

Efeito da influência de probiótico sobre a morfologia intestinal de codornas japonesas

Effect of influence of probiotic on the intestinal morphology of Japanese quail

Rafael BUENO¹; Ricardo de ALBUQUERQUE¹; Vinicius Diogo Azevedo MURAROLLI¹; Luisa Alejandra Hernandez AYA²; Ricardo da Silva RAPOSO³; Roberto de Andrade BORDIN⁴

¹Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, Brasil

²Universidad del Tolima, Colombia

³Universidade Estadual do Maringá, Maringá-PR, Brasil

⁴Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo-SP, Brasil

Resumo

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da suplementação de probiótico (*Bacillus subtilis* (3×10^8 UFC/g), *Aspergillus oryzae* (4×10^6 UFC/g) e *Saccharomyces cerevisiae* (2×10^8 UFC/g) sobre a morfologia intestinal de codornas japonesas. Foram utilizadas 400 pintainhas, criadas até 35 dias de idade, em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos: controle e probiótico, três repetições/tratamento. Aos sete, 21 e 35 dias de idade foram coletados fragmentos do duodeno das aves para obtenção dos seguintes parâmetros: altura de vilos; profundidade de criptas; número de células caliciformes, e relação vilo/cripta. O probiótico, quando adicionado à dieta, causou no parâmetro profundidade de cripta efeito de interação (probiótico/dia) aos 35 dias de idade, apresentando menor valor. Para altura de vilos e número de células caliciformes, não houve efeito do aditivo, apenas efeito linear (do tempo). Quanto à relação vilo/cripta, não se obteve significância para os tratamentos testados, apenas efeito quadrático em função do tempo.

Palavras-chave: Aditivo. Aves. Duodeno. Morfometria.

Abstract

The present study was to evaluate the influence of supplementation of probiotics (*Bacillus subtilis* (3×10^8 UFC/g), *Aspergillus oryzae* (4×10^6 UFC/g) and *Saccharomyces cerevisiae* (2×10^8 UFC/g) on the intestinal morphology of Japanese quail. 400 chicks were used in place until 35 days of age, in a completely randomized design with 2 treatments: control and probiotic, 3 replicates/treatment. At 07, 21, 35 days old were collected fragments of the duodenum of birds to obtain the following parameters height of villi, depth of crypts, number of goblet cells; relationship villus/crypt. The probiotic in addition to the diet resulted in parameter crypt depth of the interaction effect (probiotic / day) at 35 days of age, showing lower value. For height of villi and number of goblet cells no effect of the additive, only the linear effect (time). In the ratio villus/crypt significance is not obtained for the treatments tested only quadratic effect due to time.

Keywords: Additive. Birds. Duodenum. Morphometry.

Introdução

Na eclosão, o sistema digestório da ave está anatomicamente completo, mas a capacidade funcional não. Portanto, o trato intestinal sofrerá grandes alterações fisiológicas. Essas alterações irão proporcionar aumento na área de superfície, viabilizando a digestão e absorção¹. Os processos de absorção são totalmente dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal. A integridade das células que a compõem é de fundamental importância para a absorção dos nutrientes².

A mucosa intestinal é constituída por células denominadas: enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. A maturação dos enterócitos ocorre durante o processo de migração da cripta para a ponta do vilo, portanto, quanto maior o número de

Correspondência para:

Rafael Bueno

Avenida Duque de Caxias Norte, 225, Campus USP, Depto. VNP

CEP: 13635-9000. Pirassununga-SP

e-mail: rbueno13@usp.br

Recebido em: 21/05/2009

Aprovado em: 18/04/2012

células, maior o tamanho do vilos e, por consequência, maior a área de absorção^{3,4}.

O desenvolvimento da mucosa é estimulado por agentes tróficos, que estimulam o processo mitótico na região cripta-vilos e aumentam o número de células e tamanho do vilos^{3,5}. Primariamente, há dois eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação das células tetopotentes localizadas na cripta e ao longo dos vilos) e perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos^{5,6}.

O equilíbrio entre os dois processos (perda e proliferação celular) determina um *turnover* (proliferação – migração – extrusão) e assegura a manutenção do número de células e da capacidade funcional do epitélio. No entanto, quando o intestino responde a algum agente estimulador a favor de um deles, deve ocorrer uma modificação na altura dos vilos^{6,7}.

Nos vilos e criptas estão presentes as células caliciformes secretoras de muco, importantes na manutenção e desenvolvimento do epitélio intestinal. As células caliciformes protegem o epitélio durante os pro-

cessos digestivos, possuem poder lubrificante sobre os alimentos sólidos e funcionam como uma barreira protetora impedindo o contato de microrganismos com as células epiteliais².

O objetivo do presente trabalho é avaliar a influência da suplementação de probiótico sobre a morfologia intestinal de codornas japonesas.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido entre os meses de setembro e outubro de 2008, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga, São Paulo.

A dieta basal isonutritiva (milho e farelo de soja) seguiu os níveis nutricionais rotineiramente empregados na criação comercial de codornas japonesas.

A ração (Tabela 1) manteve os mesmos níveis de proteína e energia durante o desenvolvimento, para atender as exigências nutricionais referentes à fase inicial de criação (01 a 35 dias).

A quantidade de probiótico utilizado foi de 1 kg/t de ração, recomendação do fabricante segundo o rótulo

Tabela 1 - Composição Percentual e Análise Calculada da Ração Experimental

Ingredientes	Ração Inicial (%)	Ração Inicial (%)
<i>Dieta basal</i>		
Milho	56,3	56,3
Farelo de Soja	36,3	36,3
Óleo de Soja	1	1
Sal	0,35	0,35
Calcário	0,15	0,15
Farinha de Carne	5,30	5,30
Suplemento Vit.-Min. ¹	0,60	0,60
<i>Aditivos</i>		
Probiótico	0,10	-
<i>Inerte</i>		
	-	0,10
Total	100	100
<i>Análise Calculada</i>		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2950	2950
Proteína Bruta (PB%)	24,0	24,0
Cálcio (Ca%)	1,0	1,0
Fósforo disponível (P%)	0,4	0,4

do produto. A fórmula segue os padrões de exigência e consumo determinados⁸. A ração foi fornecida *ad libitum* durante todo período de criação.

Foram utilizadas 400 aves, alojadas em um delineamento inteiramente casualizado e distribuídas em dois tratamentos: probiótico e controle. Havia três repetições/tratamento, o grupo controle era composto apenas da dieta basal sem qualquer aditivo promotor de crescimento. O probiótico tinha como princípio ativo o *Bacillus subtilis* (3×10^8), *Saccharomyces cerevisiae* (2×10^8) e *Aspergillus oryzae* (4×10^6), adicionado à dieta na dose de 1 kg/t. de ração durante a fase de criação.

O aditivo foi utilizado conforme as recomendações do fabricante e adicionado em substituição ao equivalente em peso de material inerte (caolim), ajustando-se as composições percentuais da ração experimental. Não foi adicionado à ração nenhum tipo de anticoccidiano, qualquer outra droga ou aditivo que não os em estudo.

Aos sete, 21 e 35 dias de idade, seis aves aleatoriamente foram abatidas (uma ave de cada repetição), por deslocamento cervical, e coletados fragmentos do duodeno para análise da morfologia intestinal através da microscopia de luz. O duodeno é fração de maior relevância na inter-relação – nutrição e fisiologia digestória nas aves comerciais.

Os fragmentos foram coletados, lavados e fixados em formol a 10% por 24 horas. Após fixação, foram desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes de (70 a 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Posteriormente, foi preparada uma lâmina com o segmento de duodeno de cada animal. Em cada lâmina havia quatro cortes semi-seriados com seis micrometros de espessura e corados pelo método de rotina hematoxilina/eosina (H&E), para posterior descrição e documentação.

A contagem das células caliciformes foi realizada através do microscópio óptico num aumento de 40 vezes e utilizou-se um contador digital. Foi feita a contagem do total de células de 10 vilos/lâmina.

A morfometria para altura de vilos, profundidade de criptas e relação vilos/cripta foi realizada através do microscópio óptico (Nikon Eclipse E800) com câmera (Nikon FDX35), integrado ao software (Image-Pro plus). Foram mensurados 20 vilos/lâmina, totalizando 360 vilos divididos em 18 lâminas.

A contagem das células caliciformes foi realizada através do microscópio óptico (Nikon YS100) num aumento de 40 vezes e utilizou-se um contador digital. Foi feita a contagem do total de células de 10 vilos/lâmina, totalizando 180 vilos divididos em 18 lâminas.

Obteve-se a partir dos valores encontrados uma média aritmética simples do segmento referente a cada animal para: altura de vilos; profundidade de cripta; número de células caliciformes e relação vilos/cripta.

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa computacional *Statistical Analysis System*⁹. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo, dois tratamentos (com ou sem probiótico). Os dados referentes às variáveis analisadas foram submetidos ao PROC MIXED, sendo considerado como efeito significativo o nível de até 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os valores referentes aos parâmetros de morfologia intestinal estão apresentados na tabela 2. Quanto ao parâmetro profundidade de cripta, observou-se um efeito significativo ($P < 0,05$) da interação (probiótico/dia) aos 35 dias de idade, em que a adição do mesmo na dieta causou um menor comprimento na profundidade de cripta no duodeno em relação ao controle. Para os outros parâmetros morfológicos (altura de vilos, relação vilos/cripta e número de células caliciformes), não foi observado efeito estatístico do aditivo no primeiro segmento intestinal (duodeno).

Os resultados encontrados por Furlan, Macari e Luquetti¹⁰ discordam do presente trabalho. Os autores

Tabela 2 – Médias de altura de vilos, profundidade de cripta, relação vilos/cripta e número de células caliciformes de codornas japonesas nos intervalos 07, 21 e 35 dias de idade, sob diferentes tratamentos. Parâmetros obtidos durante a condução do experimento, realizado entre os meses de setembro e outubro de 2008, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)
	Controle	Probiótico	
07 dias			
Alt. de vilos (mm)	717,98	676,98	12,08
Prof. de cripta (mm)	42,60a	49,30a	13,63
Rel. vilos/cripta	16,84	13,72	11,41
Nº de cél. caliciformes	38,03	34,80	9,15
21 dias			
Alt. de vilos (mm)	907,37	981,58	11,49
Prof. de cripta (mm)	46,99a	53,41a	18,81
Rel. vilos/cripta	19,30	19,06	16,86
Nº de cél. caliciformes	41,03	45,76	10,04
35 dias			
Alt. de vilos (mm)	915,04	1012,52	19,93
Prof. de cripta (mm)	78,95a	60,89b	14,30
Rel. vilos/cripta	11,55	16,67	27,57
Nº de cél. caliciformes	57,20	59,20	10,85

CV%: (Coeficiente de Variação)

relatam que altas profundidades de cripta indicam alta atividade proliferativa celular que pode ocorrer não somente devido a um efeito trófico de um ingrediente da dieta, mas também devido a alguma injúria da mucosa por processo inflamatório. Neste último caso, a finalidade é renovar perdas demasiadas na altura de vilos.

Utiyama¹¹ afirma que a maior profundidade de cripta é consequência da maior atividade proliferativa celular para garantir adequada taxa de renovação celular e garantir a reposição das perdas de células da região apical dos vilos. Como no presente estudo, a menor profundidade de cripta do grupo probiótico não aparece acompanhada de maior altura de vilos, não se pode inferir que essa menor profundidade indique um *turnover* de células epiteliais com o uso do aditivo. O menor *turnover* resulta na melhor utilização dos ingredientes na dieta. O aumento do número de células caliciformes pode não ser indicativo apenas de efeito trófico da dieta, mas também

pode representar um mecanismo de proteção contra danos causados ao epitélio intestinal. Murarolli¹ também observou no parâmetro de profundidade de cripta efeito significativo do probiótico no duodeno. Quanto aos demais parâmetros (altura de vilos, relação vilos/cripta e número de células caliciformes), não foram observados efeitos do aditivo no fragmento estudado.

Os resultados encontrados por Nunes¹² discordam dos encontrados no presente estudo. Este autor adicionou prebiótico e probiótico na dieta de frangos de corte, e não encontrou nenhum efeito positivo sobre qualquer parâmetro morfológico que avaliou. Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado vantagens no uso desse aditivo nos parâmetros avaliados de morfologia intestinal.

Pelicano et al.¹³, ao estudarem a suplementação de dois probióticos e dois prebióticos sobre a morfologia intestinal, observaram que tanto os probióticos como os prebióticos apresentaram maior altura de vilos nos

três segmentos e maior comprimento de cripta no duodeno e no jejuno em relação ao controle.

Conclusão

Nas presentes condições experimentais, mesmo com a ausência de desafios sanitários, observou-se efeito trófico no parâmetro profundidade de cripta das codornas ao adicionar probiótico na dieta. Os demais parâmetros morfológicos pesquisados (altura de

vilo, relação vilo/cripta e número de células calciformes) não apresentaram efeito estatística.

Agradecimentos

Às empresas Biogenic Group, pelo fornecimento do produto testado, Granja Dois Irmãos, pelo fornecimento da ração utilizada e Granja Fujikura, pelo fornecimento das codornas utilizadas.

Referências

- MACARI, M.; FURLAN, R. L. Probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2005, Santos, São Paulo. **Anais...** Campinas: FACTA, 2005. v. 1, p. 53-71.
- MURAROLLI, V. D. A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte.** 2008. 101 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP., 2008.
- MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2000, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. v. 2, p. 455-457.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPOSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MÁTRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriú, Santa Catarina. **Anais...** Balneário Camboriú, 2004. p. 6-28.
- MAIORKA, A. Adaptações digestivas pós-eclosão. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2001, Santos, São Paulo. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001. v.2, 141-151.
- UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Development of the small intestine in heavy and light starin chickens before and after hatching. **British Poultry Science**, v. 36, n. 1, p. 63-71, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. **Nutrient requirements of poultry.** 9. ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1994. 155 p.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.** Jaboticabal: FUNESP/UNESP, 1994. 296 p.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics.** Version 9.1.3. Cary: SAS, 2004.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPOSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MÁTRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriú, Santa Catarina. **Anais...** Balneário Camboriú, 2004. p. 6-28.
- UTIYAMA, C. E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém desmamados.** 2004. 110 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- NUNES, A. D. **Influência do uso de aditivos alternativos a antimicrobianos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte.** 2008. 111 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; FIGUEIREDO, D. F.; BOIAGO, M. M.; CARVALHO, S. R.; BORDON, V. F. Intestinal mucosa development in broiler chickens fes natural growth promoters. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 4, p. 221-229, 2005.