Agroindustrial Ltda., pelo fornecimento do Núcleo vitamínico-mineral utilizado na formulação das dietas experimentais.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Fernando Büttow Roll, pelos ensinamentos e apoio durante toda minha trajetória acadêmica.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, pelos aprendizados e por me incluir na equipe do laboratório de Microbiologia.

À minha coorientadora Dra. Aline Arassiana Piccini Roll, pela parceria e por ser fundamental para a realização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio e ao Laboratório de Reprodução Animal Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande.

À Dra. Neida Lúcia Conrad, por toda paciência, aprendizado e amizade. E às minhas amigas do “lab 4”, Ana Vitória Costa, Mayara Caetano Abreu e Vitória Sequeira Gonçalves Zorzi, por me fazerem parte da sua equipe.

Ao laboratório de Parasitologia, em especial ao Jéferson Vidart Ramos e a Natália Berne Pinheiro, por toda ajuda.

À Renata Cedres Dias, pela parceria na realização desse trabalho.

À minha amiga Joyce Pereira Lopes, pelas longas conversas, mates e conselhos. E aos meus amigos e colegas do GEASPEL, Brenna, Débora e Bolívar.

À minha amiga e estagiária Rafaela Rutz Nunes, pela ajuda e amizade.

Às minhas amigas, Vandrielle, Giovana, Natália, Letícia, Bruna, Patrícia e Fabiana. Por estarem presentes na minha vida.

Ao meu namorado Abimael, pelo apoio e incentivo.

Aos meus pais Cristina e Mircon, e a minha irmã Pauline por me apoiarem durante minha trajetória.

Resumo

VON MÜHLEN, Camila. **Avaliação da suplementação com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre respostas imunológicas, fisiológicas e microbiológicas em frangos de corte.** Orientador: Victor Fernando Büttow Roll. 2024. 70 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

O objetivo com esse estudo foi avaliar a suplementação com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de frangos de corte, a fim de verificar seu efeito sobre a resposta imunológica, fisiológica e microbiológica. Para isso, foram utilizados 270 pintos de corte com um dia de vida da linhagem comercial *Cobb 500*, distribuídos em 45 boxes. Foram avaliadas as respostas humoral e celular frente a uma vacina comercial, a contagem diferencial de leucócitos, medidas biométricas de estresse oxidativo, microbioma fecal e contagem de ovos e oocistos das fezes. Foi possível concluir que na resposta humoral frente a vacina, ambos os probióticos aumentaram o nível de anticorpos nos frangos vacinados, os animais suplementados com *S. boulardii* e *S. cerevisiae* tiveram um aumento de 1,6 e 1,5 vezes, respectivamente, no nível de IgY com relação aos não suplementados. A transcrição das citocinas foi similar nos grupos suplementados e não suplementados. Para a variável leucócitos, observou-se que *S. boulardii* aumentou a quantidade de linfócitos e diminuiu a relação heterófilos/linfócitos em 12,2 e 27,9% respectivamente, enquanto que *S. cerevisiae* não demonstrou diferenças. Nenhum probiótico influenciou significativamente os valores biométricos de estresse oxidativo. Os dois probióticos foram capazes de modular a microbiota reduzindo a abundância de microrganismos nos 4 filos observados. *S. boulardii* apresentou efeito ovicida e oocistocida de 19,0% e 2,0% respectivamente, enquanto *S. cerevisiae* demonstrou 33,3% e 29,7% respectivamente. *S. cerevisiae* demonstrou ser mais eficaz no efeito ovicida e oocistocida que os demais tratamentos.

Palavras-chave: avicultura; imunidade; microbiota; probióticos.

Abstract

VON MÜHLEN, Camila. **Evaluation of supplementation with *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae* on immunological, physiological, and microbiological responses in broiler chickens.** Advisor: Victor Fernando Büttow Roll. 2024. 70 f. Thesis (Master's in Animal Science). Animal Sciences Graduate Program. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

The aim of this study was to evaluate supplementation with *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae* in the diet of broiler chickens to assess their effects on immune, physiological, and microbiological responses. For this purpose, 270 one-day-old broiler chicks of the *Cobb* 500 commercial lineage were used, distributed across 45 pens. Humoral and cellular responses to a commercial vaccine, differential leukocyte count, oxidative stress biomarker measurements, fecal microbiome, and counts of eggs and oocysts in feces were evaluated. The study led to the conclusion that both probiotics contributed to an enhanced humoral response to the vaccine, resulting in an increased production of antibodies in broilers. The birds supplemented with *S. boulardii* and *S. cerevisiae* had a 1.6 and 1.5 times increase, respectively, in IgY levels compared to the non-supplemented ones. Cytokine transcription was similar in the supplemented and non-supplemented groups. Regarding the leukocyte variable, it was observed that *S. boulardii* increased the quantity of lymphocytes and decreased the heterophil/lymphocyte ratio by 12.2% and 27.9%, respectively, while *S. cerevisiae* showed no differences. None of the probiotics significantly influenced the oxidative stress biometric values. Both probiotics, nonetheless, demonstrated the ability to modulate the microbiota by reducing the abundance of microorganisms in the four phyla observed. *S. boulardii* exhibited ovicidal and oocysticidal effects of 19.0% and 2.0%, respectively, while *S. cerevisiae* demonstrated 33.3% and 29.7%, respectively. *S. cerevisiae* displayed superior efficacy in both ovicidal and oocysticidal effects compared to other treatments.

Key-words: immunity; microbiota; poultry production; probiotics.

Lista de figuras

Figura 1	Galpão experimental.....	24
Figura 2	Produção de leveduras.....	25
Figura 3	Distribuição e alojamento dos animais	26
Figura 4	Técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG).....	35
Figura 5	IgY total específica contra a vacina comercial de cólera e tifo aviário.....	37
Figura 6	Transcrição relativa das citocinas <i>IFNγ</i> , <i>IL17A</i> , <i>IL12</i> , <i>IL2</i> e <i>IL22</i> em esplenócitos de frangos de corte.....	40
Figura 7	Principais gêneros de bactérias detectados em amostras fecais de frangos de corte.....	50
Figura 8	Abundância de filos do tratamento controle comparados ao tratamento com suplementação de <i>S. boulardii</i>	51
Figura 9	Abundância de filos do tratamento controle comparados ao tratamento com suplementação de <i>S. cerevisiae</i>	52
Figura 10	Contagem de ovos e oocistos dos tratamentos <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e controle.....	53
Figura 11	Atividade ovicida e oocistocida dos probióticos sobre a contagem de ovos e de oocistos em frangos de corte.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1	Composição nutricional das dietas.....	27
Tabela 2	Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de qPCR para células.....	30
Tabela 3	Contagem diferencial de leucócitos aos 21 dias.....	42
Tabela 4	Contagem diferencial de leucócitos aos 42 dias.....	43
Tabela 5	Biomarcadores medidos em eritrócitos de frangos de corte aos 21 dias sob condições de controle, suplementados com <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> , vacinados ou não, e a interação entre os fatores....	46
Tabela 6	Biomarcadores medidos em eritrócitos de frangos de corte aos 42 dias sob condições de controle, suplementados com <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> , vacinados ou não, e a interação entre os fatores....	48

Lista de abreviaturas e siglas

BAS	Basófilos
DFI	Índice de fragmentação de DNA
D.O.	Densidade ótica
EOS	Eosinófilos
FLU	Fluidez da membrana
H/L	Relação heterófilos linfócitos
HET	Heterófilos
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IFN γ	Interferon gama
IgY	Imunoglobulina tipo Y
IL	Interleucina
LIN	Linfócito
LPO	Lipoperoxidação
MITO	Potencial de membrana mitocondrial
MON	Monócitos
OPG	Ovos por grama de fezes
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
UFC	Unidades formadoras de colônia
YM	Yeast Malt

Sumário

1 Introdução	13
2 Revisão Bibliográfica	15
2.1 Avicultura de Corte	15
2.2 Problemas sanitários	16
2.3 Sistema imune	17
2.4 Microbiota intestinal	18
2.5 Antibióticos	20
2.6 Probióticos	21
2.6.1 <i>Saccharomyces</i>	22
2.6.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.6.3 <i>Saccharomyces boulardii</i>	23
3 Metodologia	24
3.1 Aspectos éticos.....	24
3.2 Local Experimental	24
3.3 Produção de leveduras	25
3.4 Animais e tratamentos	26
3.5 Variáveis analisadas	28
3.5.1 Resposta humoral.....	28
3.5.2 Resposta celular	29
3.5.3 Contagem diferencial de leucócitos.....	30
3.5.4 Citometria de fluxo	31
3.5.5 Microbioma	33
3.5.4 Contagem de oocistos	34
3.6 Análise Estatística.....	35

4 Resultados e Discussão	37
4.1 Resposta humoral.....	37
4.2 Resposta celular	39
4.3 Contagem diferencial de leucócitos	42
4.3 Citometria de fluxo	45
4.3 Microbioma	49
4.3 Contagem de ovos e oocistos	53
5 Conclusões	57
Referências	58

1 Introdução

Com uma produção de quase 15 milhões de toneladas no ano de 2023, o Brasil é considerado o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango do mundo. Dessa, em torno de 33% é destinada ao comércio internacional (ABPA, 2023). Ao longo dos anos a avicultura de corte brasileira vem desenvolvendo seus meios de produção, aumentando seus índices produtivos e conquistando o mercado internacional.

A carne de frango é considerada a quarta maior *commoditie* agropecuária brasileira no quesito valor da produção (FAO, 2021), com um grande potencial de gerar empregos direta e indiretamente. Desde a produção dos insumos até o mercado interno e externo, a avicultura de corte exerce um papel essencial no fortalecimento da economia. Além das grandes empresas, cooperativas também desempenham uma função importante no desenvolvimento de pequenas regiões, as quais têm sua principal atividade voltada para a avicultura, impactando na qualidade de vida e aumentando o índice de desenvolvimento humano (IDH) dos municípios (ABPA, 2023).

A avicultura de corte aperfeiçoou seu sistema de produção com o passar dos anos. O avanço da tecnologia juntamente com o aprimoramento genético e um manejo voltado para o bem-estar animal fez com que a produção de frangos de corte seja uma das mais eficientes na cadeia de produção de proteína animal. Além disso, a carne de frango é considerada a proteína animal mais barata do mercado, e por não ter barreiras religiosas e culturais acaba se tornando a mais consumida e produzida no mundo (FAO, 2022).

A densidade das aves juntamente com um curto período de produção torna possível uma frequência elevada de ciclos anualmente, trazendo um bom retorno econômico ao produtor. Contudo, a alta densidade reflete diretamente no bem-estar e desempenho dos animais, e devido a essas circunstâncias, os lotes enfrentam grandes chances de infecções que podem ser causadas por inúmeras doenças; (Shynkaruk *et al.*, 2023; Wegner *et al.*, 2023).

Outra preocupação no setor avícola é o uso, em larga escala, de antibióticos como promotores de crescimento nos animais, que resultou no surgimento de bactérias e genes resistentes, além de resíduos no ambiente e em produtos de origem animal (Zhu *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2023). Contudo, a proibição do seu uso

na alimentação desencadeou uma queda no desempenho das aves, assim como maior mortalidade devido aumento das infecções intestinais (Zhen *et al.*, 2023).

Depois da proibição do uso de antibióticos, novas alternativas vêm sendo estudadas afim de melhorar a saúde, reduzir as infecções e melhorar a produção das aves (Okmathok *et al.*, 2023; Zhen *et al.*, 2023). Pesquisas utilizando novos produtos para substituir os antibióticos surgiram, como probióticos, prebióticos, fitobióticos, simbióticos, produtos à base de plantas, óleos essenciais e ácidos orgânicos (Toghyani *et al.*, 2011; Polycarpo *et al.*, 2017; Rafiq *et al.*, 2022; Ghazanfari *et al.*, 2023).

O uso de probióticos como substituto aos antibióticos tem sido objeto de estudo. Estes são classificados como microrganismos com efeitos benéficos para humanos e animais (FAO/OMS, 2001). Os microrganismos probióticos são capazes de colonizar o intestino e de competir com as bactérias patogênicas, melhorando a saúde, a imunidade e o bem-estar animal (Jan *et al.*, 2023), com isso, é esperado uma melhora no desempenho.

As leveduras são microrganismos pertencentes ao reino Fungi, sendo a *Saccharomyces* o principal gênero entre elas (Souza *et al.*, 2021). A *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces boulardii* são leveduras utilizadas como probióticos que vêm sendo estudadas para melhorar a saúde dos animais e melhorar seu desempenho (Rajput *et al.*, 2013).

Sendo assim, o objetivo com esse estudo foi avaliar a suplementação com *S. boulardii* e *S. cerevisiae* na dieta de frangos de corte, a fim de verificar seu efeito sobre as medidas biométricas de estresse oxidativo e parâmetros de células sanguíneas, modulação da microbiota intestinal, contagem diferencial de leucócitos, contagem de ovos e oocistos, e a resposta humoral e celular frente a uma vacinação contra cólera e tifo aviário.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Avicultura de Corte

Os brasileiros consomem em média 45,2 kg de carne de frango *per capita* ao ano, e para suprir essa demanda o Brasil produziu em torno de 15 milhões de toneladas no ano de 2022. Das 15 milhões de toneladas, em torno de 33% foi destinada ao mercado externo, exportando para 145 países, fazendo com que o Brasil ocupe a 1ª posição no mercado mundial de exportações (ABPA, 2023).

O consumo da carne de frango supera o consumo da carne bovina ou suína mundialmente. Tal fato decorre de que essa proteína não possui restrições culturais ou religiosas, como por exemplo a carne suína, que é proibida entre os judeus e muçulmanos, e a carne bovina entre os indianos. Além de tudo isso, a procura pela carne de frango também se dá pelo interesse na ingestão de uma proteína com baixo teor de gordura (Mlaga *et al.*, 2022).

Além disso, o sistema de produção de frangos de corte se torna o mais produtivo do mercado. Décadas de melhorias em genética, manejo e nutrição produziram frangos mais eficientes (Clavijo & Flórez, 2018). Com uma ótima conversão alimentar, os frangos de corte convertem a ração em músculo em um ciclo de produção muito curto, sendo que em menos de 42 dias já estão prontos para serem abatidos e comercializados.

Atualmente, as condições de alojamento das aves são muito favoráveis ao bom funcionamento da produção. Aviários completamente automatizados facilitam o manejo do produtor, como por exemplo a alimentação automática e o controle de temperatura do interior do galpão.

A nutrição dos frangos de corte representa cerca de 60% do custo de produção (Chen *et al.*, 2021), visto que os principais ingredientes da ração são o milho e a soja, os quais são considerados *commodities* e amplamente utilizados mundialmente. Além disso, uma boa formulação da dieta é indispensável para atender as exigências das aves e garantir o bom desempenho do lote (Marx *et al.*, 2023).

O melhoramento genético dos frangos de corte foi outro fator que impulsionou a cadeia produtiva, resultando em melhores características de qualidade de carcaça e desempenho, como melhora na conversão e peso corporal (Marx *et al.*, 2023). Com

isso, o sistema de produção se torna mais eficaz, diminuindo o tempo e até mesmo o custo de produção.

Outro ponto importante para a avicultura de corte é a preocupação dos consumidores sobre a origem e os impactos da produção, que vem crescendo nos últimos anos, estimulando mudanças na indústria da carne (Hötzel & Vandresen, 2022). Alterações na preferência do consumidor são um desafio para a cadeia produtiva, tornando necessário adaptações para atender suas exigências além de se adequar ao mercado externo.

2.2 Problemas sanitários

Atualmente os frangos são considerados um dos mais eficientes conversores de proteína, e apesar dos avanços ao longo dos anos na formulação de dietas e na seleção genética, uma variabilidade entre lotes ainda persiste (Van Limbergen *et al.*, 2020). Uma das maiores preocupações da cadeia produtiva de frangos de corte são os problemas sanitários, que são causados principalmente pela alta densidade de animais e a fácil disseminação de doenças entre os mesmos, que podem ser causadas tanto por vírus quanto por bactérias.

A produção comercial de frangos de corte é um sistema altamente intensivo, com galpões podendo abrigar mais de cem mil aves. Isso destaca a importância crucial e a prioridade em focar intensamente no controle e prevenção de doenças (Landoni & Albarelllos, 2015).

Dentre as doenças que acometem frangos de corte, a salmonela é uma das mais comuns e a principal apreensão persiste na saúde pública, devido a disseminação generalizada dessa bactéria. Outras doenças como a colibacilose causada pela *Escherichia coli*, a coccidiose causada pela *Eimeria* spp, e a cólera aviária ou pasteurelose causada pela *Pasteurella multocida* são algumas das doenças mais comuns que acometem os frangos de corte (Rose *et al.*, 2000; Baksi *et al.*, 2018; Delago *et al.*, 2023; Fries-Craft & Bobeck, 2024).

Os desafios de saúde em frangos de corte têm uma origem complexa, onde a simples presença do patógeno não resulta automaticamente em problemas clínicos, mas sim quando as circunstâncias estão a seu favor (Van Limbergen *et al.*, 2020).

Portanto, a implementação de medidas de prevenção e controle é essencial, visando manter a saúde e a produtividade da produção.

Os problemas sanitários na avicultura de corte não representam um desafio apenas para a saúde das aves, mas também resultam em perdas econômicas para o produtor e para a indústria. Com isso, a necessidade de tratamentos medicamentosos e investimentos na biossegurança aumentam o custo de produção, sendo vantajosa o desenvolvimento de medidas seguras e sustentáveis para amenizar os problemas causados por desafios sanitários.

2.3 Sistema imune

O sistema imune é dividido basicamente em duas partes, imunidade inata (resposta imediata) e adquirida (memória imunológica), que interagem entre si. Durante a evolução, o mecanismo de defesa inato precedeu o sistema imune adquirido. Os heterófilos, células dendríticas, macrófagos e células *natural killer* estão envolvidos na resposta imune inata, que representa a primeira linha de defesa do organismo (Medzhitov & Janeway, 2000; Wlaźlak *et al.*, 2023).

O sistema imunológico das aves também pode ser dividido em órgãos imunológicos primários e em tecido linfóide. Os órgãos primários incluem o timo, que é responsável pela produção e maturação dos linfócitos T, a Bursa de Fabricius, onde ocorre a maturação dos linfócitos B, e a medula óssea, local de produção dos precursores das células sanguíneas. Após a maturação nos órgãos linfóides, os linfócitos T e B entram na corrente sanguínea e se estabelecem nos tecidos linfóides secundários, como o baço e tecidos linfóides associados a mucosa e ao intestino (León-Núñez *et al.*, 2022; Wlaźlak *et al.*, 2023).

As células envolvidas na imunidade inata têm a capacidade de identificar padrões moleculares ligados a patógenos (PAMPs) e em seguida se conectam a receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores Toll (TLRs). A partir daí desencadeia-se uma série de respostas imunes, como a ativação de células, liberação de citocinas, fagocitose e ativação de linfócitos (Soares *et al.*, 2014; Sebők *et al.*, 2021).

Os leucócitos são divididos em cinco categorias de glóbulos brancos no sangue, incluindo linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e heterófilos. Os

linfócitos também fazem parte da imunidade adquirida, onde linfócitos B e T são responsáveis pela produção de anticorpos e citocinas, respectivamente (Minias, 2019).

Apesar de ser bastante eficaz, a imunidade inata pode não ser suficiente para eliminar completamente um patógeno, sendo necessária a imunidade adaptativa. Além de eliminar o patógeno, a resposta adaptativa também proporciona proteção duradoura em caso de exposição repetida ao mesmo agente infeccioso, através da memória imunológica (Erf, 2004).

O sistema imune adaptativo é estruturado em duas categorias distintas de células especializadas: as células B que tem a função de produzir anticorpos, e as células T, divididas em *T-helper* (auxiliar) que auxiliam na ativação de linfócitos B e na produção de citocinas, e T citotóxicos, que tem a função de destruir ativamente os patógenos (Medzhitov & Janeway, 2000; Wlaźlak *et al.*, 2023).

Os anticorpos se ligam a antígenos específicos dos patógenos e os sinalizam para destruição por células como macrófagos, que fagocitam os patógenos e os destroem internamente. E as citocinas desempenham um papel fundamental tanto na imunidade inata quanto na adquirida, assumindo um papel crucial como mediadoras na comunicação entre células (Erf, 2004; Kumar *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário das aves, a fonte de anticorpos maternos se dá através da gema. Diferentemente dos mamíferos que possuem a IgG, as aves possuem a imunoglobulina Y como a mais abundante, mas ambos possuem funcionalidade semelhante. A IgY está presente em aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados, e seu nome deriva da tradução para o inglês da palavra gema, que é “*yolk*”, refletindo a origem da IgY nos ovos desses animais (León-Núñez *et al.*, 2022; Wlaźlak *et al.*, 2023).

A imunidade dos frangos de corte é uma linha de defesa essencial no combate aos desafios, visto que a avicultura de corte frequentemente enfrenta a presença de agentes patogênicos nas granjas. Sendo assim, aprimorar a imunidade dessas aves é essencial para fortalecer a resistência contra patógenos e otimizar a produção avícola.

2.4 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal se refere aos microrganismos presentes no trato digestório, principalmente bactérias, que desempenham funções importantes para a

saúde do animal. A idade, a alimentação, o estresse, o ambiente e o uso de antimicrobianos são alguns dos fatores que afetam a composição microbiana intestinal em frangos de corte (Clavijo & Flórez, 2018; Feye *et al.*, 2020).

A colonização da microbiota intestinal do frango tem início antes (Pedroso *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2019) e logo após a eclosão. Desde o nascimento os pintinhos são expostos aos microrganismos provenientes da superfície das cascas dos ovos, os quais possuem bactérias provenientes do intestino da matriz de corte e do ambiente ao redor (Rinttilä & Apajalahti, 2013; Qin *et al.*, 2018). A colonização da microbiota no trato intestinal dos frangos de corte também é essencial para o amadurecimento do sistema imunológico. Aves criadas em um ambiente livre de microrganismos demonstram menor desenvolvimento imune quando comparadas com aves criadas em um ambiente convencional (Abd El-Hack *et al.*, 2022).

Visto isso, é importante que as aves possuam uma microbiota saudável para favorecer o desenvolvimento e melhorar os índices de produção.

A microbiota utiliza uma série de mecanismos para prevenir e combater doenças em animais, sendo a exclusão por competição uma delas. Esse processo envolve a competição por nutrientes ou pela ocupação física, visando superar as bactérias patogênicas. Além disso, a microbiota intestinal também tem capacidade de regular a síntese de peptídeos antimicrobianos que estão na superfície da mucosa intestinal. Esses peptídeos têm a capacidade de eliminar ou inibir a atividade de microrganismos indesejados de maneira rápida e eficiente (Clavijo & Flórez, 2018; Abd El-Hack *et al.*, 2022).

Os frangos de corte quando nascem possuem pouca diversidade de microrganismos intestinais, devido à falta de contato com a microbiota natural, visto que nascem em incubatórios que são devidamente higienizados e esterilizados a fim de evitar a propagação de doenças. A microbiota reduzida pode afetar o desenvolvimento do intestino do animal, prejudicando seu desenvolvimento (Maiorka *et al.*, 2001).

Além disso, a microbiota é facilmente modificável, e essa flexibilidade de mudança contribui para a inovação em tratamentos, como o uso de probióticos, se tornando uma forma de aprimorar a saúde dos animais e seu desempenho (Qin *et al.*, 2018). A absorção completa de nutrientes é um ponto chave para melhorar a conversão alimentar de frangos de corte, visto que esse é um dos principais parâmetros a serem priorizados na sua produção, assim sendo, uma alternativa para

melhorar a saúde dos frangos é a suplementação com probióticos, visto sua capacidade em modular a composição microbiana intestinal.

2.5 Antibióticos

Os antimicrobianos, como os antibióticos, foram amplamente utilizados como promotores de crescimento e para controlar patógenos intestinais em animais de produção (Haldar *et al.*, 2011). No entanto, devido à preocupação com a saúde da população através do surgimento de bactérias resistentes e a ameaça da eficácia dos tratamentos antimicrobianos na medicina humana, o seu uso indiscriminado passou a ser controlado ou até mesmo proibido.

Após analisar os impactos dos antibióticos como promotores de crescimento no desenvolvimento e na proliferação de bactérias resistentes a medicamentos, as pessoas passaram a se preocupar e reconhecer sua ameaça, resultando em uma pressão para reduzir o uso de agentes antimicrobianos na produção de frangos de corte (Abd El-Hack *et al.*, 2022). A adição de antibióticos na dieta provoca mudanças substanciais no equilíbrio da microbiota intestinal, e considerando a relevância desse microbioma para o desenvolvimento e a resposta imune do animal, destaca-se a importância de proibir seu uso indiscriminadamente (Kairmi *et al.*, 2022).

Em 2006, a União Europeia implementou um regulamento proibindo o uso de antibióticos promotores de crescimento antibióticos para fins de produção e exigindo autorização veterinária para seu uso no controle e tratamento de doenças. Assim, as grandes empresas passaram a adquirir apenas carne de animais criados sem a utilização daqueles antimicrobianos, pressionando os produtores de aves a reduzirem esse sistema na sua produção (Abd El-Hack *et al.*, 2022). Além da União Europeia, os Estados Unidos, a China e diversas nações implementaram restrições ou proibições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação de animais (Long *et al.*, 2019).

Dado que os antibióticos são administrados a todos os frangos do lote na ocorrência de alguma enfermidade pela facilidade na administração através da água, existe o risco de uma administração inadequada em frangos saudáveis, podendo levar ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Landoni & Albarellos, 2015). Apesar disso, a não utilização de antibióticos também se torna um fator de risco, uma vez que a sua ausência pode aumentar a vulnerabilidade das aves frente a infecções

bacterianas. Sendo assim, destaca-se a importância de estratégias para substituir o uso de antibióticos na produção animal, enfatizando a realização de pesquisas para manter a saúde e o bem-estar das aves, como por exemplo o uso de probióticos.

2.6 Probióticos

O uso de probióticos na alimentação de animais vem crescendo nos últimos anos. Diferentes espécies e cepas são estudadas com o propósito de garantir diversos benefícios aos animais, como melhora no desempenho, produção e imunidade. Além disso, uma das principais razões em estudar os probióticos, é a sua capacidade em substituir o uso de antibióticos na produção animal.

Como os probióticos não são definidos por uma genética ou espécie, são caracterizados por serem microrganismos que proporcionam benefícios ao hospedeiro, como a regulação de reações imunológicas e estimulação da atividade enzimática. Além disso, também são capazes de controlar a microbiota do intestino e agir na intervenção da colonização por agentes patogênicos na mucosa, através da diminuição do pH e secreção de proteínas bactericidas, mais conhecidas como bacteriocinas (Boirivant & Strober, 2007).

A utilização de probióticos tem sido bastante estudada. Diversos autores já demonstraram que seu uso pode melhorar o crescimento de alguns órgãos importantes para a digestão de frangos de corte, observando um aumento no tamanho das vilosidades intestinais, o que conseqüentemente melhora a absorção de nutrientes. Além disso, também observaram a modulação da resposta imune e colonização de microrganismos intestinais (Chávez *et al.*, 2016; Shojadoost *et al.*, 2022).

A habilidade das bactérias probióticas em ativar o sistema imunológico é uma razão para apoiar seu uso como parte de um programa para substituição aos antibióticos promotores de crescimento, visando aprimorar a saúde animal e fortalecer a proteção contra agentes infecciosos (Brisbin *et al.*, 2011). As bactérias probióticas funcionam ativando o sistema imunológico inespecífico em animais, através do aumento de células macrófagas, aumentando a capacidade de atividade fagocitária e a produção de anticorpos (Masu *et al.*, 2020).

Diversas variedades de microrganismos já foram estudadas com o efeito probiótico, entre elas se destacam *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*,

Streptococcus, *Pediococcus*, *Enterococcus* e leveduras (Al-Khalaifah, 2018). Dentre as leveduras, a *Saccharomyces* é o principal gênero estudado como probiótico tanto para humanos quanto para animais (Rajput *et al.*, 2013).

2.6.1 *Saccharomyces*

A *Saccharomyces* é o principal gênero entre as leveduras probióticas (Rajput *et al.*, 2013). As leveduras possuem características como a capacidade de combater bactérias patogênicas, estimular o sistema imunológico, demonstram resistência a ambientes ácidos, ação anti-inflamatória, modulação da microbiota intestinal e melhora na estrutura do epitélio intestinal (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2021).

E dentre as leveduras probióticas mais estudadas, se destacam *Saccharomyces boulardii* e a *Saccharomyces cerevisiae*. As duas espécies foram e continuam sendo amplamente estudadas como probióticos em humanos e animais, principalmente para tratar doenças gastrointestinais (Rajput *et al.*, 2013; Banik *et al.*, 2019).

2.6.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma espécie considerada um componente essencial para a civilização humana, através da produção de alimentos fermentados, como pão, cerveja, vinho e destilados. Ela é conhecida pela sua habilidade em ajustar o seu metabolismo para realizar a fermentação de açúcares, independentemente da presença ou ausência de oxigênio, o que resulta na produção de álcool ou gás carbônico (Belda *et al.*, 2019; Parapouli *et al.*, 2020).

Outra relevância atribuída a *S. cerevisiae* é a sua capacidade probiótica. Estudos com frangos de corte demonstraram que a *S. cerevisiae* pode atuar como promotor de crescimento, promovendo uma saúde intestinal boa que resulta em melhorias na atividade enzimática digestiva, produção de carne, digestão de nutrientes e uniformidade do lote. Além disso, também produz diversas substâncias nutritivas, como aminoácidos, vitaminas e enzimas como glucanases, mananases, amilases e proteases (Ahiwe *et al.*, 2021). Sendo assim, demonstra ser um valioso promotor de crescimento para frangos de corte, melhorando seu desempenho.

Além disso, apresenta potencial como alternativa ao uso de antibióticos, incluindo melhorias no crescimento, digestibilidade de nutrientes, melhora na função imunológica, morfologia intestinal e na capacidade antioxidante (He *et al.*, 2021). Dessa forma, a *S. cerevisiae* se destaca através de inúmeros benefícios para a saúde e desempenho dos frangos.

2.6.3 *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii foi isolada pela primeira vez em 1920 na França por Henri Boulard, o qual estava em busca de uma levedura para fermentação do vinho. Durante esse período ocorria um surto de cólera na região, e Henri observou que pessoas que bebiam o chá de lichia não tinham sintomas. Posteriormente foi identificada a presença da levedura *S. boulardii* na fruta, o que fundamentou seu efeito probiótico (Martins, 2008; Souza *et al.*, 2021).

Alguns autores consideram que a *S. boulardii* é uma linhagem da *S. cerevisiae*, visto que estão relacionadas geneticamente (Martins, 2008; Nie *et al.*, 2022). Com outro ponto de vista, alguns autores afirmam que se trata de uma diferente espécie, visto algumas diferenças bioquímicas e moleculares, além das diferentes propriedades probióticas (Fietto *et al.*, 2004; Badr *et al.*, 2021).

S. boulardii é uma levedura probiótica cientificamente comprovada como eficaz no tratamento de doenças gastrointestinais. Os dados atuais indicam que os benefícios dessa levedura parecem ser temporários e não dependem da colonização intestinal do hospedeiro, o diferenciando dos demais probióticos amplamente utilizados (Pais *et al.*, 2020).

S. boulardii também produz compostos inibidores, incluindo as bacteriocinas e estimula a produção de ácidos graxos específicos, que acabam limitando a sobrevivência e o crescimento de bactérias. Além disso, esse probiótico também se liga aos locais de lectina da bactéria *Salmonella* com seu açúcar de manose surfactica, impedindo que as bactérias de *Salmonella* spp. se fixem e se multipliquem no intestino, sendo um fator importante para a indústria avícola visto o risco que essa bactéria traz (Roy & Ray, 2023).

3 Metodologia

3.1 Aspectos éticos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, sob número 9053.

3.2 Local Experimental

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica (LEEZO) Prof. Renato Rodrigues Peixoto, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, localizado no município de Capão do Leão - RS (Figura 1).

Figura 1 – Galpão experimental



Fonte: Arquivo pessoal.

3.3 Produção de leveduras

As cepas de *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (Floratil) e *Saccharomyces cerevisiae* YT001 (Yeastech) foram cultivadas a partir de placas de cultivo do estoque do Laboratório de Microbiologia, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. As leveduras foram inoculadas em meio de cultura YM (*Yeast Malt*), que consiste em 0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona bacteriológica e 1% de glicose. Posteriormente, foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 28 °C em um agitador orbital a 150 rpm.

Primeiramente, uma colônia de levedura foi introduzida em 10mL de meio YM. Em seguida, a cada intervalo de 24 horas, as etapas subsequentes foram conduzidas a fim de aumentar a escala de produção, incluindo inóculos de 100mL, 1L e por fim 7L, todos em um biorreator operando em aeração contínua (Figura 2). Entre cada uma das etapas, a coloração de Gram foi realizada para verificar e assegurar a pureza dos cultivos.

Figura 2 – Produção de leveduras



Fonte: Arquivo pessoal.

Após a conclusão desse processo, os balões contendo 7L de cultura foram submetidos a um período de refrigeração de 72 horas, mantendo-se a uma temperatura aproximada de 4°C. Esse procedimento visava promover a sedimentação da massa celular e a subsequente remoção do sobrenadante. Dessa maneira, obteve-se aproximadamente 1L de cultura com uma concentração de 1×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, determinada por meio de diluição seriada e plaqueamento. Essa cultura foi posteriormente utilizada na produção da ração.

3.4 Animais e tratamentos

Foram alojados 270 pintos de corte com um dia de idade da linhagem comercial *Cobb* e distribuídos em 45 boxes. Em cada boxe foram alojadas seis aves, sendo três fêmeas e três machos (Figura 3).

Figura 3 – Distribuição e alojamento dos animais



Fonte: Arquivo pessoal.

As dietas, à base de milho e farelo de soja, receberam a adição da levedura *on-top* na mistura dos ingredientes, sendo 1 L 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. A composição nutricional das dietas é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas

Ingredientes	Inicial	Crescimento
Milho (kg)	55,080	59,900
Farelo de soja (kg)	40,920	36,443
Núcleo		
L-lisina (kg)	0,154	0,169
DL-metionina (kg)	0,322	0,253
L-treonina (kg)	0,085	0,065
Glicina (kg)	0,950	0,871
Serina (kg)	1,179	1,082
Cálcio (kg)	1,095	1,038
Sódio (kg)	0,210	0,174
Fitase (g)	0,005	0,005
Total	100,00	100,00
Perfil nutricional		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2808,024	2856,784
Matéria seca (%)	87,839	87,722
Proteína bruta (%)	23,061	21,214
Fibra bruta (%)	3,6480	3,9830
Extrato etéreo (%)	2,2940	2,3860
Lisina (%)	1,2500	1,1500
Treonina (%)	0,8429	0,7587
Fósforo total (%)	0,7660	0,5810
Metionina (%)	0,6368	0,5482

Para a dieta Inicial (1 - 21 dias) o Núcleo Vitaminico Mineral Aminoácido para frangos de corte utilizado foi o Mig Frango Inicial 4% com os níveis de garantia mínimos por kg do produto a seguir: Ácido Fólico (min) 18 mg, Ácido Pantotênico (min) 230 mg, Biotina (min) 2,2 mg, Cálcio (min – max) 190 – 230 g, Cobalto (min) 4,8 mg, Cobre (min) 370 mg, Colina (min) 9800 mg, Ferro (min) 1500 mg, Fitase 12500 FTU, Flavomicina 50 mg, Fósforo (min) 50 g, Iodo (min) 44 mg, Lisina (min) 26 g, Manganês (min) 1600 mg, Metionina (min) 70 g, Niacina (min) 970 mg, Salinomicina 1500 mg, Selênio (min) 6,2 mg,

Sódio (min) 42 g, Treonina (min) 18 g, Vit A (min) 240000 UI, Vit B1 (min) 44 mg, Vit B12 (min) 500 mcg, Vit B2 (min) 136 mg, Vit B6 (min) 60 mg, Vit D3 (min) 50000 UI, Vit E (min) 620 UI, Vit K3 (min) 48 mg, Zinco (min) 2200 mg). Para a dieta Crescimento (22 - 42 dias), foi utilizado o Núcleo Vitamínico Mineral Aminoácido para frangos de corte Mig Frango Crescimento 4% com os níveis de garantia mínimos por kg do produto a seguir: Ácido Fólico (min) 18 mg, Ácido Pantotênico (min) 230 mg, Biotina (min) 2,2 mg, Cálcio (min – max) 100 - 170 g, Cobalto (min) 4,8 mg, Cobre (min) 370 mg, Colina (min) 7300 mg, Ferro (min) 1500 mg, Fitase 12500 FTU, Flavomicina 50 mg, Fósforo (min) 16 g, Iodo (min) 42 mg, Lisina (min) 30 g, Manganês (min) 1800 g, Metionina (min) 58 g, Monensina 2500 mg, Niacina (min) 970 mg, Selênio (min) 6,2 mg, Sódio (min) 32 g, Treonina (min) 14 mg, Vit A (min) 241500 UI, Vit B1 (min) 44 mg, Vit B12 (min) 500 mcg, Vit B2 (min) 138 mg, Vit B6 (min) 60 mg, Vit D3 (min) 50000 UI, Vit E (min) 620 UI, Vit K3 (min) 50 mg, Zinco (min) 2340 mg.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os animais foram vacinados com uma vacina comercial contra cólera e tifo aviário (*Pasteurella multocida* e *Salmonella gallinarum*, Labovet®), nos dias 15 e 36 do experimento. Aos 42 dias de idade, todos os animais foram eutanasiados para a realização das análises.

3.5 Variáveis analisadas

3.5.1 Resposta humoral

Para avaliar a imunidade humoral e o potencial probiótico na modulação da resposta imune vacinal, duas aves de cada boxe foram vacinadas com uma vacina comercial (Vacina contra a cólera e tifo aviário, Labovet®). Sendo assim, os animais foram distribuídos da seguinte forma: T1 – animais vacinados e não suplementados; T2 – animais vacinados e suplementados com *Saccharomyces boulardii*; T3 – animais vacinados e suplementados com *Saccharomyces cerevisiae*; T4 – animais não vacinados e não suplementados.

As amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia ulnar nos dias 0 e 21 após a primeira dose da vacina. Para avaliar os níveis de anticorpos IgY total dos frangos de corte foi realizado um ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando os soros individuais do 36º dia do experimento.

Para isso, placas de 96 cavidades (CRAL®, Brasil) foram sensibilizadas com a vacina comercial diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,1M, pH=9,8), 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 tampão salino fosfatado (PBS, phosphate-buffered saline). Por fim, foi adicionado 100µL de solução de revelação (10mL de

tampão fosfato citrato (0,2M e 0,1M), 0,004g de Ortho-Phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich) e 15µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As placas foram incubadas por 15 min no escuro em temperatura ambiente, e posteriormente para interromper a reação foram adicionados 50µL por cavidade de H₂O₂ 3%. Entre cada etapa as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo Tween20 a 0,05% (PBS-T). As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK) com filtro de 492 nm.

3.5.2 Resposta celular

Para avaliar a resposta celular, foram coletados cinco baços por grupo para obtenção dos esplenócitos, sendo que os grupos foram divididos da seguinte forma: A – grupo vacinado sem levedura; B – grupo controle sem levedura; C – grupo vacinado e suplementado com *Saccharomyces boulardii*; D – grupo controle e suplementado com *Saccharomyces boulardii*; E – grupo vacinado e suplementado com *Saccharomyces cerevisiae*; F – grupo controle e suplementado com *Saccharomyces cerevisiae*.

Para avaliar a resposta celular os baços dos frangos foram coletados e macerados para o isolamento e cultivo de esplenócitos. As células foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Gibco®) contendo 10% de soro fetal bovino em placas de cultura de 24 poços (Kasvi®) e incubadas por 24 horas a 37°C. Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram estimuladas com concanavalina A (ConcA, 10 µg, Sigma-Aldrich) e a vacina comercial (10 µL), posteriormente foram coletadas no reagente TRIzol® (Sigma-Aldrich). A extração de RNA dos esplenócitos foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. A reação para a síntese de cDNA foi realizada utilizando 400ng de RNA. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi conduzida em um sistema de PCR em tempo real para analisar a expressão relativa dos genes de citocinas Interferon gama (*IFN* γ), Interleucina 2 (*IL2*), Interleucina 17A (*IL17A*), Interleucina 12 (*IL12*) e Interleucina 22 (*IL22*) (Tabela 2). O gene β -actina foi usado como controle endógeno. As expressões relativas foram calculadas comparando os valores de Ciclo de *threshold* (Ct) de β -actina e genes alvo com os grupos não suplementados, de acordo com o método descrito por Livak & Schmittgen, (2001):

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \underbrace{(Ct_{Target} - Ct_{Housekeeping})}_{Estímulo} - \underbrace{(Ct_{Target} - Ct_{Housekeeping})}_{Meio}$$

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados na reação de qPCR para células

PRIMER	Sequência (5'-3')
<i>β-actina Forward</i>	CCTGAACCTCTCATTGCCA
<i>β-actina Reverse</i>	GAGAAATTGTGCGTGACATCA
<i>IFNγ Forward</i>	ATGTAGCTGACGGTGGACCT
<i>IFNγ Reverse</i>	ACGCCATCAGGAAGGTTGTT
<i>IL2 Forward</i>	ATCTTTGGCTGTATTTTCGGTAG
<i>IL2 Reverse</i>	CTGGGTCTCAGTTGGTGTGTAG
<i>IL17A Forward</i>	CTCCTCTGTTTCAGACCACTGC
<i>IL17A Reverse</i>	ATCCAGCATCTGCTTTCTTGA
<i>IL12 Forward</i>	AGATGCTGGCAACTACACCTG
<i>IL12 Reverse</i>	CATTTGCCCATTTGGAGTCTAC
<i>IL22 Forward</i>	GGTTGTCTTCTGCTGTTGTTGCTG
<i>IL22 Reverse</i>	GCCAAGGTGTAGGTGCGATTC

Sequência dos *primers* utilizados na reação de qPCR para células de frangos de corte.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.3 Contagem diferencial de leucócitos

Para realizar a contagem diferencial leucocitária preparou-se um esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro com amostras de sangue coletadas nos dias 21 e 42 do experimento. Após o esfregaço, as lâminas foram fixadas com álcool metílico

durante cinco minutos e depois corado com hematoxilina e eosina. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e secadas ao ar livre.

Para realizar a contagem, os esfregaços foram observados com microscópio ótico com objetiva de imersão (100x), seguindo um padrão de observação em zigue-zague. A contagem completa de células sanguíneas foi realizada com base em 100 células por esfregaço, calculando a proporção de cada tipo. A contagem leucocitária foi classificatória para heterófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos.

A relação heterófilos/linfócitos foi determinada de acordo com Gross & Siegel (1983).

3.5.4 Citometria de fluxo

Para adquirir uma compreensão do efeito probiótico dos tratamentos a nível celular, foram realizadas medições de diversos biomarcadores nos eritrócitos dos frangos. Para isso, amostras de sangue foram coletadas das aves dos dias 21 e 42 do experimento e o sangue diluído em 500 μL de soro fetal bovino foi utilizado para realização da análise citométrica de fluxo.

Para detectar a população de células, foi utilizado o citômetro de fluxo com foco acústico Attune[®] (*Applied Biosystems*). A eliminação de resíduos celulares e outras variedades celulares nos eritrócitos foi baseada em gráficos de dispersão direta e dispersão lateral, e foram eliminados pela coloração negativa das células com Hoechst 33.342 na concentração de 16,2 μL (Martinez-Alborcia *et al.*, 2012). As células coradas com fluoróforo foram introduzidas em uma solução salina tamponada, isenta de cálcio e magnésio (contendo 80g/L⁻¹ de NaCl, 11,5g/L⁻¹ de KCl, 24g/L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 2g/L⁻¹ de KH₂PO₄ dissolvidos em água deionizada). Um total de 20.000 eritrócitos foram contabilizados em cada análise.

Os eritrócitos foram avaliados quanto a peroxidação lipídica (LPO), fluidez da membrana, espécies reativas do oxigênio (ROS), potencial de membrana mitocondrial, índice de fragmentação de DNA e integridade da membrana celular.

Para a avaliação da fluidez da membrana, 2,7 μM de corante hidrofóbico merocianina 540 e 0,1 μM de YO PRO-1 (Invitrogen-Eugene, OR, EUA) foram adicionados a 10 μL de amostra e incubados por 10 minutos. A intensidade de fluidez foi avaliada pela mediana da intensidade da fluorescência emitida, exclusivamente

para células intactas (YO PRO-1 negativo). A análise de dados e o preparo da amostra foram feitas de acordo com (Martins *et al.*, 2022).

Para avaliar a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), 10µL de sangue diluído (SFB) foram adicionados a 20µL de solução salina com corante fluorescente diacetato 2',7'-diclorofluoresceína e iodeto propídio (PI) (Sigma-Aldrich Co., EUA) que emite fluorescência verde para células viáveis. As amostras foram examinadas após um período de incubação de 60 minutos a 22°C no escuro, apenas células vivas (aquelas que não apresentaram fluorescência (vermelha) positiva para PI) foram avaliadas quanto à geração de espécies reativas de oxigênio, com base na mediana da intensidade da fluorescência verde liberada.

A peroxidação lipídica dos eritrócitos (LPO) foi analisada com concentração final de 1µM do sensor de peroxidação lipídica Bodipy C11 (Invitrogen) em 100µL de amostra Hagedorn *et al.* (2012). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente (20°C) por um período de 2 horas, e a taxa de lipoperoxidação foi determinada a partir da relação entre a mediana da intensidade de fluorescência verde (representando lipídios peroxidados) e a soma da mediana da intensidade de fluorescência verde com a mediana da intensidade de fluorescência vermelha (indicativa de lipídios não peroxidados) multiplicados por 100.

Para avaliar o índice de fragmentação do DNA (DFI), 10µL de amostra de sangue diluído (SFB) foram adicionados a 5µL de TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15M EDTA, em pH 7,2), após 30 segundos foi adicionado 10µL de Triton 1x (Triton X-100, 1%). Em seguida, foi adicionado 2mg/mL⁻¹ corante laranja acridina (Sigma-Aldrich, EUA) e incubados em temperatura ambiente (22°C) por 30 segundos e não ultrapassando 2 minutos antes de cada leitura. Os eritrócitos foram classificados em DNA inteiro (fluorescência verde) ou DNA fragmentado (fluorescência vermelha). A fragmentação do DNA foi determinada ao calcular a mediana da intensidade de fluorescência vermelha dividida pela mediana da intensidade de fluorescência verde.

Para avaliar a integridade da membrana celular, as amostras foram incubadas por 5 minutos com fluoróforo Sybr14 a 0,25µM e 7,5µM de iodeto propídio. As células foram classificadas como danificadas (com membrana rompida) ou como não danificadas (com membrana intacta). A determinação da integridade celular baseou-se na proporção entre o número de células com membrana intacta e a soma das células com membrana intacta e das células com membrana danificada, multiplicadas por 100.

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado 10µL de sangue diluído adicionado de 3,1µM de corante Rodamina 123 (fluorescência verde) e 7,5µM de iodeto propídio e incubado por 10 minutos em uma temperatura de 20°C. As células acumulando fluorescência verde foram classificadas como alta funcionalidade mitocondrial (alta fluorescência) ou baixa funcionalidade mitocondrial (baixa fluorescência). A taxa de potencial de membrana mitocondrial foi determinada pelo número de células com alta fluorescência dividido pelo número de células com alta mais baixa fluorescência, multiplicados por 100.

3.5.5 Microbioma

Para realização do microbioma, amostras de fezes de cada box foram coletadas ao final do experimento e transformadas em *pool*, divididas nos seguintes tratamentos: T1 – controle; T2 – *Saccharomyces boulardii*; T3 – *Saccharomyces cerevisiae*.

A coleta de amostra das fezes foi realizada com *swab* e introduzido em um microtubo contendo a solução NeoSample-X, de acordo com os protocolos do fabricante. Posteriormente foram enviadas para a empresa Neopropecta para a realização do microbioma.

O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando amplicons do marcador 16S. A preparação das bibliotecas para o sequenciamento de amplicons de bactérias foi conduzido empregando oligonucleotídeos 341F e 806R, os quais são direcionados especificamente para a região V3/V4 do gene 16S rRNA, seguindo um procedimento de PCR em duas etapas (Wang & Qian, 2009; Caporaso *et al.*, 2012). Os *primers* utilizados na primeira etapa da PCR, além de conterem uma sequência específica para a região V3/V4, também incluem uma região relacionada a um adaptador parcial Illumina, com base na estrutura TruSeq (Illumina, EUA). A existência desse adaptador viabiliza uma segunda etapa de PCR, durante a qual são incorporadas as sequências de indexação, seguindo os procedimentos previamente delineados (Caporaso *et al.*, 2011). A indexação é executada por meio de índices duplos distintos para cada amostra durante a segunda PCR. Na primeira reação de PCR foram utilizados dois microlitros de DNA extraído de cada amostra como molde.

As amplificações por PCR foram conduzidas utilizando a enzima Platinum Taq (Invitrogen, EUA), seguindo as seguintes condições: uma etapa inicial de

desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 2 minutos para a PCR 1. Para a PCR 2, as condições foram uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida por 10 ciclos com desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 66 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 2 minutos.

As reações de PCR foram conduzidas em triplicata. Posteriormente, as reações finais passaram por um processo de purificação utilizando Neobeads® (Beads magnéticas a base de Sera-Mag™), e um volume equivalente de cada amostra foi incorporado ao pool destinado ao sequenciamento. Em cada ciclo de PCR, um controle negativo de reação foi incorporado, assim como um controle negativo de extração foi incluído para cada ordem de recebimento. A concentração final de DNA no pool de bibliotecas foi estimado por meio de ensaio com Picogreen dsDNA (Invitrogen, EUA), sendo posteriormente diluída para a quantificação através de qPCR, utilizando o Kit de Quantificação de Biblioteca Colibri™ (Invitrogen, EUA), otimizado para bibliotecas Illumina. O pool destinado ao sequenciamento foi ajustado para atingir uma concentração final de 11pM (para kits V2) ou 17,5pM (para kits V3) e foi submetido à sequenciação no sistema MiSeq (Illumina, EUA). Os *primers* de sequenciamento Illumina, fornecidos no kit do fabricante foram utilizados. As corridas paired-end foram conduzidas empregando kits de sequenciamento V2x500 ou V3x600 (Illumina, EUA), proporcionando uma cobertura por amostra de 10 mil, 50 mil ou 100 mil reads.

3.5.4 Contagem de oocistos

A contagem de ovos e de oocistos foi realizada através da técnica de OPG (contagem de ovos por grama de fezes). As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Uma amostra de fezes de cada boxe foi coletada aos 42 dias do experimento, totalizando 45 amostras, sendo 15 amostras para tratamento controle, 15 amostras para tratamento com *Saccharomyces boulardii* e 15 amostras para tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a realização da técnica, duas gramas de cada amostra foram pesadas, maceradas e diluídas em 58mL de solução supersaturada de açúcar. Posteriormente

foram peneiradas e permaneceram em decantação. Após 10 minutos, foi utilizada uma pipeta de *Pasteur* para coleta do material e adicionado a câmara de *McMaster* (Figura 4), para posterior leitura sob microscópio ótico.

Figura 4 – Técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG)



Fonte: Arquivo pessoal.

Para avaliar a eficácia dos tratamentos, foi utilizada a seguinte equação:

$$E (\%) = 100 \times \frac{(\text{número de ovos/oocistos no tratamento controle} - \text{número de ovos/oocistos no grupo suplementado})}{\text{número de ovos/oocistos no tratamento controle}}$$

3.6 Análise Estatística

Para a avaliação da resposta imune humoral, a análise estatística foi realizada 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 duas vias), diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey.

Para a avaliação da resposta imune celular a análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism® 8.0.1. As diferenças entre os níveis de transcrição de citocinas dos grupos foram analisadas pelo teste de Tukey.

Para a avaliação da citometria de fluxo e para a contagem diferencial de leucócitos os dados das variáveis respostas foram analisados para os efeitos principais das leveduras e vacinação, e também para a interação levedura x vacinação. O seguinte modelo foi utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijk} = resposta medida, μ = média geral, α_i = efeito da levedura, β_j = efeito da vacinação, $\alpha\beta_{ij}$ = interação entre levedura e vacinação e ε_{ijkl} = erro residual. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey para a comparação das médias dos tratamentos ($P < 0,05$) utilizando o *software* estatístico R (R CORE TEAM, 2023).

Para a avaliação do microbioma, os dados brutos foram processados e analisados em linguagem R ([//www.R-project.org/](http://www.R-project.org/)). As leituras foram filtradas no pacote dada2 (Callahan *et al.*, 2015) com os parâmetros trimLeft = c (18,25), truncLen= c (295, 200), maxN=0, maxEE=6 e truncQ=2. O banco de dados Silva SSU 138 foi utilizado para atribuição da taxonomia da tabela de ASVs (Quast *et al.*, 2012). A visualização gráfica dos dados processados foi realizada em pacote Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) e a normalização dos dados foi realizada por razão logarítmica centrada (clr) no pacote Microbiome (Lahti & Shetty 2018). Para avaliar os táxons que demonstram significância estatística, foi definido o teste não paramétrico de Wilcoxon para comparar as amostras. Para isso foi utilizado o pacote ggpubr (Kassambara, 2020) com a função “stat_compare_means”. A visualização dos gráficos com os resultados foi realizada utilizando o pacote ggplot2 (Villanueva & Chen, 2019).

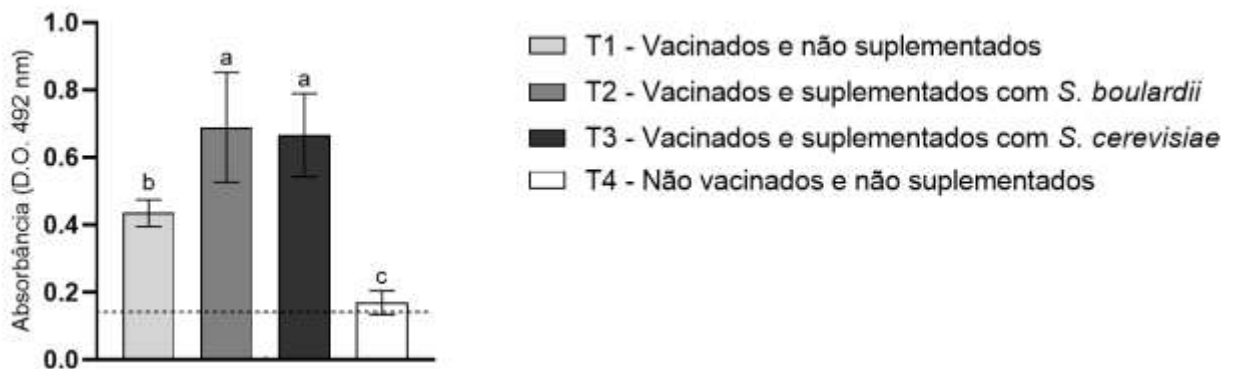
Para avaliar a média da contagem de ovos e oocistos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4 Resultados e Discussão

4.1 Resposta humoral

A suplementação com os probióticos acentuou a resposta à vacina contra a cólera e o tifo aviário nos frangos de corte (Figura 5). Os grupos suplementados (T2 e T3) apresentaram maiores níveis de anticorpos quando comparados ao grupo não suplementado ($p < 0,05$). O grupo vacinado e não suplementado apresentou nível de anticorpos de aproximadamente 0,4 (Absorbância D.O. 492nm), significativamente inferior aos grupos suplementados com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentaram D.O. de aproximadamente 0,7. Os grupos suplementados com *S. boulardii* e *S. cerevisiae* não diferiram estatisticamente entre si.

Figura 5 – IgY total específica contra a vacina comercial de cólera e tifo aviário



Os dados representam a média das absorbâncias (+/- erro padrão) obtidos por ELISA indireto de IgY em frangos de corte dos grupos suplementados com *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* e controles vacinados ou não contra cólera e tifo aviário. O *cut-off* foi determinado na média dos valores obtidos no dia 0 mais 2 vezes o desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses resultados corroboram com Nari et al. (2020) os quais observaram um aumento no nível de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa em frangos de corte utilizando *S. boulardii* como suplementação. O mesmo foi encontrado por Roy & Ray (2023), que constataram um aumento no nível de anticorpos aos 35 dias em frangos de corte vacinados contra o vírus da bronquite infecciosa (IBV) e contra *Newcastle*.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Haldar et al. (2011), os quais utilizaram *S. cerevisiae* como suplementação para frangos de corte vacinados contra a doença de *Newcastle* e observaram uma melhora na resposta humoral durante todo período experimental. Concordando com os resultados encontrados no presente estudo, é possível afirmar a eficácia da suplementação probiótica na modulação da resposta imune humoral.

Os elementos que compõem a estrutura das paredes celulares de leveduras consistem em β -glucanos, que são polímeros de glicose e apresentam ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,6 e mananoligossacarídeos (Gurbuz et al., 2011). Essas ligações β -1,3 e β -1,6-glucanos são consideradas agentes imunomoduladores em animais, e os mananoligossacarídeos desempenham um papel no aprimoramento da resposta imune, estimulando o aumento da produção de imunoglobulinas (Cotter et al., 2002; Griggs & Jacob, 2005).

As β -1,3 e β -1,6-glucanos presentes na parede das leveduras também atuam como PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos), que se ligam aos PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão) e desencadeiam a ativação das células do sistema imunológico, resultando na produção de uma série de mediadores imunológicos, promovendo a melhoria do sistema e aumentando a produção de anticorpos (Ding et al., 2019). Além disso, a suplementação com levedura pode ser eficaz na redução dos níveis de corticosterona circulante e na prevenção da depressão do sistema imunológico, fundamental durante a fase final da vida, quando a produção de anticorpos tende a diminuir (Haldar et al., 2011).

Estudos também demonstraram que a administração de *S. boulardii* promoveu um impacto benéfico nas quantidades de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato, que são reconhecidos por suas propriedades de modulação do sistema imunológico. A modulação ocorre através de propriedades anti-inflamatórias, regulação de células T e B, produção de citocinas e maturação de células dendríticas (Sen & Mansell, 2020).

Outro aspecto evidenciado de *S. boulardii* na modulação imunológica é a capacidade de ativar o sistema complemento através do aumento de C3, C5 e C3d, que são proteínas que formam uma cascata de reações que desempenham funções essenciais na proteção do organismo contra agentes patogênicos, desde a destruição de microrganismos até a opsonização de partículas para fagocitose

(Machado Caetano *et al.*, 1986). Assim sendo, garante que os invasores sejam neutralizados, contribuindo para a manutenção da saúde.

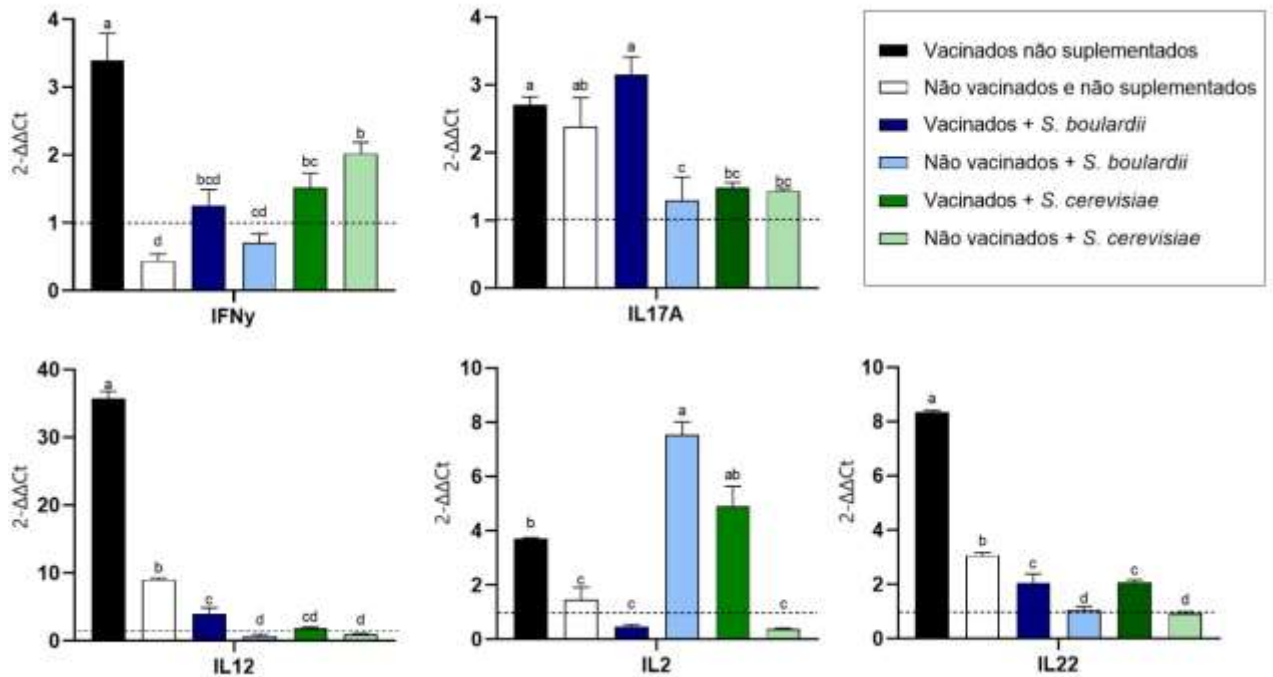
Visto isso, é possível sugerir que a suplementação com *S. boulardii* e *S. cerevisiae* foi capaz de modular o sistema imune, aprimorando as respostas e garantindo uma defesa imunológica saudável aos frangos de corte. A otimização da resposta à vacina, evidenciada pelo aumento no nível de anticorpos destaca o potencial benefício dessa abordagem para a promoção da saúde dos animais.

4.2 Resposta celular

A transcrição relativa das citocinas *IFN γ* , *IL17A*, *IL12*, *IL2* e *IL22* foi analisada através de qPCR (Figura 6). O grupo suplementado com *Saccharomyces boulardii* mas não vacinado, quando estimulados por 6 h com a vacina comercial, apresentou níveis de *IL2* significativamente mais elevados que os grupos não suplementados ($p=0,001$). Já o grupo vacinado e não suplementado apresentou níveis de *IFN γ* , *IL12* e *IL22* mais elevados em comparação com os grupos que foram suplementados durante o experimento.

Pode-se sugerir que a queda na expressão dessas citocinas se deve ao período inicial de estímulo. Durante o início da exposição ao estímulo, é comum que as citocinas sejam expressas em níveis elevados, e no momento da coleta é possível que elas tenham diminuído devido à transição para uma fase posterior da resposta inflamatória. Portanto, pode-se sugerir que as expressões dessas citocinas possam ter diminuído até o momento da coleta, uma vez que sua expressão pode ter atingido o pico durante a fase inicial de estímulo.

Figura 6 – Transcrição relativa das citocinas *IFN γ* , *IL17A*, *IL12*, *IL2* e *IL22* em esplenócitos de frangos de corte



Transcrição relativa das citocinas *IFN γ* , *IL17A*, *IL12*, *IL2* e *IL22* em esplenócitos de frangos de corte suplementados ou não com *S. boulardii* e *S. cerevisiae* e vacinados ou não com uma vacina comercial contra cólera e tifo aviário. As células foram estimuladas *in vitro* com o antígeno vacinal. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

IL2, *IL12* e *IFN γ* são citocinas pró-inflamatórias e são liberadas pelas células Th1, que exercem uma função crucial na modulação da resposta imunológica mediada por células. Essas citocinas têm funções como a proliferação de células B e ativação de células *natural killer*. Já as citocinas *IL22* e *IL17A* são liberadas pelas células Th17, também envolvidas nas respostas pró-inflamatórias e responsáveis pela resposta imunológica contra patógenos extracelulares, como as bactérias (Zhang & An, 2007; Yu *et al.*, 2021).

Ao analisar os gráficos, é possível visualizar que o grupo não vacinado e suplementado com *S. boulardii* apresentou níveis de *IL2* significativamente mais elevados que os grupos não suplementados. A *IL2* é uma citocina sinalizadora essencial, que desempenha papel fundamental na resposta do organismo a infecções microbianas, promovendo a síntese de imunoglobulinas pelas células B (Kumar *et al.*, 2011). Dessa forma, a *IL2* se destaca como um componente essencial na defesa do organismo contra patógenos.

Apesar do aumento da *IL2* no grupo suplementado com *S. boulardii*, ao analisar os gráficos é possível observar um aumento das demais citocinas nos grupos que não receberam a suplementação com os probióticos. Munyaka et al. (2012) ao suplementar frangos de corte com um carboidrato derivado de levedura observaram uma diminuição na resposta inflamatória Th1 e Th2.

Alizadeh et al. (2016) também estudaram o uso de derivado de levedura como suplementação em frangos de corte e observaram que as citocinas foram reguladas negativamente, sugerindo que esses produtos não têm efeito em situações de saúde normais. Corroborando com esse estudo, Ng et al. (2009) observaram que probióticos podem regular negativamente a resposta Th1 e inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. O mesmo foi encontrado por Lin et al. (2023) que ao utilizarem um hidrolisado de *S. cerevisiae* observaram que este poderia exercer um papel anti-inflamatório ao inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

De forma distinta, Rajput et al. (2013) observaram um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias na mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com *S. boulardii*. Sun et al. (2017) também observaram que a suplementação com *S. boulardii* induziu a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em frangos de corte.

Por outra perspectiva, Huff et al. (2006) administraram β -1,3 e β -1,6-glucanos provenientes de *S. cerevisiae* e observaram uma estimulação na resposta inflamatória de frangos de corte, porém, devido à falta de um ambiente desafiante essa resposta inflamatória pode diminuir valores de produção, visto que a energia é usada para uma resposta imune desnecessária, e não para o crescimento. Portanto, sugeriram que a suplementação seja realizada para estimular a imunidade imediatamente antes de agentes estressores ambientais previsíveis e da exposição a doenças, ao invés de um tratamento contínuo, a fim de evitar o desperdício de energia.

Acredita-se que suplementação com probióticos pode vir a ser eficaz em condições de saúde desfavoráveis. Além disso, através desse estudo também se sugere que os probióticos regulam a resposta através da homeostase imunológica, regulando as citocinas sem manifestar efeitos intensificados em ambas as direções. Para otimizar a avaliação das respostas ao tratamento, através do presente estudo, sugere-se realizar a análise logo após a administração da vacina, ao invés de

aguardar até o final do experimento, a fim de capturar e avaliar prontamente as respostas imediatas ao tratamento.

4.3 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos e a relação heterófilo/linfócito não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos aos 21 dias do experimento (Tabela 3).

Tabela 3 – Contagem diferencial de leucócitos aos 21 dias (Médias \pm Erro Padrão)

	LIN	HET	EOS	BAS	MON	H/L
Probiótico						
Controle	67,80 \pm 1,85	29,78 \pm 1,82	0,31 \pm 0,09	0,26 \pm 0,08	2,10 \pm 0,3	0,47 \pm 0,04
<i>S. boulardii</i>	69,20 \pm 1,85	28,90 \pm 1,82	0,45 \pm 0,09	0,18 \pm 0,08	1,20 \pm 0,3	0,47 \pm 0,04
<i>S. cerevisiae</i>	69,20 \pm 1,85	28,60 \pm 1,82	0,48 \pm 0,09	0,31 \pm 0,08	1,46 \pm 0,3	0,45 \pm 0,04
Vacina						
Não vacinados	69,40 \pm 1,85	28,48 \pm 1,70	0,40 \pm 0,09	0,29 \pm 0,07	1,49 \pm 0,28	0,46 \pm 0,04
Vacinados	68,00 \pm 1,20	29,70 \pm 1,20	0,43 \pm 0,06	0,22 \pm 0,05	1,59 \pm 0,20	0,47 \pm 0,02
Interação						
T1 (con+vac)	68,70 \pm 2,10	28,60 \pm 2,11	0,36 \pm 0,11	0,33 \pm 0,09	2,03 \pm 0,35	0,44 \pm 0,04
T3 (bou+vac)	67,80 \pm 2,10	30,40 \pm 2,11	0,50 \pm 0,11	0,10 \pm 0,09	1,26 \pm 0,35	0,48 \pm 0,04
T5 (cer+vac)	67,60 \pm 2,10	30,20 \pm 2,11	0,43 \pm 0,11	0,23 \pm 0,09	1,46 \pm 0,35	0,48 \pm 0,04
T2 (con+sem)	66,96 \pm 3,00	30,60 \pm 2,90	0,26 \pm 0,16	0,20 \pm 0,13	2,06 \pm 0,49	0,50 \pm 0,07
T4 (bou+sem)	70,76 \pm 3,00	27,50 \pm 2,90	0,40 \pm 0,16	0,26 \pm 0,13	1,13 \pm 0,49	0,46 \pm 0,07
T6 (cer+sem)	70,80 \pm 3,00	27,00 \pm 2,90	0,53 \pm 0,16	0,40 \pm 0,13	1,26 \pm 0,49	0,41 \pm 0,07
Probabilidade						
Probiótico	0,82	0,93	0,45	0,52	0,11	0,90
Vacina	0,51	0,52	0,77	0,48	0,77	0,78
Interação	0,56	0,52	0,71	0,34	0,96	0,55

Médias (%) seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$). LIN= Linfócitos; HET= Heterófilos; EOS= Eosinófilos; BAS= basófilos; MON= Monócitos; H/L= Relação heterófilos/linfócitos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados encontrados estão de acordo com os obtidos por Cardoso et al. (2003) e Borsa (2009), mostrando que os valores hematológicos verificados refletem valores de referência em frangos de corte da linhagem *Cobb*, indicando conformidade e normalidade. Além disso, os resultados corroboram com os encontrados por Al-Dabbagh & Shareef (2009), em que a suplementação com *S. cerevisiae* não

influenciou a contagem de leucócitos aos 21 dias de idade em frangos de corte em comparação com o tratamento controle.

Já aos 42 dias, diferenças significativas entre os tratamentos são observadas na contagem de linfócitos, heterófilos, basófilos, monócitos e na relação heterófilos/linfócitos (Tabela 4), no efeito para probiótico. Já o efeito vacina não apresentou diferenças entre as variáveis.

Tabela 4 – Contagem diferencial de leucócitos aos 42 dias (Médias \pm Erro Padrão)

	LIN	HET	EOS	BAS	MON	H/L
Probiótico						
Controle	62,39 \pm 1,5B	35,8 \pm 1,4A	0,53 \pm 0,08	0,23 \pm 0,04A	1,12 \pm 0,17A	0,61 \pm 0,03A
<i>S. boulardii</i>	69,90 \pm 1,5A	29,1 \pm 1,4B	0,48 \pm 0,08	0,11 \pm 0,04AB	0,36 \pm 0,17B	0,44 \pm 0,03B
<i>S. cerevisiae</i>	67,5 \pm 1,5AB	31,6 \pm 1,4AB	0,28 \pm 0,08	0,03 \pm 0,04B	0,63 \pm 0,17AB	0,49 \pm 0,03AB
Vacina						
Não vacinados	66,7 \pm 1,40	31,9 \pm 1,40	0,52 \pm 0,08	0,16 \pm 0,04	0,67 \pm 0,16	0,50 \pm 0,03
Vacinados	66,3 \pm 1,00	32,5 \pm 0,90	0,34 \pm 0,05	0,08 \pm 0,03	0,74 \pm 0,10	0,52 \pm 0,02
Interação						
T1 (con+vac)	61,6 \pm 1,76B	36,9 \pm 1,7A	0,43 \pm 0,10	0,03 \pm 0,05B	0,96 \pm 0,19	0,64 \pm 0,04A
T3 (bou+vac)	69,9 \pm 1,76A	29,1 \pm 1,7B	0,30 \pm 0,1B	0,16 \pm 0,05	0,46 \pm 0,19	0,49 \pm 0,04B
T5 (cer+vac)	67,5 \pm 1,76AB	31,3 \pm 1,7AB	0,30 \pm 0,10	0,06 \pm 0,05	0,80 \pm 0,19	0,43 \pm 0,04B
T2 (con+sem)	62,90 \pm 2,50	34,7 \pm 2,40	0,64 \pm 0,14	0,42 \pm 0,07A	1,28 \pm 0,28A	0,58 \pm 0,04
T4 (bou+sem)	69,80 \pm 2,50	29,1 \pm 2,40	0,66 \pm 0,14A	0,06 \pm 0,07	0,26 \pm 0,28B	0,44 \pm 0,04
T6 (cer+sem)	67,40 \pm 2,50	31,8 \pm 2,40	0,26 \pm 0,14	0,00 \pm 0,07	0,46 \pm 0,28AB	0,49 \pm 0,04
Probabilidade						
Probiótico	0,002	0,007	0,10	0,01	0,009	0,003
Vacina	0,84	0,75	0,07	0,16	0,72	0,63
Interação	0,94	0,79	0,27	<0,001	0,384	0,78

Médias (%) seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$). LIN= Linfócitos; HET= Heterófilos; EOS= Eosinófilos; BAS= basófilos; MON= Monócitos; H/L= Relação heterófilos/linfócitos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao observar a porcentagem de linfócitos, pode-se verificar um aumento no tratamento que recebeu suplementação com *S. boulardii* ($p=0,002$) em comparação com o grupo controle, apesar disso o grupo que recebeu *S. cerevisiae* não diferiu dos demais tratamentos, onde controle ($p=0,05$) e *S. boulardii* ($p=0,49$). Os linfócitos desempenham um papel crucial na imunidade específica, dando início às respostas adaptativas do organismo, e o aumento na quantidade de linfócitos é um indicativo do estado fisiológico positivo dos frangos de corte quando se encontram em condições adequadas (Roll *et al.*, 2010; Mardhotillah *et al.*, 2021).

O aumento na quantidade de linfócitos é importante na imunomodulação das aves, contribuindo para a resistência às doenças através da produção de anticorpos e citocinas, responsáveis pela resposta humoral e celular (Levkut *et al.*, 2009; Hidanah *et al.*, 2018). Um sistema imunológico resistente é fundamental para garantir o bem-estar dos frangos de corte, visto que as condições de alojamento favorecem o surgimento de doenças (Wegner *et al.*, 2023).

Na contagem de heterófilos, é possível observar um aumento no tratamento controle em comparação com o *S. boulardii* ($p=0,005$), já o grupo que recebeu suplementação com *S. cerevisiae* não diferiu de ambos os grupos, controle ($p=0,11$) e *S. boulardii* ($p=0,46$). Os heterófilos são células fagocitárias pertencentes ao sistema imunológico inato e constituem a primeira barreira de defesa contra patógenos bacterianos do organismo (Minias, 2019).

Para os demais leucócitos, diferenças foram observadas para basófilos e monócitos, mas não foram encontradas para eosinófilos. A contagem de basófilos foi superior no tratamento controle em comparação com *S. cerevisiae* ($p=0,01$), mas não foi diferente de *S. boulardii* ($p=0,21$). E a contagem de monócitos também foi superior no tratamento controle, no entanto em comparação com *S. boulardii* ($p=0,007$), mas não diferiu de *S. cerevisiae* ($p=0,11$). Resultados semelhantes foram encontrados (Gutiérrez-Castro & Corredor-Matus, 2017), mas utilizando uma mistura com três probióticos (*S. cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus subtilis*) em que a mistura probiótica apresentou a menor proporção de monócitos em comparação com o controle.

Apesar da diminuição na porcentagem de leucócitos (heterófilos, basófilos e monócitos) observada nos tratamentos com *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, a redução pode sugerir a ausência de infecção ou influência de bactérias patogênicas que afetam o organismo (Mardhotillah *et al.*, 2021). Visto isso, é possível notar que as suplementações probióticas podem desempenhar um papel na modulação do sistema imunológico, contribuindo com a regulação dos níveis de leucócitos e possivelmente influenciando positivamente a resposta imunológica, mesmo que a diminuição na porcentagem de leucócitos seja observada.

No tratamento com *S. boulardii* a relação heterófilos/linfócitos foi inferior ($p=0,002$) ao tratamento controle (sem suplementação probiótica), enquanto que a suplementação com *S. cerevisiae* foi similar ao grupo controle ($p=0,06$). Além disso, os dois probióticos também não diferiram entre si ($p=0,49$). Já na interação entre os

fatores, exclusivamente na comparação entre os animais vacinados, o grupo controle foi significativamente diferente dos dois tratamentos probióticos, onde *S. boulardii* ($p=0,001$) e *S. cerevisiae* ($p=0,03$). Esse resultado corrobora com os encontrados por Gheisari & Kholeghipour (2006), os quais observaram que frangos de corte alimentados com o probiótico *S. cerevisiae* tiveram uma relação heterófilo/linfócito mais baixa, pelo fato de apresentarem uma maior população de linfócitos em comparação com o tratamento controle. As evidências sugerem um efeito positivo do probiótico, indicando um potencial benéfico para as aves.

Concentrações elevadas na relação heterófilos/linfócitos estão relacionadas com estresse crônico em frangos de corte, sendo uma variável confiável para avaliar os níveis de bem-estar das aves (Gross & Siegel, 1983; Maxwell, 1993). Durante o estresse, ocorre a liberação de corticosterona, e à medida que seus níveis aumentam, também observa-se um aumento nas proporções de heterófilos em relação aos linfócitos (H/L) no sangue (Post *et al.*, 2003; Blas, 2015; Scanes, 2016). Dessa forma, é possível sugerir que a suplementação com os probióticos pode ter diminuído os níveis de estresse nos frangos durante o experimento, visto que os níveis mais elevados da proporção H/L foram encontrados no grupo controle. Além disso, a suplementação com probiótico é capaz de não reduzir a porcentagem de linfócitos nas aves, contribuindo para a produção de anticorpos para o combate a agentes patogênicos.

4.3 Citometria de fluxo

A suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* diminuiu significativamente ($p<0,05$) o nível de lipoperoxidação nos eritrócitos (LPO) em comparação com o grupo controle e o grupo suplementado com *Saccharomyces boulardii* aos 21 dias do experimento (Tabela 5). Os demais biomarcadores analisados não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 5 – Biomarcadores medidos em eritrócitos de frangos de corte aos 21 dias sob condições de controle, suplementados com *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, vacinados ou não, e a interação entre os fatores (Médias ± Erro Padrão)

	Biomarcadores				
	DFI	LPO	FLU	ROS	INT
Probiótico					
Controle	2,10 ± 0,67	67,9 ± 1,7A	4,8 ± 0,12	3,8 ± 0,05	95,0 ± 0,9
<i>S. boulardii</i>	1,70 ± 0,67	66,2 ± 1,7A	4,6 ± 0,12	3,7 ± 0,05	98,0 ± 0,9
<i>S. cerevisiae</i>	2,70 ± 0,67	58,5 ± 1,7B	4,8 ± 0,12	3,8 ± 0,05	96,4 ± 0,9
Vacina					
Não vacinados	2,30 ± 0,50	63,7 ± 1,60	4,8 ± 0,10	3,7 ± 0,10	96,7 ± 0,9
Vacinados	2,10 ± 0,38	64,7 ± 1,14	4,7 ± 0,07	3,7 ± 0,04	96,4 ± 0,6
Interação					
T1 (con+vac)	1,80 ± 0,66	67,6 ± 1,97	4,8 ± 0,13	3,8 ± 0,06	94,6 ± 1,48
T3 (bou+vac)	2,40 ± 0,66	66,5 ± 1,97	4,6 ± 0,13	3,8 ± 0,06	98,0 ± 1,48
T5 (cer+vac)	2,10 ± 0,66	59,9 ± 1,97	4,8 ± 0,13	3,7 ± 0,06	96,7 ± 1,48
T2 (con+sem)	2,46 ± 0,93	68,2 ± 2,79	4,8 ± 0,19	3,8 ± 0,09	95,5 ± 1,04
T4 (bou+sem)	0,90 ± 0,93	65,9 ± 2,79	4,7 ± 0,19	3,7 ± 0,09	98,1 ± 1,04
T6 (cer+sem)	3,40 ± 0,93	57,1 ± 2,79	4,8 ± 0,19	3,9 ± 0,09	96,3 ± 1,04
Probabilidade					
Probiótico	0,39	<0,001	0,48	0,46	0,06
Vacina	0,82	0,62	0,83	0,91	0,87
Interação	0,22	0,76	0,99	0,99	0,85

Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$). DFI= índice de fragmentação de DNA; LPO= peroxidação lipídica; FLU= fluidez da membrana; ROS= espécies reativas de oxigênio; INT= integridade da membrana. Con = Controle; Bou = *S. boulardii*; Cer = *S. cerevisiae*; Vac = Vacinados; Sem = Não vacinados. EPM = Erro padrão da média. As variáveis FLU, ROS e INT foram convertidas para logaritmo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A diminuição da lipoperoxidação dos eritrócitos no tratamento que recebeu suplementação com *S. cerevisiae* indica que os animais obtiveram menor dano oxidativo aos lipídeos das membranas celulares. Dessa forma, pode-se interpretar como algo positivo, visto que um nível elevado de lipoperoxidação está associado com condições de saúde desfavoráveis e um aumento de espécies reativas do oxigênio (Martins *et al.*, 2022). Os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas conferem uma capacidade significativa de produzir radicais livres, e a lipoperoxidação lipídica refere-se ao processo oxidativo de quebra desses ácidos

graxos poli-insaturados, além de inativar enzimas ligadas à ela, prejudicando sua integridade e a fluidez (Barbosa *et al.*, 2010; Azeez *et al.*, 2012; Ogbuagu *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo nos frangos de corte é causado por condições estressantes, como dieta inadequada, calor excessivo, doenças e redução da atividade imunológica. Independentemente da origem, as consequências mais comuns são a diminuição da resistência osmótica dos eritrócitos através da peroxidação lipídica e a destruição das proteínas da membrana celular (Azeez *et al.*, 2012). Entre os mais desfavoráveis estresses na avicultura de corte, o estresse térmico está em primeiro lugar, uma vez que o frango eleva sua temperatura corporal causando alterações metabólicas, prejudicando o sistema imunológico e consequentemente reduzindo o desempenho zootécnico (Brossi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2023).

Além disso, durante o estresse térmico, a oxidação dos ácidos graxos aumenta para suprir a demanda por energia das aves na regulação da temperatura corporal (Sumanu *et al.*, 2023). O estresse térmico na avicultura de corte é algo comum. Os frangos de corte são animais que enfrentam dificuldade em dissipar o calor durante altas temperaturas, em função das penas e à falta de glândulas sudoríparas na pele (Zhang *et al.*, 2017).

Já aos 42 dias do experimento, não foram observadas diferenças significativas entre os biomarcadores nos tratamentos testados (Tabela 6). Apesar da diferença observada entre os tratamentos no dia 21 do experimento, nenhum biomarcador indicou estresse oxidativo ao final do estudo, indicando que a suplementação com probióticos não altera e pode até mesmo melhorar a homeostase do animal em comparação ao tratamento controle. A falta de uma condição estressante durante o experimento pode explicar a ausência de diferenças significativas nos marcadores de estresse oxidativo. Em circunstâncias estressantes, sabe-se que os probióticos apresentam potencial para reduzir o dano oxidativo e garantir a homeostase corporal, sendo fundamental na produção de frangos de corte.

Tabela 6 – Biomarcadores medidos em eritrócitos de frangos de corte aos 42 dias sob condições de controle, suplementados com *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, vacinados ou não, e a interação entre os fatores (Médias ± Erro Padrão)

	Biomarcadores				
	DFI	LPO	FLU	ROS	MITO
Probiótico					
Controle	1,7 ± 0,12	28,1 ± 1,35	5,1 ± 0,06	3,99 ± 0,01	4,15 ± 0,03
<i>S. boulardii</i>	1,4 ± 0,12	27,3 ± 1,35	5,0 ± 0,06	4,00 ± 0,01	4,21 ± 0,03
<i>S. cerevisiae</i>	1,5 ± 0,12	31,1 ± 1,35	5,0 ± 0,06	4,01 ± 0,01	4,20 ± 0,03
Vacina					
Não vacinados	1,5 ± 0,08	28,8 ± 0,90	5,1 ± 0,06	4,01 ± 0,01	4,18 ± 0,02
Vacinados	1,6 ± 0,08	28,9 ± 1,29	5,0 ± 0,04	3,99 ± 0,01	4,20 ± 0,02
Interação					
T1 (con+vac)	1,7 ± 0,14	28,0 ± 1,57	5,0 ± 0,07	3,99 ± 0,01	4,17 ± 0,03
T3 (bou+vac)	1,6 ± 0,14	27,5 ± 1,57	5,1 ± 0,07	3,99 ± 0,01	4,21 ± 0,03
T5 (cer+vac)	1,6 ± 0,14	31,1 ± 1,57	5,0 ± 0,07	3,99 ± 0,01	4,22 ± 0,03
T2 (con+sem)	1,6 ± 0,21	28,2 ± 2,21	5,0 ± 0,10	3,98 ± 0,01	4,14 ± 0,05
T4 (bou+sem)	1,3 ± 0,21	26,9 ± 2,21	5,0 ± 0,10	4,01 ± 0,01	4,21 ± 0,05
T6 (cer+sem)	1,4 ± 0,21	31,1 ± 2,21	5,1 ± 0,10	4,02 ± 0,01	4,19 ± 0,05
Probabilidade					
Probiótico	0,47	0,11	0,93	0,26	0,36
Vacina	0,33	0,94	0,77	0,18	0,59
Interação	0,89	0,98	0,85	0,19	0,96

Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$). DFI= índice de fragmentação de DNA; LPO= peroxidação lipídica; FLU= fluidez da membrana; ROS= espécies reativas de oxigênio; MITO= potencial de membrana mitocondrial. Con = Controle; Bou = *S. boulardii*; Cer = *S. cerevisiae*; Vac = Vacinados; Sem = Não vacinados. EPM = Erro padrão da média. As variáveis FLU, ROS e MITO foram convertidas para logaritmo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O estresse oxidativo é causado pelo excesso da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente em uma desproporção entre elementos oxidantes e antioxidantes, causando um efeito prejudicial nas células do organismo, necessitando de antioxidantes para evitar danos e não prejudicar células do sistema imunológico (Barbosa *et al.*, 2010; Puertollano *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que os probióticos podem atuar como antioxidantes, protegendo as aves contra os danos oxidativos (Cramer *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2022; Yuan *et al.*, 2023).

Os probióticos podem estimular o sistema antioxidante, o qual é capaz de eliminar e transformar os radicais livres em produtos mais estáveis, aumentando a

estabilidade dos lipídeos da membrana celular e evitando a oxidação dos mesmos durante o estresse oxidativo (Ogbuagu *et al.*, 2018; Sumanu *et al.*, 2023). Eles também são capazes de produzir substâncias como o butirato e a glutatona, que são compostos com atividade antioxidante, e com a capacidade de eliminar radicais (Wang *et al.*, 2017).

Um estudo realizado por Sumanu *et al.* (2023) demonstrou que *S. cerevisiae* foi capaz de reduzir o dano oxidativo em frangos de corte, minimizando a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), atuando como um antioxidante e agente anti estresse. Além disso, o processo antioxidante da *S. cerevisiae* pode proporcionar mais imunidade e uma sensação de conforto durante o estresse térmico.

Outro estudo realizado por Hou *et al.* (2020), observou que a *S. cerevisiae* pode ativar o sistema de glutatona peroxidase e tioredoxina redutase, que são enzimas com potencial antioxidante e capazes de melhorar a estabilidade oxidativa. Sendo assim, se torna uma opção viável para reduzir os danos causados pelo estresse.

Uma pesquisa feita por Rajput *et al.* (2013) também concluiu que a *S. boulardii* pode ser usada como probiótico para garantir a homeostase dos frangos de corte, e ser utilizada como substituto de antioxidantes sintéticos. Dessa forma, é possível observar que estudos utilizando os dois probióticos (*S. boulardii* e *S. cerevisiae*) são capazes de garantir melhor saúde aos frangos de corte, através da manutenção da homeostase e diminuição dos danos causados por estresse comumente encontrados na avicultura de corte.

4.3 Microbioma

Taxonomicamente a análise de diversidade demonstrou cinco filos diferentes, todos pertencentes ao domínio *Bacteria*, sendo eles: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria*. Destes, *Firmicutes* foi o mais abundante entre eles, representando em torno de 90% de todos táxons microbianos. Foi comprovado que o aumento do filo *Firmicutes* pode favorecer a absorção de nutrientes e energia pelos frangos de corte, podendo levar a um maior peso corporal (Singh *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2023). A dinâmica das comunidades microbianas é representada pelos 20 gêneros mais abundantes (Figura 7).

Figura 7 – Principais gêneros de bactérias detectados em amostras fecais de frangos de corte

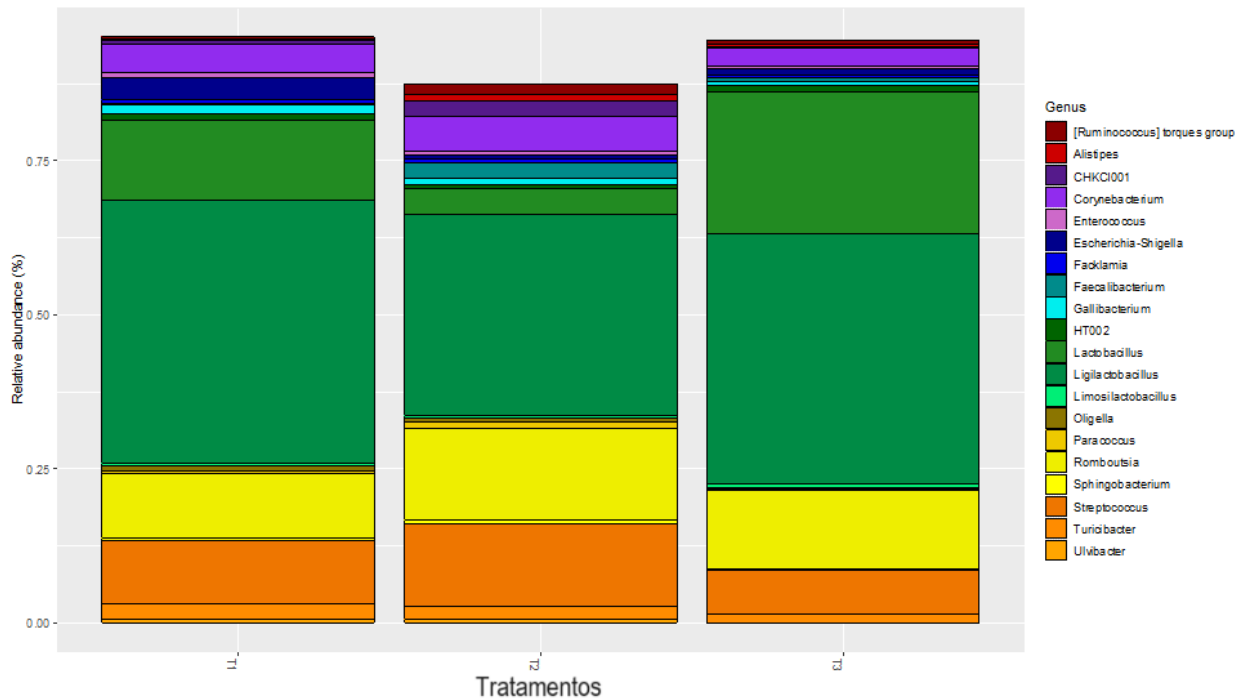


Gráfico de barras dos 20 principais gêneros por medida de abundância relativa média em amostras fecais de frangos de corte. T1= controle; T2= *Sacharomyces boulardii*; T3= *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível verificar que *Lactobacillus*, *Romboutsia*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* foram os gêneros mais abundantes em todas as amostras analisadas. Ao total, 71 gêneros foram encontrados, e dentre eles 128 espécies identificadas. Os probióticos podem favorecer o crescimento de outras bactérias, como por exemplo as do gênero *Lactobacillus* (Clavijo & Flórez, 2018), as quais possuem habilidades de restaurar o equilíbrio e impulsionar o crescimento da microbiota que produz butirato (Meimandipour *et al.*, 2009), que é importante para o fornecimento de energia para as células intestinais, por promover um ambiente intestinal que inibe o crescimento de microrganismos patogênicos e por possuir propriedades antioxidantes que ajudam a reduzir o estresse oxidativo no intestino das aves.

Além disso, ao analisar a abundância microbiológica de cada amostra, que se dá através do total de sequências de DNA encontrados, foi possível observar que o tratamento controle obteve um total de 123.441 sequências, representando 100% do quantitativo, enquanto o tratamento com *S. boulardii* obteve 15.643 sequências (12,67%) e o tratamento com *S. cerevisiae* obteve 29.173 sequências (23,63%).

Adicionalmente, o tratamento controle também obteve maior diversidade microbiológica, com 116 espécies de microrganismos diferentes encontrados, enquanto que o tratamento com *S. boulardii* obteve 99 espécies, e o tratamento com *S. cerevisiae* obteve 100.

Dessa forma, é possível perceber a diminuição da quantidade de microrganismos presentes em cada filo nos tratamentos utilizando probióticos, confirmando a capacidade de modular a microbiota, através da exclusão por competição. Ao realizar a análise estatística, pôde-se verificar que quatro filios demonstraram diminuição da abundância com a suplementação utilizando *S. boulardii* quando comparados com o grupo controle (Figura 8), sendo eles *Actinobacteriota*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*.

Figura 8 – Abundância de filios do tratamento controle comparados ao tratamento com suplementação de *S. boulardii*

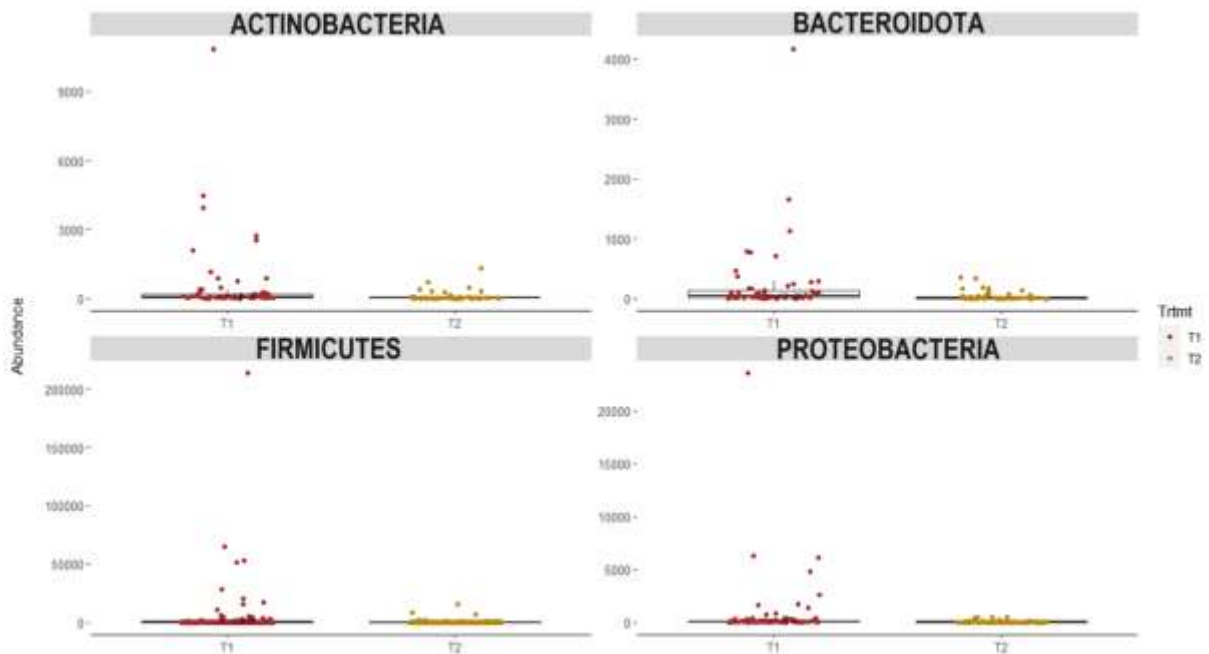


Gráfico de Box-plot da comparação entre o tratamento controle e o tratamento com *Saccharomyces boulardii*. T1 = tratamento controle, T2 = *Saccharomyces boulardii*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados de Qin et al. (2018) corroboram com as evidências deste trabalho, onde observaram que a suplementação com *S. boulardii* pôde modular a microbiota intestinal, transformando em uma biodiversidade microbiana mais saudável, conseqüentemente melhorando a saúde e o desempenho de frangos de corte. O mesmo resultado foi encontrado por Massacci et al. (2019), demonstrando

que a suplementação poderia melhorar o desempenho dos frangos de corte através da modulação do ecossistema intestinal, e até modificar a estrutura intestinal, gerando um melhor aproveitamento de energia e nutrientes.

No tratamento utilizando *S. cerevisiae*, os quatro filos apresentaram abundância inferior a observada no grupo controle (Figura 9), constatando que a suplementação com probiótico modulou a microbiota dos frangos de corte. Resultados semelhantes foram encontrados por Lin et al. (2023), onde testaram um composto derivado de *S. cerevisiae* e observaram uma alteração na composição da microbiota bacteriana intestinal em frangos de corte. E também corroboram com os resultados encontrados por Egorova et al. (2016) e por Sun et al. (2021) em que ambos estudos puderam observar uma alteração positiva na microbiota cecal em frangos de corte suplementados com *S. cerevisiae*.

Figura 9 – Abundância de filos do tratamento controle comparados ao tratamento com suplementação de *S. cerevisiae*

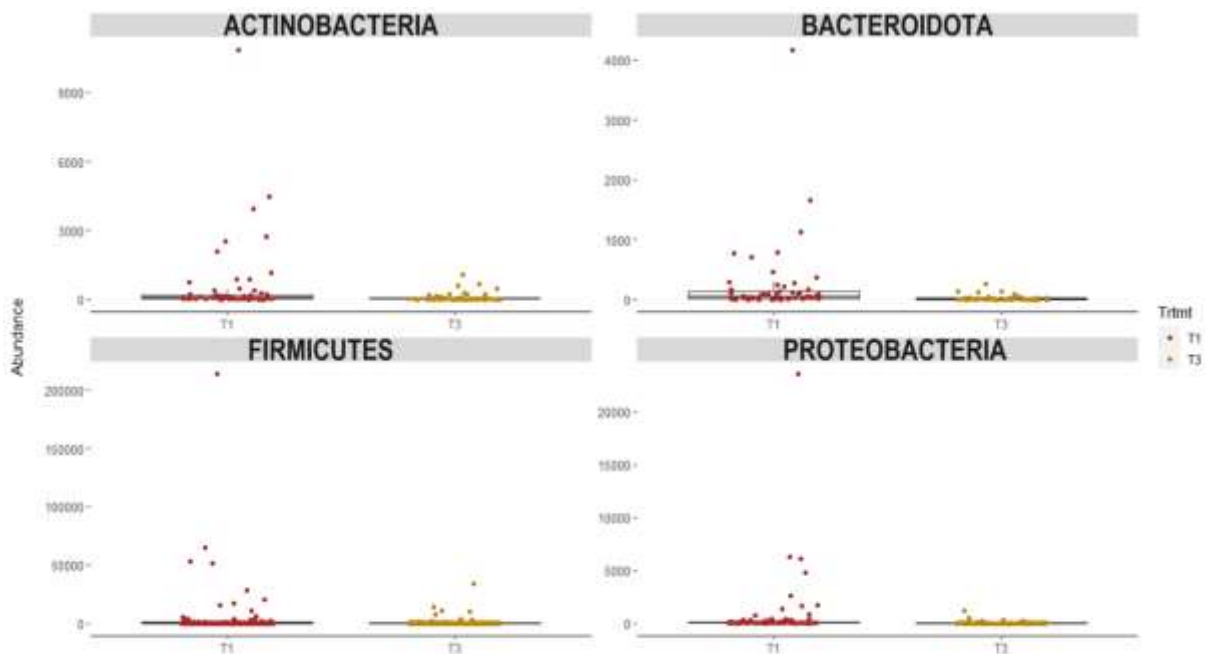


Gráfico de Box-plot da comparação entre o tratamento controle e o tratamento com *S. cerevisiae*. T1 = tratamento controle, T2 = tratamento com *S. cerevisiae*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A modulação da microbiota intestinal se torna relevante pois favorece o hospedeiro e aumenta a resistência contra desafios gastrointestinais, principalmente na criação de frangos de corte (Yan et al., 2023). Um dos principais desafios na avicultura de corte são os problemas intestinais causados por microrganismos,

causando impacto negativo na produção e o aumento da mortalidade das aves. Dessa forma, a utilização de probióticos como moduladores da microbiota é fundamental para garantir uma microbiota equilibrada e capaz de competir com patógenos nocivos, reduzindo a probabilidade de infecções.

Além disso, como os probióticos são produtos naturais e considerados seguros (*Generally Recognized as Safe* - GRAS), a aceitação pelo mercado consumidor se torna maior. A procura por alimentos com procedência mais natural vem ganhando espaço nos últimos anos. A preocupação com práticas alimentares mais sustentáveis faz com que a indústria tenha que se adaptar, e uma das tendências é eliminar por completo a utilização de antibióticos, que acabam desenvolvendo resistência bacteriana em humanos.

4.3 Contagem de ovos e oocistos

Ao analisar a contagem de ovos e oocistos nas amostras de fezes (Figura 10), observa-se uma diferença entre o tratamento utilizando *S. boulardii* e *S. cerevisiae* na contagem de oocistos ($p=0,04$).

Figura 10 – Contagem de ovos e oocistos dos tratamentos *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* e controle

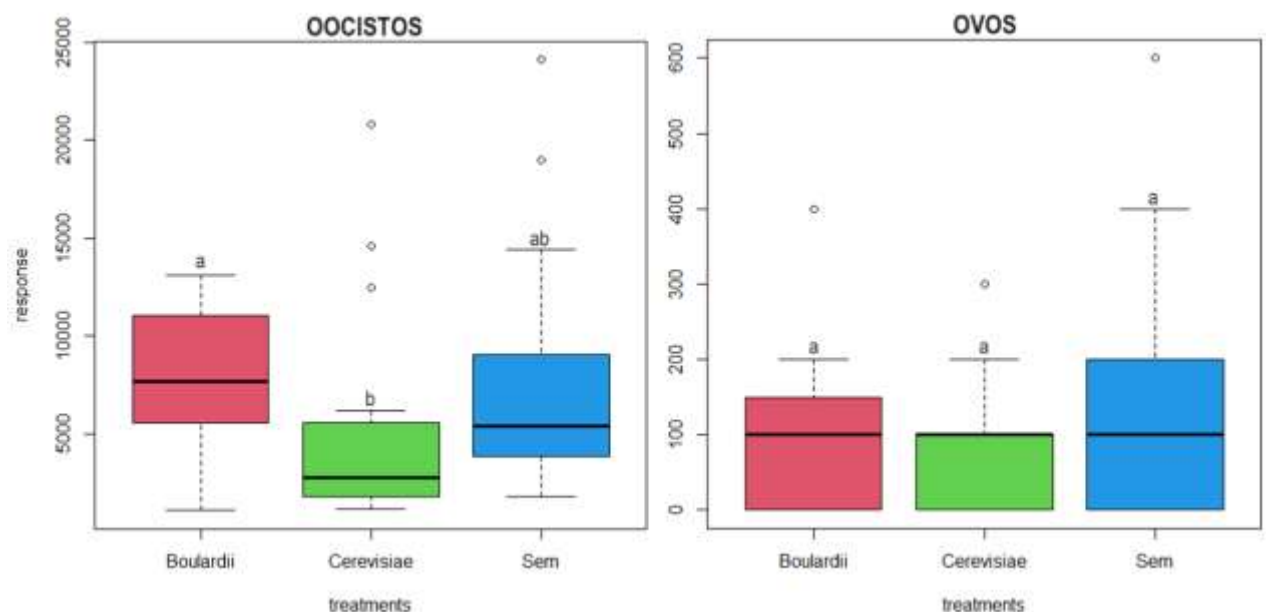
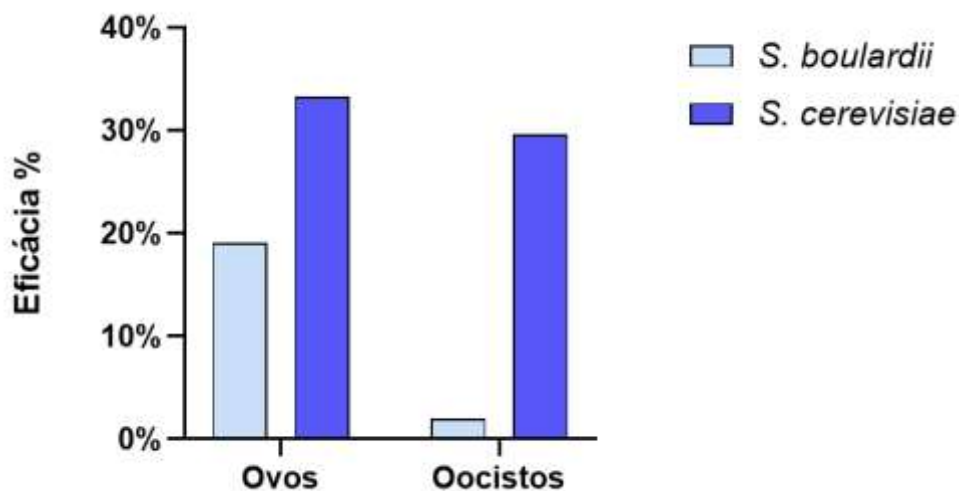


Gráfico de Box-plot das médias de contagem de ovos e oocistos. Boulardii = *Saccharomyces boulardii*; Cerevisiae = *Saccharomyces cerevisiae*; Sem = tratamento controle. Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p<0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao analisar a eficácia dos tratamentos testados, observa-se um efeito ovicida e oocistocida de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* (Figura 11) em comparação ao tratamento controle. Os percentuais de eficácia ovicida de *S. boulardii* e de *S. cerevisiae* foram 19,04% e 33,33%, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle. Já os percentuais de eficácia oocistocida foram 1,96% e 29,66% respectivamente, em comparação com o tratamento controle, indicando que o tratamento que recebeu *S. cerevisiae* mostrou-se mais eficiente.

Figura 11 – Atividade ovicida e oocistocida dos probióticos sobre a contagem de ovos e de oocistos em frangos de corte



Os dados representam a redução percentual na contagem de ovos e oocistos da *Saccharomyces boulardii* e da *Saccharomyces cerevisiae* em ovos e oocistos gastrointestinais de frangos de corte.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Durante as análises, foi possível identificar que os ovos encontrados nas amostras fecais são pertencentes a ordem *Strongylida*, e os oocistos foram identificados como pertencentes ao gênero *Isospora*. A ordem *Strongylida* é uma das ramificações mais significativas na evolução dos nematoides parasitas, que ocorrem em todos animais vertebrados terrestres (Chilton *et al.*, 2006). Já a *Isospora* é um dos gêneros causadores da coccidiose em aves, doença de grande relevância na avicultura de corte (McDougald, 1998). A infecção por coccidiose é causada quando o animal ingere oocistos presentes no ambiente. Após a ingestão, o ambiente no trato digestivo da ave desencadeia o rompimento do oocisto na moela, levando a liberação de esporozoítos que invadem e causam a destruição das células da mucosa intestinal

(Upadhaya *et al.*, 2019), causando principalmente diarreia e conseqüentemente piora no desenvolvimento animal, resultando em perdas econômicas.

O tratamento e a prevenção da coccidiose dependem de medicamentos e vacinas, porém, a vacinação pode ser tornar algo custoso, e cepas resistentes de coccídeos podem comprometer a eficácia dos medicamentos. Ainda, as regulamentações sobre resíduos químicos nos alimentos e a preocupação do mercado consumidor tornam-se atrativos para o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento mais naturais (Gao *et al.*, 2009).

Estudos utilizando diferentes probióticos já demonstraram eficácia na resistência contra parasitas e contra a coccidiose em aves (Lee *et al.*, 2007; Abdelrahman *et al.*, 2014; Menegon *et al.*, 2021; Mohsin *et al.*, 2021). E, no presente estudo, foi possível observar que *S. boulardii* foi eficaz no efeito ovicida contra os ovos nematoides em comparação com o controle, enquanto que *S. cerevisiae* foi eficaz tanto no efeito ovicida quanto no efeito oocistocida contra os oocistos de *Isospora*.

Os resultados encontrados nesse estudo corroboram com os obtidos por Gao *et al.* (2009), que observaram uma redução dos danos causados por coccidiose utilizando um produto de fermentação da *S. cerevisiae* para frangos de corte. De igual forma, corroboram com os encontrados por Barbalho (2022), que observou a eficiência em eliminar microrganismos patógenos no trato gastrointestinal utilizando parede celular de *S. cerevisiae* na alimentação de frangos de corte desafiados com coccidiose. Além desses, um estudo utilizando uma combinação entre dois probióticos (*Pediococcus* e *S. cerevisiae*) reduziu a eliminação de oocistos em frangos de corte (Abdelrahman *et al.*, 2014). Outros resultados encontrados por Elmenawey *et al.* (2019) observaram que *S. boulardii* também aumentou a resistência à uma infecção por coccidiose, observando uma diminuição no número de oocistos eliminados.

Os probióticos atuam no controle da microbiota intestinal e na intervenção da colonização por agentes patogênicos na mucosa por exclusão competitiva, através da diminuição do pH e secreção de proteínas bactericidas, mais conhecidas como bacteriocinas (Boirivant & Strober, 2007). *S. boulardii* também produz compostos inibidores, incluindo as bacteriocinas, ácidos biliares conjugados e ácidos graxos específicos, que acabam limitando a sobrevivência e o crescimento de microrganismos (Roy & Ray, 2023).

Dessa forma, sugere-se que os probióticos tenham potencial para substituir medicamentos químicos, afim de tratar ou até mesmo evitar infecções causadas por

nematoides ou coccídeos. Isso pode ser atribuído pelo fato de os probióticos garantirem uma população microbiana equilibrada, originando um trato gastrointestinal saudável (Elmenawey *et al.*, 2019).

5 Conclusões

A suplementação alimentar com *Saccharomyces boulardii* ou *Saccharomyces cerevisiae* proporcionaram benefícios imunológicos aos frangos de corte, aumentando o nível de anticorpos específicos. O resultado sugere o potencial dessas leveduras como agentes promotores de saúde em frangos de corte.

A partir dos dados obtidos neste estudo não foi possível relacionar a suplementação probiótica com a resposta celular.

A suplementação com *S. boulardii* aumentou a concentração de linfócitos nos frangos de corte, além de apresentar valores mais baixos da relação H/L em comparação ao tratamento controle. Assim sendo, contribuiu com a imunidade e pode ter diminuído os níveis de estresse nos frangos durante o experimento.

A administração de *S. cerevisiae* foi capaz de diminuir os níveis de lipoperoxidação eritrocitária nos frangos de corte aos 21 dias. Apesar disso, as duas espécies de *Saccharomyces* não influenciaram os biomarcadores de estresse oxidativo ao final do experimento.

Os dois suplementos probióticos regularam negativamente a abundância dos filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. Além disso, a quantidade de espécies de microrganismos foi reduzida pelos dois probióticos administrados, indicando seu potencial como modulador.

A suplementação com *S. cerevisiae* demonstrou ser mais eficiente em comparação com a *S. boulardii* na ação ovicida e oocistocida. Sugerindo que pode ser uma alternativa aos antimicrobianos, considerando os impactos benéficos em frangos alimentados com dieta livre de antibióticos.

Referências

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2023. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2023.
- ABD EL-HACK, M. E.; EL-SAADONY, M. T.; ELBESTAWY, A. R.; NAHED, A.; SAAD, A. M.; SALEM, H. M.; EL TAHAN, A. M.; KHAFAGA, A. F.; TAHA, A. E.; QAMAR, S, F, A.; EL-TARABILY, K, A. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives – a comprehensive review. **Poultry Science**, v. 101, n. 2, p. 101590, 2022.
- ABDELRAHMAN, W.; MOHNL, M.; TEICHMANN, K.; DOUPOVEC, B.; SCHATZMAYR, G.; LUMPKINS, B.; MATHIS, G. Comparative evaluation of probiotic and salinomycin effects on performance and coccidiosis control in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, n. 12, p. 3002–3008, 2014.
- AHIWE, E. U.; TEDESCHI DOS SANTOS, T. T.; GRAHAM, H.; IJI, P. A. Can probiotic or prebiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) serve as alternatives to in-feed antibiotics for healthy or disease-challenged broiler chickens?: a review. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 30, n. 3, p. 100164, 2021.
- AL-DABAGH, A; SHAREEF, A. Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of broiler chicks. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 23, p. 23-29, 2009.
- ALIZADEH, M.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C.; ROGIEWICZ, A.; PATTERSON, R.; SLOMINSKI, B. A. Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance, gut morphology, and gene expression of pattern recognition receptors and cytokines in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 95, n. 3, p. 507–517, 2016.
- AL-KHALAIFAH, H. S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. **Poultry Science**, v. 97, n. 11, p. 3807–3815, 2018.
- AZEEZ, O. I.; OYAGBEMI, A. A.; IJI, O. T. Haematology and Erythrocyte Osmotic Fragility Indices in Domestic Chicken Following Exposure to a Polyvalent Iodophorous Disinfectant. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 99-103, 2012.
- BADR, H.; EL-BAZ, A.; MOHAMED, I.; SHETAIA, Y.; EL-SAYED, A, S, A.; SOROUR, N. Bioprocess optimization of glutathione production by *Saccharomyces boulardii*: biochemical characterization of glutathione peroxidase. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 10, p. 6183–6196, 2021.
- BAKSI, S.; RAO, N.; KHAN, M.; CHAUHAN, P.; CHAUHAN, A. Efficacy of Inactivated Fowl Cholera Vaccine in Chickens. **PSM Veterinary Research**, v. 3, n. 2, p. 32–35, 2018.

BANIK, A.; MONDAL, J.; RAKSHIT, S.; GHOSH, K. Amelioration of cold-induced gastric injury by a yeast probiotic isolated from traditional fermented foods. **Journal of Functional Foods**, v. 59, p. 164–173, 2019.

BARBALHO, R. L. C. **Parede celular de levedura, probiótico, e óleos essenciais em dietas de frangos de corte desafiados com coccidiose e clostridium**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2022.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. DE C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643, 2010.

BELDA, I.; RUIZ, J.; SANTOS, A.; WYK, N. V.; PRETORIUS, I. S. *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Genetics**, v. 35, n. 12, p. 956–957, 2019.

BLAS, J. Stress in Birds. **Sturkie's Avian Physiology: Sixth Edition**. p.769–810, 2015.

BOIRIVANT, M.; STROBER, W. The mechanism of action of probiotics. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 679, 2007.

BORSA, A. Valores hematológicos em frangos de corte de criação industrial. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n. 1, p. 25–31, 2009.

BRISBIN, J. T.; GONG, J.; OROUJI, S.; ESUFALI, J.; MALLICK, A, I.; PARVIZI, P.; SHEWEN, P. E.; SHARIF, S. Oral Treatment of Chickens with *Lactobacilli* Influences Elicitation of Immune Responses. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 9, p. 1447–1455, 2011.

BROSSI, C.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; AMAZONAS, E. DE A.; MENTEN, J. F. M. Estresse térmico durante o pré-abate em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1284–1293, 2009.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J.; HOLMES, S. P. DADA2: High resolution sample inference from amplicon data. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/024034v1>. Acesso em: 11 jan. 2024.

CAO, Y.; XUN, M.; REN, S.; WANG, J. Effects of dietary organic acids and probiotics on laying performance, egg quality, serum antioxidants and expressions of reproductive genes of laying ducks in the late phase of production. **Poultry Science**, v. 101, n. 12, p. 102189, 2022.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; CAVALEIRO, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 1, p. 4516–4522, 2011.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, S.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; CAVALEIRO, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N.; CASTRO, A. G. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 35-42, 2003.

CHÁVEZ, L.; LÓPEZ, A.; SUESCÚN, J. Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, p. 51–58, 2016.

CHEN, C.; SU, Z.; LI, Y.; LUAN, P.; WANG, S.; ZHANG, H.; XIAO, F.; GUO, H.; CAO, Z.; LI, H.; LENG, L. Estimation of the genetic parameters of traits relevant to feed efficiency: result from broiler lines divergent for high or low abdominal fat content. **Poultry Science**, v. 100, n. 2, p. 461–466, 2021.

CHILTON, N. B.; HUBY-CHILTON, F.; GASSER, R. B.; BEVERIDGE, I. The evolutionary origins of nematodes within the order *Strongylida* are related to predilection sites within hosts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 1, p. 118–128, 2006.

CLAVIJO, V.; FLÓREZ, M. J. V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. **Poultry Science**, v. 97, n. 3, p. 1006–1021, 2018.

COTTER, P. F.; SEFTON, A. E.; LILBURN, M. S. "Manipulating the immune system of layers and breeders: Novel applications for mannan oligosaccharides." **Nutritional Biotechnology in the Feed and food Industries**, p. 21-28, 2002.

CRAMER, T. A.; KIM, H. W.; CHAO, Y.; WANG, W.; CHENG, H. W.; KIM, Y. H. B. Effects of probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on meat quality characteristics of breast muscle from broilers exposed to chronic heat stress. **Poultry Science**, v. 97, n. 9, p. 3358–3368, 2018.

DELAGO, J.; MILLER, E. A.; FLORES-FIGUEROA, C.; MUNOZ-AGUAYO, J.; CARDONA, C.; SMITH, A. H.; JOHNSON, T. J. Survey of clinical and commensal *Escherichia coli* from commercial broilers and turkeys, with emphasis on high-risk clones using APECTyper. **Poultry Science**, v. 102, n. 7, p. 102712, 2023.

DING, B.; ZHENG, J.; WANG, X.; ZHANG, L.; SUN, D.; XING, Q.; PIRONE, A.; FRONTE, B. Effects of dietary yeast beta-1,3-1,6-glucan on growth performance, intestinal morphology and chosen immunity parameters changes in Haidong chicks. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, n. 10, p. 1558–1564, 2019.

EGOROVA, T. A.; LENKOVA, T. N.; ILINA, L.; ELENA, Y. The *saccharomyces* sp. and *bacillus subtilis* based probiotics influence on chicken broiler productivity and

caecum microbiome community. **Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya**, v. 51, p. 891–902, 2016.

ELMENAWEY, M.; MOHAMMED, F.; MORSY, E.; SALEM, H. Drug-Independent Control Strategy of Coccidiosis in Broiler Chickens Using Prebiotic, Probiotic and Symbiotic. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 12, p. 22–33, 2019.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, v. 83, n. 4, p. 580–590, 2004.

FAO. Alimentação e Agricultura Mundial – Anuário Estatístico 2022. 2022. Disponível em: https://www.fao.org/3/CC2211EN/online/CC2211EN.html#chapter-2_2. Acesso em: 07 nov. 2023.

FAO. As 20 principais commodities, valor bruto de produção no Brasil. 2021. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country. Acesso em: 16 nov. 2023.

FAO; OMS. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. Disponível em: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2023.

FEYE, K. M.; BAXTER, M. F. A.; TELLEZ-ISAIAS, G.; KOGUT, M. H.; RICKE, S. C. Influential factors on the composition of the conventionally raised broiler gastrointestinal microbiomes. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 653–659, 2020.

FIETTO, J. L.; ARAÚJO, R. S.; VALADÃO, F. N.; FIETTO, L. G.; BRANDÃO, R. L.; NEVES, M. J.; GOMES, F. C. O.; NICOLI, J. R.; CASTRO, I. M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 615–621, 2004.

FRIES-CRAFT, K.; BOBECK, E. A. Early *Salmonella Typhimurium* inoculation may obscure anti-interleukin-10 protective effects on broiler performance during coccidiosis and necrotic enteritis challenge. **Poultry Science**, v. 103, n. 1, p. 103187, 2024.

GAO, J.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; YU, S. H.; YOON, I.; MOORE, D.; GAO, Y. P.; YAN, H. J.; QI, G. H. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. **Poultry Science**, v. 88, n. 10, p. 2141–2151, 2009.

GHAZANFARI, S.; SHADBAD, C. A.; MEIMANDIPOR, A.; HOSSEINI, S. A.; HONARBAKHSH, S. Physiological changes in broiler chickens subjected to dietary ajwain (*trachyspermum ammi* l.) essential oil in encapsulated and conventional forms within a wheat-based diet. **Veterinary and Animal Science**, v. 22, p. 100321, 2023.

GHEISARI, A. A; KHOLEGHIPOUR, B. Effect of dietary inclusion of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, immune responses and blood parameters of broiler chickens. XII European Poultry Conference, EPC 2006.

Conference paper. Department of Animal Science, Isfahan Research Center for Agriculture and Natural Resources, 2006.

GRIGGS, J. P.; JACOB, J. P. Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 4, p. 750–756, 2005.

GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 972–979, 1983.

GURBUZ, E.; BALEVI, T.; KURTOGLU, V.; OZNURLU, Y. Effects of adding yeast cell walls and *Yucca schidigera* extract to diets of layer chicks. **British Poultry Science**, v. 52, n. 5, p. 625–631, 2011.

GUTIÉRREZ-CASTRO, L. L.; CORREDOR-MATUS, J. R. Parámetros sanguíneos y respuesta inmune en pollos de engorde alimentados con probióticos. **Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)**, v. 11, n. 2, p. 81–92, 2017.

HAGEDORN, M.; MCCARTHY, M.; CARTER, V. L.; MEYERS, S. A. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

HALDAR, S.; GHOSH, T.K.; TOSHIWATI; BEDFORD, M. R. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with *Salmonella enteritidis*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, n. 1–2, p. 61–71, 2011.

HE, T.; MAHFUZ, S.; PIAO, X.; WU, D.; WANG, W.; YAN, H.; OUYANG, T.; LIU, Y. Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a substitute to antibiotic on growth performance, immune function, serum biochemical parameters and intestinal morphology of broilers. **Journal of Applied Animal Research**, v. 49, n. 1, p. 15–22, 2021.

HIDANAH, S.; SABDONINGRUM, E. K.; WAHJUNI, R. S.; CHUSNIATI, S. Effects of meniran (*Phyllanthus niruri* L.) administration on leukocyte profile of broiler chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. **Veterinary World**, v. 11, n. 6, p. 834–839, 2018.

HÖTZEL, M. J.; VANDRESEN, B. Brazilians' attitudes to meat consumption and production: Present and future challenges to the sustainability of the meat industry. **Meat Science**, v. 192, p. 108893, 2022.

HOU, L.; QIU, H.; SUN, P.; ZHU, L.; CHEN, F.; QIN, S. Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* improves the meat quality of broiler chickens via activation of the glutathione and thioredoxin systems. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6045–6054, 2020.

HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; RATH, N. C.; TELLEZ, G. Limited Treatment with β -1,3/1,6-Glucan Improves Production Values of Broiler Chickens Challenged with *Escherichia Coli*. **Poultry Science**, v. 85, n. 4, p. 613–618, 2006.

JAN, T.; NEGI, R.; SHARMA, B.; KOUR, D.; KUMAR, S.; RAI, A. K.; RUSTAGI, S.; SINGH, S., XEQUE, M. A.; KUMAR, K.; AHMED, N.; YADAV, A, N. Diversity, distribution and role of probiotics for human health: Current research and future challenges. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 53, p. 102889, 2023.

KAIRMI, S. H.; TAHA-ABDELAZIZ, K.; YITBAREK, A.; SARGOLZAEI, M.; SPAHANY, H.; ASTILL, J.; SHOJADOOST, B.; ALIZADEH, M.; KULKARNI, R, R.; PARKINSON, J.; SHARIF, S. Effects of therapeutic levels of dietary antibiotics on the cecal microbiome composition of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, p. 101864, 2022.

KASSAMBARA, A. ggpubr:“ggplot2” based publication ready plots. 2020.

KUMAR, S.; CIRACI, C.; REDMOND, S. B.; CHUAMMITRI, P.; ANDREASEN, C. B.; PALIC, D.; LAMONT, S. J. Immune response gene expression in spleens of diverse chicken lines fed dietary immunomodulators. **Poultry Science**, v. 90, n. 5, p. 1009–1013, 2011.

LAHTI, L.; SHETTY, S. Introduction to the microbiome R package. 2018.

LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 21–27, 2015.

LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S.; DALLOUL, R. A.; PARK, D. W.; HONG, Y, H.; LIN, J. J. Influence of *Pediococcus*-Based Probiotic on Coccidiosis in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 86, n. 1, p. 63–66, 2007.

LEE, S.; LA, T. M.; LEE, H. J.; CHOI, I. S.; CHANG-SEON, S.; PARK, S. Y.; LEE, J. B.; LEE, S. W. Characterization of microbial communities in the chicken oviduct and the origin of chicken embryo gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6838, 2019.

LEÓN-NÚÑEZ, D.; VIZCAÍNO-LÓPEZ, M. F.; ESCORCIA, M.; CORREA, D.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, E.; GÓMES-CHÁVEZ, F. IgY Antibodies as Biotherapeutics in Biomedicine. **Antibodies**, v. 11, n. 4, p. 62, 2022.

LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; LEVKUTOVÁ, M.; SEVCÍKOVÁ, Z.; HERICH, R.; BORUTOVÁ, R.; LENG, L. Leukocytic responses of broilers following dietary contamination with deoxynivalenol and/or treatment by dietary selenium supplementation. **British Poultry Science**, v. 50, n. 2, p. 181–187, 2009.

LIN, J.; COMI, M.; VERA, P.; ALESSANDRO, A.; QIU, K.; WANG, J.; WU, S.; QI, G.; ZHANG, H. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* hydrolysate on growth performance, immunity function, and intestinal health in broilers. **Poultry Science**, v. 102, n. 1, p. 102237, 2023.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LONG, S.; LIU, L.; LIU, S.; MAHFUZ, S.; PIAO, X. Effects of Forsythia Suspense Extract as an Antibiotics Substitute on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Serum Antioxidant Capacity, Fecal *Escherichia coli* Concentration and Intestinal Morphology of Weaned Piglets. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 729, 2019.

MACHADO CAETANO, J. A.; PARAMÉS, M. T.; BABO, M. J.; SANTOS, A.; FERREIRA, A. B.; FREITAS, A. A.; COELHO, M. R.; MATEUS, A. M.; Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 245–259, 1986.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M.; ALMEIDA, J. G.; MACARI, M. Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 3, p. 75–82, 2001.

MARDHOTILLAH, A. B. A.; HIDAYAH, N.; SJOFJAN, O.; DJUNAIDI, I.; ALI, U. Profile of Total Leukocytes and Differential Leukocytes in Broilers Using Herbal Feed Additives. **Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropics**, v. 9, n. 1, p. 62-66, 2021.

MARTINEZ-ALBORCIA, M. J.; VALVERDE, A.; PARRILLA, I.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

MARTINS, A. W. S.; DELLAGOSTIN, E. N.; BLÖDORN, E. B.; SILVEIRA, T. L. R.; SAMPAIO, L. A.; KOMNINO, E. R.; VARELA JÚNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; NUNES, L. S.; REMIÃO, M. H.; COLLARES, G. L.; DOMINGUES, W. B.; CAMPOS, V. F. Exposure to salinity induces oxidative damage and changes in the expression of genes related to appetite regulation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Frontiers in Genetics**, v. 13, 2022.

MARTINS, S. F. **Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, na resposta inflamatória induzida por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. *Typhimurium*.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MARX, F. O.; ALVAREZ, M. V. N.; BASSI, L. S.; FÉLIX, A. P.; KRABBE, E. L.; OLIVEIRA, S. G.; MAIORKA, A. Use of statistical models to determine the optimal concentration of metabolizable energy for growth performance of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 274, p. 105268, 2023.

MASSACCI, F. R.; LOVITO, C.; TOFANI, S.; TENTELLINI, M.; GENOVESE, D. A.; DE LEO, A. A.; PAPA, P.; MAGISTRALI, C. F.; MANUALI, E.; TRABALZA-MANUCCI, M.; MOSCATI, L.; FORTE, C. Dietary *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 Positively Affects Performance and Intestinal Ecosystem in Broilers during a *Campylobacter jejuni* Infection. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 596, 2019.

MASU, M. E.; NADHIFAH, N.; MULYATI; et al. The effect of administration Marolis™ probiotic on haematology profile and organs function (liver and kidney) of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758). In: **AIP Conference Proceedings**, v. 2260, n. 1, p. 060019, 2020.

MAXWELL, M. H. Avian blood leucocyte responses to stress. **World's Poultry Science Journal**, v. 49, n. 1, p. 34–43, 1993.

MCDOUGALD, L. R. Intestinal protozoa important to poultry. **Poultry Science**, v. 77, n. 8, p. 1156–1158, 1998.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. (M. Watson, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate Immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338–344, 2000.

MEIMANDIPOUR, A.; SHUHAIMI, M.; HAIR-BEJO, M.; AZHAR, K., KABEIR, B. M.; BASTI, B.; YAZID, A. M. In vitro fermentation of broiler cecal content: The role of lactobacilli and pH value on the composition of microbiota and end products fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 415–420, 2009.

MENEGON, Y. A.; ROLL, A. A. P.; PINTO, N. B.; ROLL, V. F. B.; LEITE, F. P. L. Eimeria bateri Natural Infection: Oocysts Reductions in Grey Quail (*Coturnix coturnix*) Treated with *Bacillus thuringensis var. israelensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 2021.

MINIAS, P. Evolution of heterophil/lymphocyte ratios in response to ecological and life-history traits: A comparative analysis across the avian tree of life. **Journal of Animal Ecology**, v. 88, n. 4, p. 554–565, 2019.

MLAGA, K. G.; AGBOKA, K.; ATTIVI, K.; TONA, K.; OSSEYI, E. Assessment of the chemical characteristics and nutritional quality of meat from broiler chicken fed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. **Heliyon**, v. 8, n. 11, 2022.

MOHSIN, M.; ABBAS, R. Z.; YIN, G. Probiotics as therapeutic, antioxidant and immunomodulatory agents against poultry coccidiosis. **World's Poultry Science Journal**, v. 77, n. 2, p. 331–345, 2021.

MOSLEHI-JENABIAN, S.; LINDEGAARD, L.; JESPERSEN, L. Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. **Nutrients**, v. 2, n. 4, p. 449–473, 2010.

MUNYAKA, P. M.; ECHEVERRY, H.; YITBAREK, A.; CAMELO-JAIMES, G.; SHARIF, S.; GUENTER, W.; HOUSE, J. D.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2164–2172, 2012.

NARI, N.; GHASEMI, H. A.; HAJKHODADADI, I.; FARAHANI, A. H. K. 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.

NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S. C. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 2, p. 300–310, 2009.

NIE, X.; XING, Y.; LI, Q.; GAO, F.; WANG, S.; LIU, P.; LI, X.; TAN, Z.; WANG, P.; SHI, H. ARTP mutagenesis promotes selenium accumulation in *Saccharomyces boulardii*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 168, p. 113916, 2022.

OGBUAGU, N. E.; ALUWONG, T.; AYO, J. O.; SUMANU, V. O. Effect of fisetin and probiotic supplementation on erythrocyte osmotic fragility, malondialdehyde concentration and superoxide dismutase activity in broiler chickens exposed to heat stress. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 12, p. 1895–1900, 2018.

OKRATHOK, S.; SIRISOPAPONG, M.; MERMILLOD, P.; KHEMPAKA, S. Modified dietary fiber from cassava pulp affects the cecal microbial population, short-chain fatty acid, and ammonia production in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 102, n. 1, p. 102265, 2023.

PAIS, P.; ALMEIDA, V.; YILMAZ, M.; TEIXEIRA, M. C. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 78, 2020.

PARAPOULI, M.; VASILEIADIS, A.; AFENDRA, A.-S.; HATZILOUKAS, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1–31, 2020.

PEDROSO, A. A.; MAURER, J. J.; DLUGOLENSKI, D.; LEE, M. D. Embryonic chicks may possess na intestinal bacterial community within the egg. **American Society for Microbiology General Meeting**, 2008.

POLYCARPO, G. V.; ANDRETTA, I.; KIPPER, M.; CRUZ-POLYCARPO, V. C.; DADALT, J. C.; RODRIGUES, P. H. M.; ALBUQUERQUE, R. Meta-analytic study of organic acids as an alternative performance-enhancing feed additive to antibiotics for broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 10, p. 3645–3653, 2017.

POST, J.; REBEL, J.; TER HUURNE, A. Automated blood cell count: a sensitive and reliable method to study corticosterone-related stress in broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 591–595, 2003.

PUERTOLLANO, M. A; PUERTOLLANO, E.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G.; A. DE PABLO, M. Dietary Antioxidants: Immunity and Host Defense. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 14, p. 1752-1766, 2011.

QIN, C.; GONG, L.; ZHANG, X.; WANG, Y.; WANG, Y.; WANG, B.; LI, Y.; LI, W. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on gut microbiota modulation in broilers. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 358–366, 2018.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F, O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 590–596, 2012.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAFIQ, K.; HOSSAIN, M. T.; AHMED, R.; HASAN, M. D. M.; ISLAM, R.; HOSSSEN, M. D. I.; SHAHA, S. N.; ISLAM, M. R. Role of Different Growth Enhancers as Alternative to In-feed Antibiotics in Poultry Industry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 794588, 2022.

RAJPUT, I.R.; LI, L. Y.; XU, X.; WU, B. B.; JUAN, Z. L.; CUI, Z. W.; YU, D. Y.; LI, W. F. 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, Y. L.; XU, X.; HUANG, Y.; ZHI, W. C.; YU, D. Y.; LI, W. Supplementary effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on digestive enzyme activities, antioxidation capacity and blood homeostasis in broiler. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, n. 2, p- 231-237, 2013.

RINTTILÄ, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites - Implications for broiler chicken health and performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 647–658, 2013.

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; ROSSI, P.; ANCIUTI, M. A.; RUTZ, F.; XAVIER, E. G.; SILVA, S. S. Hematologia de frangos alimentados com dietas contendo aflatoxinas e adsorvente de toxinas. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 93–101, 2010.

ROSE, N.; BEAUDEAU, F.; DROUIN, P.; TOUX, J. Y.; ROSE, V.; COLIN, P. Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, n. 1, p. 9–20, 2000.

ROY, B. C.; RAY, B. C. Potentiality of *Saccharomyces cerevisiae* in replacing antibiotic growth promoters on growth, gut microbiology, histology, and serum antibody titers of commercial broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, p. 100352, 2023.

SCANES, C. G. Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. **Poultry Science**, v. 95, n. 9, p. 2208–2215, 2016.

SEBŐK, C.; TRÁJ, P.; VÖRÖSHÁZI, J.; MACKEI, M.; PAPP, M.; GÁLFI, M.; NEOGRÁDY, Z.; MÁTIS, G. Two Sides to Every Question: Attempts to Activate Chicken Innate Immunity in 2D and 3D Hepatic Cell Cultures. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1910, 2021.

SEN, S.; MANSELL, T. J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. **Fungal Genetics and Biology**, v. 137, p. 103333, 2020.

SHOJADOOST, B.; ALIZADEH, M.; BOODHOO, N.; ASTILL, J.; KARIMI, S. H.; DOOST, J. S.; TAHA-ABDELAZIZ, K.; KULKARNI, R.; SHARIF, S. Effects of

Treatment with Lactobacilli on Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 6, p. 1110–1129, 2022.

SHYNKARUK, T.; LONG, K.; LEBLANC, C.; SCHWEAN-LARDNER, K. Impact of stocking density on the welfare and productivity of broiler chickens reared to 34 d of age. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 32, n. 2, p. 100344, 2023.

SINGH, P.; KARIMI, A.; DEVENDRA, K.; WALDROUP, P. W.; CHO, K. K.; KWON, Y. M. Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 1, p. 272–276, 2013.

SOARES, B. A.; SÁGIO, S. A.; PECONICK, A. P.; BARRIOS, P. R.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; COSTA, G. M.; BARÇANTE, J. M. P.; MARTINS, N. R. S. Seleção, caracterização e clonagem dos genes *fljB* e *groEL* agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão do sistema imune inato das aves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 217–223, 2014.

SOUZA, H. F. DE; CAROSIA, M. F.; PINHEIRO, C.; CARVALHO, M. V.; OLIVEIRA, C. A. F.; KAMIMURA, E. S. On probiotic yeasts in food development: *Saccharomyces boulardii*, a trend. **Food Science and Technology**, v. 42, 2021.

SUMANU, V. O.; BYARUHANGA, C.; BOSMAN, A. M.; OCHAI, S. O.; NAIDOO, V.; OOSTHUIZEN, M. C.; CHAMUNORWA, J. P. Effects of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) and ascorbic acid on oxidative gene damage biomarker, heat shock protein 70 and interleukin 10 in broiler chickens exposed to heat stress. **Animal Gene**, v. 28, p. 200150, 2023.

SUN, Y.; RAJPUT, I. R.; ARAIN, M. A.; LI, Y.; BALOCH, D. M. Oral administration of *Saccharomyces boulardii* alters duodenal morphology, enzymatic activity and cytokine production response in broiler chickens. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 8, p. 1204–1211, 2017.

SUN, Z.; ZHEN, Y.; LI, T.; ASCHALEW, N. D.; WANG, T.; CHEN, X.; ZHAO, W.; ZHANG, X.; QIN, G. Yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and its active metabolites affect the cecal microbiome of broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 51, n. 6, p. 678–688, 2021.

TIAN, Y.; ZHANG, J.; LI, F.; WANG, A.; YANG, Z.; LI, J. X. Dietary supplementation with different alternative to in-feed antibiotic improves growth performance of broilers during specific phases. **Poultry Science**, v. 102, n. 10, p. 102919, 2023.

TOGHYANI, M.; TOGHYANI, M.; GHEISARI, A.; GHALAMKARI, G.; EGHBALSAIED, S. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. **Livestock Science**, v. 138, n. 1, p. 167–173, 2011.

UPADHAYA, S. D.; CHO, S. H.; CHUNG, T. K.; KIM, I. H. Anti-coccidial effect of essential oil blends and vitamin D on broiler chickens vaccinated with purified mixture of coccidian oocyst from *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. **Poultry Science**, v. 98, n. 7, p. 2919–2926, 2019.

VAN LIMBERGEN, T.; SARRAZIN, S.; CHANTZIARAS, I.; DEWEULF, J.; DUCATELLE, R.; KYRIAZAKIS, I.; MCMULLIN, P.; MÉNDEZ, J.; NIEMI, J. K.; PAPASOLOMONTOS, S.; SZELESZCZUK, P.; ERUM, J. V.; MAES, D. Risk factors for poor health and performance in European broiler production systems. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 287, 2020.

VILLANUEVA, R. A. M.; CHEN, Z. J. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. 2019.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PloS One**, v. 4, n. 10, 2009.

WANG, Y.; YANG, X.; LI, S.; WU, Q.; GUO, H.; WANG, H.; SU, A. Research Note: Heat stress affects immune and oxidative stress indices of the immune organs of broilers by changing the expressions of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily G member 2, sodium-dependent vitamin C transporter-2, and mitochondrial calcium uniporter. **Poultry Science**, v. 102, n. 8, p. 102814, 2023.

WANG, Y.; WU, Y.; WANG, Y.; XU, H.; MEI, X.; YU, D.; WANG, Y.; LI, W. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 521, 2017.

WEGNER, M.; KOKOSZYŃSKI, D.; KRAJEWSKI, K.; ŻUREK, A. Effect of vaccination program on immune response, production performance, and carcass composition of Ross 308 broiler chickens. **Poultry Science**, v. 102, n. 10, p. 102918, 2023.

WLAŻŁAK, S.; PIETRZAK, E.; BIESEK, J.; DUNISLAWSKA, A. Modulation of the immune system of chickens a key factor in maintaining poultry production - a review. **Poultry Science**, v. 102, n. 8, p. 102785, 2023.

YAN, L.; CHU, T.; ZHANG, Q.; BLOKKER, B., LV, Z.; GEREMIA, J.; BORTOLUZZI, C. Microbiome modulation by a precision biotic in broilers chickens: a commercial study validation. **Poultry Science**, v. 102, n. 5, p. 102596, 2023.

YU, H.; ZOU, W.; MI, C.; WANG, Q.; DAI, G.; ZHANG, T.; ZHANG, G.; XIE, K.; WANG, J. Y.; SHI, H. Research Note: Expression of T cell-related cytokines in chicken cecal and spleen tissues following *Eimeria tenella* infection in vivo. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101161, 2021.

YUAN, J.; ZHAO, F.; LIU, Y.; ZHANG, K.; TIAN, X.; MU, Y.; ZHAO, J.; WANG, Y. Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* on oxidative stress, mitophagy, and NLRP3 inflammasome activation in broiler breast meat. **Poultry Science**, v. 102, n. 12, p. 103128, 2023.

ZHANG, C.; ZHAO, X. H.; YANG, L.; CHEN, X. Y.; JIANG, R. S.; JIN, S. H.; GENG, Z. Y. Resveratrol alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, microflora, and barrier integrity in broilers. **Poultry Science**, v. 96, n. 12, p. 4325–4332, 2017.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHEN, W.; ZHU, T.; WANG, P.; GUO, F.; ZHANG, K.; ZHANG, T.; JALUKAR, S.; ZHANG, Y.; BAI, D.; ZHANG, C.; GUO, Y.; WANG, Z.; MA, Y. Effect of dietary *Saccharomyces*-derived prebiotic refined functional carbohydrates as antibiotic alternative on growth performance and intestinal health of broiler chickens reared in a commercial farm. **Poultry Science**, v. 102, n. 6, p. 102671, 2023.

ZHU, T.; CHEN, T.; CAO, Z.; ZHONG, S.; WEN, X.; MI, J.; MA, B.; ZOU, Y.; ZHANG, N.; LIAO, X.; WANG, Y.; WU, Y. Antibiotic resistance genes in layer farms and their correlation with environmental samples. **Poultry Science**, v. 100, n. 12, p. 101485, 2021.