



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAMILA FALCHETTI DAMASCO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ÍLEO DE RATOS WISTAR
SUPLEMENTADOS COM OVOPRODUTOS**

Londrina
2019

KAMILA FALCHETTI DAMASCO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ÍLEO DE RATOS WISTAR
SUPLEMENTADOS COM OVOPRODUTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

D155a Damasco, Kamila Falchetti.

Análise histológica do íleo de ratos Wistar suplementados com ovoprodutos / Kamila Falchetti Damasco. - Londrina, 2019.
50 f. : il.

Orientador: Emerson José Venancio.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Placas de Peyer - Tese. 2. Íleo - Tese. 3. Ovoproduto - Tese. 4. Organismo saudável - Tese. I. Venancio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 577.27

KAMILA FALCHETTI DAMASCO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ÍLEO DE RATOS WISTAR
SUPLEMENTADOS COM OVOPRODUTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eduardo Vignoto Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 06 de agosto de 2019.

A Deus, que me deu a vida e a perseverança para alcançar essa conquista.

A minha família, que sempre apoiou e incentivou o meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, família e consumação dessa etapa que se finda.

A minha família. Pai, mãe, irmão e esposo pelo apoio, incentivo, amor, carinho e compreensão.

Ao prof. Dr. Emerson José Venâncio da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade e orientação.

Aos Profs. Drs. Cláudio Takeo Ueno e Lyssa Setsuko Sakanaka da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelos ensinamentos e auxílio durante o uso do *spray dryer*.

A Prof^a Dr^a. Carla Cristiani da Silva e Dr^a Miriele Caroline da Silva pelo apoio e revisão desse projeto.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato pelo fornecimento da bactéria *Salmonella Typhimurium*.

A Prof^a Dr^a. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira por me permitir realizar as análises microbiológicas em seu laboratório de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alexandre Oba e Tânia Mara Sedemaka Pinheiro por me permitir e me auxiliar na realização da composição centesimal dos ovoprodutos.

A Msc. Camila Basso pela amizade, ajuda com a coleta tecidual dos animais e processamento histológico das peças.

A Msc. Patrícia Canteri de Souza e colegas do laboratório Juliana Gutschow Gameiro e Aline Miquelin do Nascimento pelo companheirismo e ajuda com a coleta tecidual dos animais.

A Thaysa Amélia Bortoloti Fernandes da UTFPR pela amizade e ajuda com a secagem dos ovos.

A Universidade Estadual de Londrina, Programa de Patologia Experimental e professores pela oportunidade, ensinamentos e discussões.

A CAPES pela bolsa recebida.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento desse projeto.

*“Não coloque limites em seus sonhos,
coloque fé!”* (Autor desconhecido).

DAMASCO, Kamila Falchetti. **Análise histológica do íleo de ratos *Wistar* suplementados com ovoprodutos**. 2019. 50 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, 2019.

RESUMO

O íleo e suas placas de Peyer (PPs) fazem parte do tecido linfoide associado ao intestino (GALT), um componente do tecido linfoide associado à mucosa que pode ser subdividido em GALT indutor e GALT efetor. O primeiro induz a resposta imune local e, o segundo protege o intestino contra a invasão microbiana. Apesar disso, o trato intestinal representa uma importante porta de entrada de patógenos. Nesse contexto, a IgY, imunoglobulina presente na gema de ovos, vem sendo investigada. Alguns estudos relataram que os anticorpos IgY têm a capacidade de aumentar a relação da altura das vilosidades e profundidade das criptas, reduzir a quantidade de microrganismos patogênicos, reduzir a quantidade de folículos linfoides jejunais e linfócitos T nas PPs e, estimular a produção de anticorpos contra a IgY. Diante do potencial antimicrobiano e imunomodulador da IgY e, da rica composição nutricional dos ovos integrais, empresas alimentícias têm investido na comercialização de ovoprodutos. Estes, segundo os fabricantes, são constituídos de pó de ovo e caracterizados como suplementos dietéticos hiperimunes. No entanto, os efeitos da sua administração a organismos saudáveis ainda é desconhecido. Diante disso, o objetivo desse estudo foi analisar os efeitos da administração oral de dois ovoprodutos sobre o íleo e PPs de ratos *Wistar* fêmeas saudáveis. Como controle foram utilizados ovos comerciais não hiperimunes secos por spray drying. Ambos os ovoprodutos e os ovos comerciais foram avaliados quanto a composição centesimal, o perfil proteico, a presença e reatividade dos anticorpos IgY e a qualidade microbiológica. Os ratos *Wistar* saudáveis foram alimentados pela via oral com 13 mg dos ovoprodutos ou 0,5 mL de PBS durante 14 dias e, induzidos a eutanásia. Após a laparotomia, foram quantificadas as PPs do íleo dos animais e coletados uma placa de Peyer e 1,5 cm do íleo de cada animal. As fezes coletadas antes e depois da suplementação foram processadas para a análise da presença de IgA anti-IgY e os tecidos coletados para a análise morfométrica. Os resultados obtidos demonstraram que os ovoprodutos contemplam as características descritas pelos fabricantes. A suplementação com os ovoprodutos não alterou a espessura das camadas do íleo. O ovoproduto 1 e o ovo comercial aumentaram a quantidade de folículos linfoides nas PPs e a IgY não foi imunogênica ao modelo experimental utilizado. Portanto, a suplementação alimentar via oral de ratos *Wistar* saudáveis com os ovoprodutos não causou prejuízos ao íleo e a suplementação com os ovoproduto 1 e o ovo comercial imunoestimulou as PPs do íleo dos animais.

Palavras-chave: Imunoglobulina Y. Intestino delgado. Imunomodulação. Organismo sadio.

DAMASCO, Kamila Falchetti. **Histological analysis of the ileum of *Wistar* rats supplemented with egg products**. 2019. 50 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, 2019.

ABSTRACT

The ileum and its Peyer's patches (PPs) are part of the gut-associated lymphoid tissue (GALT), a component of mucosal-associated lymphoid tissue that can be subdivided into inducing and effector GALT. The first induces the local immune response and the second protects the intestines against microbial invasion. Nevertheless, the gastrointestinal tract represents an important gateway for pathogens. In this context, IgY, an immunoglobulin present in egg yolk, has been investigated. Some studies show that IgY antibodies have the ability to increase villus height and crypt depth ratio, reduce the amount of pathogenic microorganisms, reduce the amount of jejunal lymphoid follicles and T lymphocytes in PPs, and stimulate antibodies production against IgY. Given IgY's antimicrobial and immunomodulatory potential and the rich nutritional composition of whole eggs, food companies have invested in the marketing of egg products. These, according to the manufacturers, are made of egg powder and characterized as hyperimmune dietary supplements. However, the effects of their administration to healthy organisms is still unknown. Therefore, the aim of this study was to analyze the effects of oral administration of two egg products on the ileum and PPs of healthy female Wistar rats. As a control non-hyperimmune commercial eggs were spray dried. Both egg products and commercial eggs were evaluated for centesimal composition, protein profile, presence and reactivity of IgY antibodies and microbiological quality. Healthy Wistar rats were orally fed 13 mg of egg products or 0,5 mL PBS for 14 days and induced by euthanasia. After laparotomy, the ileum PPs of the animals were quantified and a Peyer plate and 1,5 cm of the ileum of each animal were collected. The feces collected before and after supplementation were processed for the analysis of the presence of anti-IgY IgA and the tissues collected for morphometric analysis. The results showed that egg products meet the characteristics described by the manufacturers. Supplementation with egg products did not change the thickness of the ileum layers. Egg product 1 and commercial egg increased the amount of lymphoid follicles in PPs and IgY was not immunogenic to the experimental model used. Therefore, oral feeding supplementation of healthy Wistar rats with egg products did not cause damage to the ileum and supplementation with egg products 1 and the commercial egg immunostimulated the ileum PPs of the animals.

Key words: Immunoglobulin Y. Small intestine. Immunomodulation. Healthy organism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração dos componentes do GALT indutor e GALT efetor.....13

Artigo

Figura 1 – Ilustração cronológica dos eventos experimentais realizados *in vivo*.....40

Figura 2 – Avaliação morfométrica da parede do íleo41

Figura 3 – Avaliação histológica dos folículos linfoides42

Figura 4 – Perfil proteico dos ovoprodutos e ovo comercial.....43

Figura 5 – Imunodeteção da IgY44

Figura 6 – Reatividade da IgY contra *S. Typhimurium*45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal dos ovoprodutos e ovo comercial.....	46
Tabela 2 – Análise microbiológica dos ovoprodutos e ovo comercial	47
Tabela 3 – Análise morfométrica das PPs do íleo dos animais.....	48
Tabela 4 – Análise morfométrica do íleo dos animais.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAF	<i>Cytokine Activator Factor</i>
CIF	<i>Cytokine Inhibitor Factor</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
IL	Interleucina
LB	Linfócitos B
LIE	Linfócitos Intraepiteliais
LNMs	Linfonodos mesentéricos
LT	Linfócitos T
M	Células micropreguiadas
NMP/g	Número Mais Provável/grama
Ovo c.	Ovo comercial seco <i>in-house</i>
P.M.	Peso Molecular
P1	Ovoproduto 1
P2	Ovoproduto 2
PPs	Placas de Peyer
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia/grama
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	ARTIGO: Análise histológica do íleo de ratos Wistar suplementados com ovoprodutos	25
3.1	INTRODUÇÃO	25
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.2.1	Obtenção Do Ovo Comercial Não Hiperimune Desidratado.....	27
3.2.2	Composição Centesimal Dos Ovoprodutos E Ovo Comercial	27
3.2.3	Eletroforese Em Gel De Poliacrilamida E Western Blotting	27
3.2.4	Elisa Indireto.....	28
3.2.5	Análise Microbiológica	28
3.2.6	Delineamento Experimental Dos Animais.....	28
3.2.7	Análise Morfométrica Da Parede Do Íleo E PPs.....	29
3.2.8	IgA Fecal Anti-IgY.....	29
3.2.9	Análise Estatística	29
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.3.1	Ovo Comercial Desidratado in-house	30
3.3.2	Análise Química Dos Ovoprodutos E Ovo Comercial.....	30
3.3.3	Perfil Proteico	30
3.3.4	Detecção Da IgY	31
3.3.5	Análise Da Reatividade Da IgY	31
3.3.6	Análise De Microrganismos Indicadores.....	31
3.3.7	Morfometria Das PPs Do Íleo Dos Animais	32
3.3.8	IgA Anti-IgY	33
3.3.9	Morfometria Intestinal Da Parede Do Íleo Dos Animais.....	33
	Referências	34
4	CONCLUSÃO GERAL	50

1 INTRODUÇÃO

A disbiose intestinal e sua relação com o desenvolvimento de distúrbios intestinais e/ou sistêmicos assim como a resistência bacteriana frente à antibioticoterapia têm estimulado a busca de medidas preventivas e/ou terapêuticas alternativas às alterações intestinais. Nesse contexto, empresas alimentícias têm investido na comercialização de ovos hiperimunes em pó dotados, segundo os fabricantes, de anticorpos IgY específicos contra 26 cepas bacterianas. Anticorpos IgY, quando administrados por via oral em animais, têm como objetivo neutralizar e eliminar as bactérias patogênicas, melhorar a integridade do epitélio intestinal e a responsividade do sistema imunológico local. Apesar disso, os efeitos da sua administração a organismos saudáveis ainda é desconhecido. Alguns estudos sugerem que a IgY quando administrada por via oral pode ser imunogênica. Diante disso e do fato que a ativação da resposta imune local pode ser protetiva ou danosa ao trato intestinal o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da administração oral de dois ovoprodutos sobre o íleo e placas de Peyer de ratos *Wistar* fêmeas saudáveis.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O íleo e suas placas de Peyer (PPs) são indicadores sensíveis à suplementação alimentar com compostos de efeitos locais (Elmore, 2006). Eles fazem parte do tecido linfoide associado ao intestino (GALT), um componente do tecido linfoide associado à mucosa que pode ser subdividido segundo as suas funções em GALT indutor e GALT efetor (WERSHIL; FURUTA, 2008). O íleo assim como todo o intestino contém as células efetoras do GALT, os linfócitos intraepiteliais (LIE) e leucócitos da lâmina própria, ambos presentes na mucosa intestinal e responsáveis pela proteção contra a invasão microbiana. As PPs, assim como os folículos linfoides isolados e os linfonodos mesentéricos (LNMs), fazem parte do GALT indutor. Eles propiciam o contato direto dos antígenos luminiais com as células de defesa, linfócitos T e B virgens, e consequente ativação da resposta imune local (WERSHIL; FURUTA, 2008) (Figura 1).

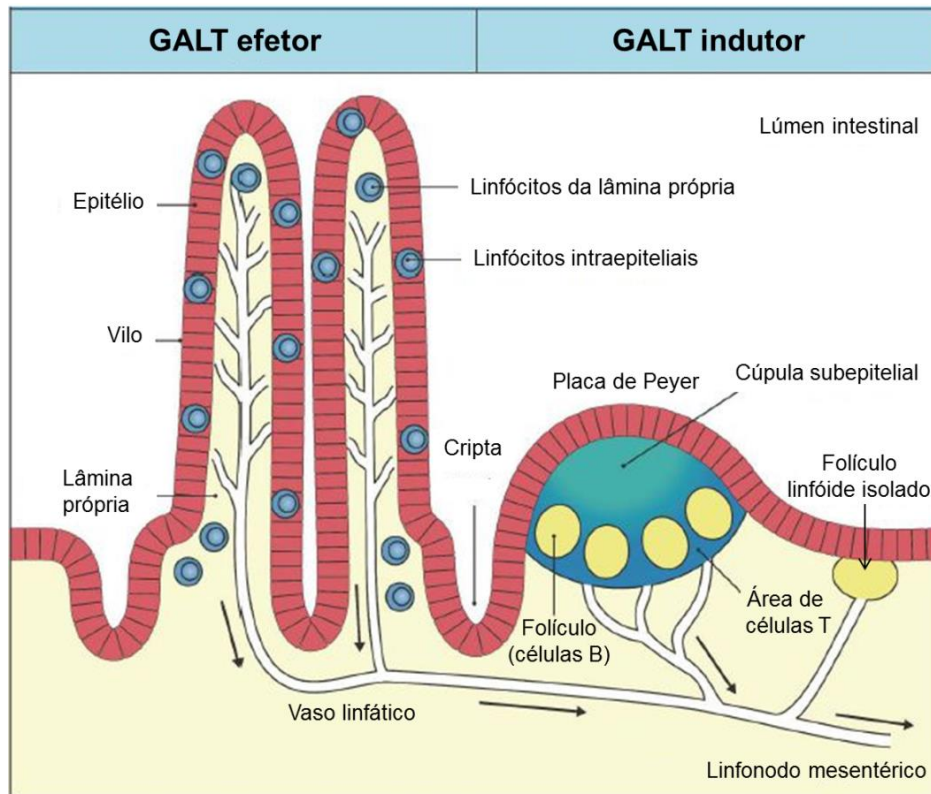


Figura 1 Ilustração dos componentes do GALT indutor e GALT efetor. Fonte: Adaptado de Murphy, Travers e Walport (2010).

A primeira camada do intestino, a mucosa, é constituída de um epitélio intestinal, lâmina própria e fibras musculares. O epitélio compreende uma camada única de células, adjacente ao lúmen intestinal. É constituído de enterócitos, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas, células micropreguiadas (células M) e LIE. Esse conjunto de células é responsável pela digestão e absorção nutricional além da proteção local contra antígenos luminiais (BOWCUTT, 2014). Os LIE compreendem uma subpopulação de células T constituída predominantemente de células $CD8^+$, possuem grânulos intracelulares citotóxicos e quando estimulados secretam citocinas pró ou anti-inflamatórias (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2011). Eles situam-se na superfície basolateral dos enterócitos e fenotipicamente podem ser subdivididos em LIE convencionais e LIE não convencionais. Os primeiros são funcionalmente descritos como capazes de destruir células infectadas e proteger contra patógenos intestinais e, os últimos para a destruição de células estressadas e danificadas contribuindo para a manutenção da função da barreira epitelial (MURPHY, 2014, ORIÁ; BRITO, 2016).

A lâmina própria se encontra adjacente ao epitélio intestinal, é constituída de tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e representa um

importante local para as respostas imunes indutoras e efetoras. Na lâmina própria intestinal são encontradas as PPs e os leucócitos efetores. Os mastócitos, macrófagos e células dendríticas são responsáveis pela resposta imune inata e os LB, plasmócitos e LT CD4⁺ e CD8⁺ pela resposta imune adquirida. A ação conjunta dessas células determinam a resposta imune local e subsequente estado de saúde intestinal e sistêmico (ORIÁ; BRITO, 2016).

A muscular da mucosa, situada adjacente à lâmina própria, é constituída de musculatura lisa e subdividida em muscular interna e muscular externa cujas funções incluem movimentar a mucosa aumentando o contato do alimento com o epitélio e impulsionar a linfa à submucosa (GARTNER; HIATT, 1999). Adjacente à mucosa se encontra a camada submucosa. Ela é constituída de tecido conjuntivo denso não modelado, gânglios nervosos e vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pelo movimento da muscular da mucosa, secreção glandular e irrigação sanguínea e linfática. Sequencialmente, existe a camada muscular que também é subdividida em muscular interna e externa e suas funções incluem misturar e deslocar o quimo em direção ao ânus. Além disso, o íleo é revestido externamente de serosa, uma camada de mesotélio e tecido conjuntivo que impede o atrito entre os órgãos (ORIÁ; BRITO, 2016).

As PPs, constituinte do GALT indutor, compreendem aglomerados celulares dispostos na lâmina própria da mucosa e submucosa do intestino delgado. Não são encapsuladas e histologicamente são compostas por regiões de epitélio associado ao folículo, cúpula subepitelial e áreas folicular e interfolicular. O epitélio associado ao folículo é constituído de enterócitos, células M e LIE. Na cúpula subepitelial são encontradas as células apresentadoras de antígenos, e na região interfolicular os linfócitos T (LT), macrófagos e células dendríticas. A região folicular apresenta folículos linfoides primários ou secundários que são caracterizados pela ausência ou presença de centros germinativos. Ambos os folículos são dotados de células dendríticas e células T foliculares, com o predomínio de linfócitos B (LB) virgens nos folículos primários e, LB ativados nos folículos secundários (MOWAT, 2003). Dessa forma, a estrutura celular das PPs permite a aquisição de material luminal intacto como antígenos particulados e microrganismos (SIEBERS; FINLAY, 1996), o reconhecimento e apresentação destes aos LB e LT e, o estímulo para ativação ou tolerância das respostas imunológicas (JUNG; HUGOT; BARREAU, 2010).

Os folículos linfoides isolados localizam-se na lâmina própria dos intestinos delgado e grosso, não são encapsulados e histologicamente compreendem folículos linfoides imaturos ou maduros (PARHAM, 2011; ORIÁ; BRITO, 2016). Os folículos imaturos são estimulados pela dieta e, celularmente compostos de células indutoras do tecido linfoide, células dendríticas e LB. Os folículos maduros são estimulados pela microbiota bacteriana e caracterizados pela presença de centros germinativos dotados de células dendríticas foliculares, LB, plasmócitos produtores de IgA e LT CD4⁺. Além disso, o epitélio adjacente ao folículo contém células M que são essenciais à absorção dos antígenos luminiais. Os folículos linfoides isolados são responsáveis pela resposta imune humoral local independente das células T (BUETTNER; LOCHNER, 2016).

Os LNMs encontram-se dispostos na rede de vasos linfáticos que drenam o intestino e PPs. Eles são encapsulados e subdivididos nas áreas cortical, paracortical e medular (PARHAM, 2011). A área cortical contém folículos linfoides primários e/ou secundários como as PPs. A área paracortical apresenta LT e as vênulas de endotélio alto que são importantes para a entrada de linfócitos do sangue periférico. A região medular é dividida em cordões medulares e seios medulares. Os cordões medulares são ricos em LB, LT, plasmócitos e macrófagos e, os seios medulares em macrófagos e endotélio (OVALLE; NARHIRNEY, 2014). Dessa forma, os linfonodos mesentéricos adquirem antígenos que penetraram a mucosa intestinal estimulando a ativação ou tolerância da resposta imunológica sistêmica e local (MURPHY, 2014).

Apesar da estrutura e composição do GALT para a proteção local, o trato intestinal representa uma importante porta de entrada de patógenos que podem induzir a lesão e inflamação intestinal, além da diminuição da absorção nutricional. Clinicamente, a diarreia e a perda de peso corporal são características comuns de determinadas infecções intestinais e, podem comprometer o desenvolvimento humano e animal, principalmente dos neonatos (LI et al., 2015; VEGA et al., 2011).

Além dos microrganismos patogênicos, os hábitos alimentares influenciam o estado de saúde intestinal. Dietas hiperlipídicas estimulam a produção e secreção de bile. Esta por sua vez, caracterizada como bactericida, pode reduzir a quantidade e diversidade da microbiota intestinal, um conjunto de microrganismos importante ao desenvolvimento estrutural e funcional normal do sistema imune da mucosa (SALONEN; VOS, 2014). Os microrganismos comensais são importantes à

formação de centros germinativos, proliferação dos linfócitos B e adequados níveis séricos e intestinais de imunoglobulinas (SALONEN; VOS, 2014, MURPHY, 2014). Além disso, a microbiota atua como barreira aos microrganismos patogênicos (SALONEN; VOS, 2014). Dessa forma, ao modificar a microbiota intestinal a dieta pode favorecer a instalação de microrganismos patogênicos e alterar o funcionamento do GALT (WALL et al., 2009).

Diante do potencial imunomodulador dos alimentos e da busca por medidas preventivas e/ou terapêuticas alternativas às alterações intestinais, a imunonutrição vem sendo investigada. A imunonutrição tem como objetivo fornecer, além de energia e substratos nutricionais, nutrientes específicos capazes de modular o sistema imunológico apoiando o estabelecimento da saúde (PIOVACARI et al., 2008). Os aminoácidos, como a glutamina, tem sido descritos como capazes de atenuar a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e a IL-8 e aumentar as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, assim como as concentrações de IgA, diante de um processo inflamatório (COEFFIER *et al.*, 2003; GERAIX *et al.*, 2014). Os ácidos graxos insaturados têm sido descritos para reduzir a proliferação de linfócitos T assim como a atividade das células *natural killer* (PABLO; CIENFUEGOS, 2000), contribuindo à supressão de uma resposta imune exacerbada e conseqüente proteção intestinal.

Nesse contexto, destaca-se o ovo, um alimento frequentemente utilizado, rico em moléculas antimicrobianas como a IgY, a lisozima e a ovotransferrina (RAHMAN et al., 2013; MÜLLER et al., 2015; THU et al., 2017). A IgY é uma imunoglobulina produzida em aves, homóloga à IgG de mamíferos cuja obtenção pela gema do ovo é menos invasiva do que a obtenção do sangue periférico como normalmente é feito na produção de anticorpos em mamíferos. Além disso, a IgY apresenta vantagens relacionadas à sua produção e suas características biológicas (MULLER et al., 2015). A quantidade de IgY produzida é grande quando comparada à produção de IgG em coelhos (SCHADE et al., 2005), e a manutenção das aves é de baixo custo. Quando administrada pela via oral em mamíferos não ativa o sistema complemento, não se liga ao fator reumatóide e receptores Fc presentes nas células de mamíferos. Portanto, não induz a resposta inflamatória (LI et al., 2015). Sua concentração na gema do ovo é de aproximadamente 100-150 mg e suas funções incluem a neutralização de microrganismos e toxinas no lúmen intestinal e, uma modulação do funcionamento

do GALT (MINE; KOVACS-NOLAN, 2002; LI et al., 2015).

Dentre os estudos que avaliam a ação antimicrobiana e o potencial imunomodulador da IgY sobre o GALT, Mahdavi *et al.* (2010) relataram que a ingestão de altas doses de IgY específicas e inespecíficas por galinhas infectadas com *Escherichia coli* aumentou a proporção da altura das vilosidades e profundidade das criptas e reduziu a quantidade do microrganismo ileal, reduziu a quantidade de células caliciformes e a concentração total de IgA sérica e IgA secretora jejunal. Além disso, a IgY específica reduziu a proporção de heterófilos/linfócitos na circulação sanguínea desses animais e reduziu a quantidade de folículos linfáticos jejunais, todos parâmetros alterados pela infecção. Assim, a IgY restaurou o epitélio, o que contribuiu para a digestibilidade, e exibiu efeitos anti-inflamatórios modificando direta e indiretamente o funcionamento do GALT (MAHDAVI et al., 2010). No estudo de Vulcano et al. (2014) a IgY específica quando administrada via oral à camundongos infectados com *E. coli* enteropatogênica, minimizou o desprendimento da membrana basal e vacuolização epitelial, ambos ocasionados pela infecção. Assim, a IgY específica reduziu a lesão intestinal.

Segundo Li *et al* (2016) os anticorpos IgY específicos e IgY inespecíficos aumentaram a taxa de sobrevivência de camundongos infectados com *Salmonella* Typhimurium em 40% e 20% respectivamente. Reduziram a inflamação e ulceração jejunal e o número de LT CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ na lâmina própria assim como a expressão de TNF- α , todos parâmetros aumentados pela infecção. De acordo com estes autores, a administração da IgY específica aos animais infectados também propiciou um ganho de peso corpóreo dos animais similarmente aos resultados encontrados nos animais do grupo controle e reduziu o percentual de LIE e linfócitos CD8⁺ nas PPs. Além disso, houve redução do IFN- γ , uma citocina pró-inflamatória e aumento da IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Dessa forma, ao reconhecer/ligar-se ao patógeno a IgY específica principalmente, alivia o estresse celular gerado pela superestimulação do sistema imune. Conseqüentemente, reduz os danos intestinais (LI et al., 2016).

Por outro lado, a administração de leite suplementado com gema de ovo enriquecida com IgY específica e IgY inespecífica à bezerros infectados com rotavírus bovino alterou o isotipo dos anticorpos secretados pelos plasmócitos presentes na lâmina própria duodenal e jejunal, de IgA e IgG1 para IgA e IgG2 (VEGA et al., 2011). Além disso, tanto a IgY específica como a inespecífica

aumentaram a quantidade de células secretoras de anticorpos na lâmina própria do intestino e linfonodos mesentéricos, embora efetivamente apenas a IgY específica protegeu os animais da diarreia causada pela infecção e propiciou um ganho de massa corporal similar aos animais do grupo controle. Assim, a IgY foi relevante à proteção da infecção porém, a resposta imune anti-inflamatória estimulada pela suplementação pode estar atrelada a outras moléculas imunomoduladoras da gema do ovo (VEGA et al., 2011).

Em outra investigação de Vega et al. (2012), os pesquisadores administraram a leitões leite suplementado com IgY específica e inespecífica semi-purificadas contra o rotavírus humano e a proteína recombinante VP6. Ambas as suplementações não afetaram o isotipo das células secretoras de anticorpos, mas reduziram a quantidade destas para IgA no duodeno. Apesar disso, apenas a IgY específica anti-rotavírus humano protegeu efetivamente os animais da diarreia causada pela infecção. Além disso, a IgY específica quando administrada via oral induziu a produção sérica de anticorpos IgG e local de IgG e IgA contra IgY. Apesar disso, sinais associados a alergia não foram observados. Dessa forma, a IgY específica preveniu o desenvolvimento dos sintomas clínicos da infecção causada pelo rotavírus e neste modelo experimental foi imunogênica. Apesar disso, a diminuição das células secretoras de anticorpos foi atrelada a ação de outros componentes da gema do ovo co-precipitados (VEGA et al., 2012).

Em outro estudo, a administração de leite suplementado com gema de ovo enriquecida com IgY específica a bezerros infectados com rotavírus bovino do grupo A teve influência sobre os tecidos linfoides sistêmicos e associados ao intestino (VEGA et al., 2015). A IgY específica reduziu a quantidade de células secretoras de anticorpos IgM e IgG1 no baço e induziu o aumento e troca de isotipo das células secretoras de anticorpos presentes nos linfonodos jejunais e ileo-cecais, nas placas de Peyer e na lamina própria duodenal e jejunal, de IgG1 e IgA para IgA e IgG2. Assim, ao neutralizar os vírus a IgY específica suprimiu parcialmente a resposta imune sistêmica. Porém, a imunomodulação das células secretoras de anticorpos foi associada, assim como relatado por Vega et al. (2011), à ação de outras moléculas presentes na gema do ovo (VEGA et al., 2015).

Com relação a estimulação da produção de anticorpos anti-IgY em animais tratados com IgY foi observado que a administração da IgY em solução ou encapsulada à porcos induziu a produção sérica de anticorpos IgA, IgG1 e IgG2 anti-

IgY (TORCHÉ et al., 2006).

Diante do potencial antimicrobiano e imunomodulador da IgY, componentes da gema e/ou completa composição nutricional dos ovos integrais empresas alimentícias têm investido na comercialização de ovoprodutos. Os produtos que visam prevenção e tratamento de doenças específicas como a *Ovalgen® DC, HP e RV* têm como finalidade a prevenção e tratamento contra *Streptococcus mutans*, o principal agente etiológico relacionado à cárie dental, a prevenção e tratamento de gastrite induzida por *Helicobacter pylori* e de doenças intestinais causadas pelo rotavírus humano (THU et al., 2017). Outros ovoprodutos objetivam por sua vez, estabelecer um equilíbrio global entre os sistemas, melhorar a integridade do epitélio intestinal e a responsividade do sistema imunológico local (MY WELLNESS JOURNEY, 2016; LEGACY FOR LIFE, 2016).

No presente estudo foram avaliados dois ovoprodutos (ovoproduto 1 e ovoproduto 2) que seguem a segunda linha de comercialização. Eles são constituídos de pó de ovo e caracterizados como suplementos dietéticos hiperimunes visto que agregam valor nutricional à dieta, contêm anticorpos IgY específicos contra 26 cepas bacterianas e, assim, reduzem o risco do desenvolvimento de doenças (FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2017; MY WELLNESS JOURNEY, 2016; LEGACY FOR LIFE, 2016). Eles visam estabelecer saúde intestinal e sistêmica baseado no equilíbrio entre bactérias patogênicas e a microbiota. Ao neutralizarem os patógenos ambos os ovoprodutos reduzem a adesão dos microrganismos à parede intestinal e o estresse inflamatório local permitindo o crescimento da microbiota (MY WELLNESS JOURNEY, 2016; LEGACY FOR LIFE, 2016).

O *pool* de anticorpos IgY específicos presente nos ovoprodutos, segundo os fabricantes, é o resultado da imunização de galinhas com vacina multivalente de microrganismos inativados. As cepas utilizadas para a imunização das aves compreendem as mais relevantes para o desequilíbrio do trato intestinal: *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (Aerobacter), *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus salavarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* tipo 1, 3,

5, 8, 12, 14, 18 e 22 (US 6803035, 2017).

Além disso, quando comparados a ovos de galinhas não imunizadas os ovoprodutos hiperimunes contém maiores quantidades de fatores ativadores e inibidores de citocinas denominados CAF e CIF. O CAF (*Cytokine Activator Factor*) se refere a proteínas que se encontram presente tanto na gema como na clara do ovo cujo peso molecular varia entre 6,7 kDa e 8,8 kDa e suas funções incluem o aumento da expressão de TNF- α , IL-1 β ou IL-6 ou a diminuição da expressão de TGF β (US 6420337 B1, 2000). De forma oposta, o CIF (*Cytokine Inhibitor Factor*) compreende substâncias não proteicas naturalmente encontradas na fração lipídica da gema do ovo que têm peso molecular inferior a 6 kDa. Entre as suas funções destacam-se a inibição da transcrição da expressão do RNA das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-2 (US 7083809 B2, 2003).

Portanto, os ovoprodutos compreendem uma mistura de imunoglobulinas e fatores imunorreguladores que potencialmente podem ter atividade imunomoduladora. Esta, segundo os fabricantes restaura o estabelecimento de um ambiente intestinal saudável em organismos infectados. No entanto, a sua ação sobre organismos saudáveis ainda é desconhecida. Diante disso, e da sua possível imunogenicidade, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da administração oral de dois ovoprodutos sobre o íleo e PPs de ratos *Wistar* fêmeas saudáveis.

REFERÊNCIAS

- BOWCUTT, R. et al. Heterogeneity across the murine small and large intestine. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.41, p.15216-15232, nov. 2014.
- BUETTNER, M.; LOCHNER, M. Development and function of secondary and tertiary lymphoid organs in the small intestine and the colon. **Frontiers in immunology**, v.7, n.342, p.1-11, set. 2016.
- CARLANDER, D; WILHELMSON, M; LARSSON, A. Immunoglobulin Y levels in egg yolk from three chicken genotypes. **Food and Agricultural Immunology**, v. 15, n.1, p. 35-40, 2003.
- COEFFIER, M. et al. Modulating effect of glutamine on IL-1b-induced cytokine production by human gut. **Clinical nutrition**, v.22, n.4, p.407-413, 2003.
- ELMORE, S.A. Enhanced Histopathology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. **Toxicologic Pathology**, v.34, n.5, p.687-696, 2006.
- FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Dietary supplement products & ingredients**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/ProductsIngredients/default.htm>>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sistema Digestivo II – Tubo Digestivo. In: GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.294-317.
- GERAIX, J. et al. Glutamina e sistema imune. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica Funcional**, v.14, n.21, p.44-52, 2014.
- JUNG, C; HUGOT, J.P; BARREAU, F. Peyer's patches: The immune sensors of the intestine. **International Journal of Inflammation**. v.2010, p.1-12, jul. 2010;
- LEGACY FOR LIFE. **I26 for health**. Disponível em: <<https://www.i26forhealth.com/>>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- LI, X. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.6, n.1, p.1-10, ago. 2015.
- LI, X. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) modulate the intestinal mucosal immune response in a mouse model of *Salmonella typhimurium* infection. **International Immunopharmacology**, v.36, p.305–314, jul. 2016.
- MAHDAVI, A.H. et al. Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal *Escherichia Coli* colonization, and immunocompetence of challenged *Broiler* chicks. **Poultry Science**, v.89, n.3, p.484–494, mar. 2010.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: A review. **Journal of Medicinal Food**, v.5, n.3, p.159–169, jul. 2002.

MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v.3, n.4, p.331-341, abr. 2003

MULLER, S. et al. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, v.14, n.109, p.1-7, 2015.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Sistema immune de mucosa. MURPHY, K; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Artmed, 2010. p.465-485.

MY WELLNESS JOURNEY. **Max GI Control**. Disponível em: <<http://mwjourney.com/wp-content/uploads/2016/06/Max-GI-Control-DRS.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2017.

ORIÁ, R.B.; BRITO, G.A.C. **Sistema digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2016.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. Sistema linfoide. In: OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter – bases da histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p.195-212.

PABLO, M.A.; CIENFUEGOS, G.A. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.31-39, 2000.

PARHAM, Peter. **O sistema imune**. 3. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2011.

PIOVACARI, S.M.F. et al. Imunonutrição. **Einstein: Educação continuada em Saúde**, v.6, p.41-43, 2008.

RAHMAN, S. et al. Oral passive Igy-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract disease. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9, n.5, p.1039-1048, 2013.

SALONEN, A.; VOS, W.N. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.5, p.239-262, jan. 2014.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Atlântica**, v.33, p.129-154, 2005.

SHERIDAN, B.S.; LEFRANÇOIS, L. Regional and mucosal memory T cells. **Nature Immunology**, v.12, n.6, p.485-491, jun. 2011

SIEBERS, A.; FINLAY, B. M cells and pathogenesis of mucosal and systemic infections. **Trends in Microbiology**. v.4, n.1, p.22-29, 1996.

THU, H.M. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for prophylaxis and treatment of rotavirus diarrhea in human and animal neonates: A concise review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.37, n.1, p.1-9, fev. 2017.

TORCHÉ, A. M. et al. Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.109, n.3-4, p.209–217, fev. 2006.

US 6420337 B1. **Highly purified cytokine activating factor and methods of use**. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US6420337#forward-citations>>. Acesso em: 08 ago. 2017.

US 6803035. **Anti-diarrheal and method for using the same**. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US6803035#citedBy>. Acesso em: 08 ago. 2017.

US 7083809 B2. **Purified cytokine inhibitory fator**. Disponível em: <<http://www.google.ch/patents/US7083809>>. Acesso em: 08 ago. 2017.

VEGA, C. G. et al. Egg yolk IgY: Protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.142, n.3-4, p.156–169, ago. 2011.

VEGA, C. G. et al. IgY antibodies protect against human rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. **PLoS ONE**, v.7, n.8, p.1-16, ago. 2012.

VEGA, C. G. et al. Egg yolk IgY antibodies: A therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. **Research in Veterinary Science**, v.103, p.1-10, set. 2015.

VULCANO, A.B. et al. Oral infection with enteropathogenic *Escherichia Coli* triggers immune response and intestinal histological alterations in mice selected for their minimal acute inflammatory responses. **Microbiology and Immunology**, v.58, n.6, p.352–359, jun. 2014.

WALL, R. et al. Role of gut microbiota in early infant development. **Clinical Medicine: Pediatrics**, Auckland, v. 3, p.45-54, mar. 2009.

WERSHIL, B.K.; FURUTA, G.T. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. **Journal of allergy and clinical immunology**, v.121, n.2, p.S380-S383, fev. 2008.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Analisar os efeitos da administração oral de dois ovoprodutos sobre o íleo e PPs de ratos *Wistar* fêmeas saudáveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter ovo não imune em pó por *spray drying*.
- Caracterizar química, imunológica e microbiologicamente os ovoprodutos 1 e 2, e o ovo comercial produzido por *spray drying*
- Analisar morfometricamente a parede do íleo e as suas PPs
- Quantificar os níveis de IgA fecal anti-IgY.

3 ARTIGO

Análise histológica do íleo de ratos *Wistar* suplementados com ovoprodutos

Kamila Falchetti Damasco¹, Camila Basso¹, Miriele Caroline da Silva¹, Cláudio Takeo Ueno², Lyssa Setsuko Sakanaka², Thaysa Amélia Bortoloti Fernandes², Carla Cristiane da Silva³, Emerson José Venancio¹,

¹ Departamento de Ciências Patológicas, UEL, Londrina, PR, Brasil

² Departamento Acadêmico de Alimentos, UTFPR, Londrina, PR, Brasil

³ Departamento de Educação Física, UENP, Londrina, PR, Brasil

¹Corresponding author: Emerson José Venancio. Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, 86051-990, Londrina, PR, Brazil Tel: +55 43 3371 5766 Fax: +55 43 3371 4267; E-mail: emersonj@uel.br

RESUMO

Em função da comercialização de ovoprodutos hiperimunes e da falta de conhecimento acerca dos seus efeitos sobre o tecido linfoide associado ao intestino de organismos saudáveis o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da administração oral de dois ovoprodutos sobre o íleo e placas de Peyer (PPs) de ratos *Wistar* fêmeas saudáveis. Como controle, foram utilizados ovos comerciais não hiperimunes secos por spray drying. Os ovoprodutos e os ovos comerciais foram avaliados quanto a composição centesimal, o perfil proteico, a presença e reatividade dos anticorpos IgY e a qualidade microbiológica. Ratos *Wistar* saudáveis foram alimentados via oral com 13 mg dos ovoprodutos ou 0,5 mL de PBS durante 14 dias e, induzidos a eutanásia. As fezes coletadas antes e depois da suplementação foram processadas para a análise da presença de IgA anti-IgY e os tecidos coletados *post-mortem* para a análise morfométrica. Foram quantificadas as PPs do íleo dos animais e coletados uma PP e 1,5 cm do íleo de cada animal. Os resultados obtidos demonstraram que os ovoprodutos contemplam as características descritas pelos fabricantes. A suplementação com os ovoprodutos não alterou a espessura de nenhuma das camadas da parede do íleo. O ovoproduto 1 e o ovo comercial aumentaram a quantidade de folículos linfoides nas PPs e a IgY não estimulou a produção de IgA anti-IgY. Portanto, a suplementação alimentar de ratos saudáveis com os ovoprodutos não causou prejuízos ao íleo e a imunoestimulação das PPs observada não se deve a ação da IgY.

3.1 Introdução

O íleo e suas placas de Peyer (PPs) são indicadores sensíveis à suplementação alimentar com compostos de efeitos locais (Elmore, 2006). As células efectoras do tecido linfoide associado ao intestino (GALT), os linfócitos intraepiteliais e leucócitos da lâmina própria, estão presentes no íleo assim como em

todo o intestino e são responsáveis pela proteção contra a invasão microbiana. As PPs assim como os folículos linfoides isolados e os linfonodos mesentéricos fazem parte do GALT indutor. Eles propiciam o contato direto dos antígenos luminiais com as células de defesa e consequente ativação da resposta imune (Wershil e Furuta, 2008).

Apesar da estrutura e composição do GALT promover proteção local, o trato intestinal representa uma importante porta de entrada de patógenos que podem induzir a lesão e inflamação intestinal, além da diminuição da absorção nutricional (Li et al. 2015; Vega et al. 2011). Os hábitos alimentares também têm sido descritos para influenciar o estado de saúde intestinal. Dietas hiperlipídicas podem reduzir a quantidade e diversidade da microbiota intestinal, um conjunto de microrganismos importante ao desenvolvimento estrutural e funcional normal do sistema imune da mucosa (Salonen e Vos, 2014).

Diante do potencial imunomodulador dos alimentos e da busca por medidas preventivas e/ou terapêuticas alternativas às alterações intestinais, a imunonutrição vem sendo investigada (Piovacari et al. 2008). Nesse contexto, destaca-se o ovo, um alimento rico em moléculas antimicrobianas e potencialmente imunomoduladoras como a IgY, a lisozima e a ovotransferrina (Rahman et al. 2013; Thu et al. 2017; Mahdavi et al. 2010; Li et al. 2016; Vega et al. 2011; 2012; 2015; Vulcano et al. 2014). A IgY é uma imunoglobulina produzida por aves a qual é transportada do sangue das aves para a gema do ovo. A sua obtenção pela gema do ovo é menos invasiva do que a obtenção de anticorpos do sangue periférico como normalmente é feito na produção de anticorpos em mamíferos (Muller et al. 2015). Quando administrada pela via oral não ativa o sistema complemento, não se liga ao fator reumatóide e receptores Fc. Portanto, teoricamente não induz a resposta inflamatória quando administrada por via oral em mamíferos (Li et al. 2015). Apesar disso, alguns estudos sugerem que a administração via oral da IgY estimula a produção de anticorpos séricos e fecais contra IgY (Torché et al. 2006; Vega et al. 2012).

Baseado no potencial antimicrobiano e imunomodulador da IgY, componentes da gema e/ou rica composição nutricional dos ovos integrais, empresas alimentícias têm investido na comercialização de ovoprodutos. Dois destes, segundo os fabricantes, são constituídos de pó de ovo e caracterizados como suplementos dietéticos hiperimunes. Eles contêm anticorpos IgY específicos contra 26 cepas bacterianas e visam estabelecer saúde intestinal e sistêmica baseado no equilíbrio entre bactérias patogênicas e a microbiota. Quando administrados por via oral em animais, têm como objetivo neutralizar as bactérias patogênicas, melhorar a integridade do epitélio intestinal e a responsividade do sistema imunológico local (My Wellness Journey, 2016; Legacy for Life, 2016).

O *pool* de anticorpos IgY específicos presente nos ovoprodutos, segundo os fabricantes, é o resultado da imunização repetida de galinhas com vacina multivante de microrganismos inativados (My Wellness Journey, 2016; Legacy for Life, 2016). As cepas utilizadas para a imunização das aves compreendem as mais relevantes para o desequilíbrio do trato intestinal: *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (Aerobacter), *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus salavarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* tipo 1, 3,

5, 8, 12, 14, 18 e 22 (Us 6803035, 2002).

Além disso, quando comparados a ovos de galinhas não imunizadas, os ovoprodutos hiperimunes contém maiores quantidades de fatores ativadores e inibidores de citocinas. Os fatores ativadores aumentam a expressão de TNF- α , IL-1 β ou IL-6 ou diminuem a expressão de TGF- β (Us 6420337 b1, 2000). De forma oposta, os fatores inibidores inibem a transcrição do RNA das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-2 (Us 7083809 b2, 2003).

Portanto, os ovoprodutos compreendem uma mistura de imunoglobulinas e fatores imunorreguladores que potencialmente detem atividade imunomoduladora. Esta, segundo os fabricantes, restaura o estabelecimento de um ambiente intestinal saudável em organismos infectados. No entanto, a sua ação sobre organismos saudáveis ainda é desconhecida. Diante disso e do potencial imunogênico da IgY, cujos efeitos podem ser benéficos ou danosos ao trato intestinal, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da administração oral de dois ovoprodutos sobre o íleo e PPs de ratos *Wistar* fêmeas saudáveis.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Obtenção do ovo comercial não hiperimune desidratado

Ovos comerciais não hiperimunes foram adquiridos no mercado local e processados como descrito por Yokoyama et al. (1992) e Carvalho e Filho (2013), com modificações. Resumidamente os ovos foram lavados com água e desinfetados com álcool 70%, foram quebrados, diluídos 1:2 em água destilada e homogeneizados em turrax por 2 minutos a 455 g. A pasteurização foi realizada em banho-maria à 60°C durante 3,5 minutos e a secagem via atomização no *spray dryer* (MSD 1.0, LabMaq). A vazão de bomba e ar comprimido utilizados para a desidratação dos ovos foram de 0,6 L/h⁻¹ e 30 L/min⁻¹ e, a vazão do ar quente, temperatura de secagem e temperatura de saída foram de 0,95 m³/min, 150°C e 79°C, respectivamente.

3.2.2 Composição centesimal dos ovoprodutos e ovo comercial

Os ovoprodutos foram avaliados em relação à quantidade de umidade, proteína, lipídeo e cinza de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Zenebon, Pascuet e Tiglea, 2008). A umidade foi determinada pela perda de peso da amostra submetida ao aquecimento em estufa a 105°C, a quantidade proteica pela técnica de *kjeldahl*, a determinação dos lipídeos por *Soxhlet* e a quantidade de cinzas pela incineração da amostra na mufla a 550°C.

3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Western Blotting

Ambas as técnicas foram realizadas conforme descrito em Tong et al. (2015), com modificações. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada para a análise do perfil proteico dos ovoprodutos e ovo comercial. Foram aplicados sob o gel de empilhamento 5 μ g de proteínas aquecidas em tampão de amostra redutor. A constituição dos géis de empilhamento e separação e, a tensão aplicada durante a corrida eletroforética foram realizadas como descrito anteriormente. A visualização do perfil proteico foi realizada pela coloração do gel com azul de *Coomassie* seguida de descoloração e a determinação do peso molecular de cada proteína a partir da sua comparação com o padrão de peso molecular *BenchMark*TM (Cat. 10747-012, Invitrogen).

A técnica de *Western Blotting* foi realizada para a detecção das cadeias pesadas da IgY nos ovoprodutos. Foi realizada a transferência das proteínas do gel SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose à 4°C durante 18 horas, sob corrente elétrica de 150 mA. Os sítios remanescentes não ligados foram bloqueados com PBS leite em pó desnatado a 5% e as lavagens feitas com PBS Tween 20 0,05%. As cadeias pesadas da IgY foram reconhecidas pelo anticorpo anti-IgY conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS leite em pó desnatado a 1% (Cat. A30-104P, Bethyl) e reveladas com 3,3'-diaminobenzidina. O peso molecular das proteínas visualizadas foi determinado pela sua comparação com o padrão de peso molecular *BenchMark™* pré corado (Cat. 10748-010, Invitrogen).

3.2.4 ELISA indireto

A reatividade dos anticorpos IgY à *S. Typhimurium* foi determinada por ELISA indireto conforme descrito em Bangi et al. (2012), com modificações. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL por poço de $6-9 \times 10^8$ UFC/mL de *S. Typhimurium* ATCC UK-1, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gerson Nakazato, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. O período de incubação à 4°C, o bloqueio e posteriores incubações assim como as etapas de lavagens foram realizadas como descrito anteriormente. Foi adicionado 100 µL por poço de 10 mg/mL dos ovoprodutos 1 e 2 e ovo comercial diluídos em PBS leite em pó desnatado a 1% e, adicionado 100 µL por poço do anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase diluído 1:40000 em PBS leite em pó desnatado a 1% (Cat. A30-104P, Bethyl). Foram adicionados 100 µL por poço de substrato (0,01 mg/mL de tetrametilbenzidina e 0,03% de peróxido de hidrogênio, diluídos em acetato de sódio 0,1M pH 5,0) e após incubação de 30 minutos na ausência de luz a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica foi mensurada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.2.5 Análise microbiológica

A análise dos microrganismos indicadores: mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e coliformes totais foi realizada para a análise da qualidade de processamento dos ovoprodutos (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2015; United States Department of Agriculture, 2018). Tecnicamente as análises foram realizadas conforme descrito em Silva et al. (2007), com exceção da quantidade inicial de amostra utilizada. Neste estudo, a diluição 10^{-1} foi feita a partir da diluição de 10g dos ovoprodutos em 90 mL de água peptonada.

3.2.6 Delineamento experimental dos animais

Ratos *Wistar* fêmeas de 60 dias de idade e peso médio de 200g foram retirados do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e acomodados em ambiente aclimatizado no biotério experimental do departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento da mesma universidade. Os animais foram acondicionados aos ciclos claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração comercial para roedores e água *ad libitum*. Eles foram agrupados aleatoriamente em 12 animais por grupo, induzidos à excreção fecal por massagem abdominal para a coleta de fezes e, submetidos ao período de adaptação.

A dose suplementar administrada foi baseada na recomendação dos fabricantes dos ovoprodutos ao consumo humano (4,5 g diário/~70 Kg). Os animais dos grupos testes receberam 13 mg dos ovoprodutos diluídos em 0,5 mL de PBS

0,01M pH 7,4 e os animais do grupo controle 0,5 mL da solução salina estéril PBS, todas administrações via gavagem. Realizado 14 dias consecutivos de suplementação, os animais foram induzidos à excreção fecal para a coleta de fezes e submetidos a jejum, anestesia e eutanásia na câmara de CO₂ (Figura 1).

3.2.7 *Análise morfométrica da parede do íleo e PPs*

Após a eutanásia e laparotomia, todas as PPs dos animais identificadas numa extensão de 8 cm do íleo foram quantificadas e mensuradas. A mensuração macroscópica dos eixos maior e menor realizadas com o paquímetro foi utilizada para posterior análise da área das PPs (Azevedo et al. 2007). A maior placa do íleo foi coletada assim como 1,5 cm do íleo distal.

Todas as peças coletadas foram acondicionadas à solução fixadora *Bouin* por 24 horas como descrito previamente (Beçak e Paulete, 1970), desidratadas com álcool 100, 95 e 70%, diafanizadas com xilol e submetidas ao processo de inclusão em parafina (Junqueira e Carneiro, 2004). Na sequência, foram realizados cortes semi-seriados com 7 µm de espessura que foram acondicionados em banho-maria à temperatura de 45°C. Quatro cortes foram coletados em lâmina histológica e corados com hematoxilina-eosina (Junqueira e Carneiro, 2004).

Em cada corte do íleo, sob a objetiva de 10X, foram mensurados a altura de 10 vilos e a profundidade de 10 criptas. A partir disso foi analisada a relação vilos/cripta. Foram realizados também, em cada corte, 10 medidas da espessura total da parede intestinal e camadas mucosa, submucosa, muscular total, interna e externa (Azevedo et al. 2007; Mahdavi et al. 2010; Thimotheo et al. 2013) totalizando assim 40 leituras para cada parâmetro analisado (Figura 2).

Em relação às PPs, o corte com o maior número de folículos linfoides foi analisado sob a objetiva de 4X quanto ao número de folículos linfoides primários e folículos linfoides secundários (Figura 3) (Elmore, 2006). Todas as imagens do íleo e PPs foram adquiridas pelo sistema de captura de imagens Qcapture, versão 2.0 acoplado ao microscópio óptico Olympus e, analisadas através do software Image Pró-Plus, versão 4.5 (Azevedo et al. 2007).

3.2.8 *IgA fecal anti-IgY*

Para avaliar a imunogenicidade da IgY fezes coletadas antes e após a suplementação dos animais foram processadas como descrito por Ramiro-Puig et al. (2008), com exceção da quantidade de fezes diluídas. Neste estudo, as fezes foram diluídas em PBS 0,01M pH 7,4 para 200 mg/mL, foram homogeneizadas, incubadas por 30 minutos à 4°C e centrifugadas. Para a análise de IgA fecal anti-IgY o teste de ELISA foi empregado. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL por poço de 2 µg/mL de IgY diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. As etapas de incubação à 4°C, bloqueio e posteriores incubações assim como as etapas de lavagens foram realizadas como descrito anteriormente. Foi adicionado 100 µL por poço do sobrenadante fecal e, após incubação 100 µL por poço de anticorpo de cabra anti-IgA de rato conjugado com peroxidase diluído 1:40000 em PBS leite em pó desnatado a 1% (Cat. A110-102P, Bethyl). A reação colorimétrica foi desenvolvida após adição de 100 µL de substrato e interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica foi mensurada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.2.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e homogeneidade das variâncias (teste de *Levene's*). As variáveis paramétricas foram avaliadas pelo teste ANOVA de um fator e as variáveis não paramétricas pelo teste *Kruskal-Wallis*. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas a partir da comparação entre pares e o valor de significância adotado para a detecção dessas diferenças foi de 5%. Os valores foram categorizados por: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

3.3 Resultados e Discussão

Ovo comercial desidratado in-house

A secagem *in-house* dos ovos comerciais gerou 42,57g de ovo em pó os quais foram utilizados para as análises de caracterização da amostra e suplementação dos animais. O baixo rendimento observado (7,2%) pode ser correlacionado ao tipo de equipamento utilizado e a viscosidade da amostra. O desenho do equipamento faz com que parte do material fique retido na câmara de secagem e tubos. Além disso, a adesividade da amostra observada na câmara de secagem diminui a quantidade do produto no coletor.

Análise química dos ovoprodutos e ovo comercial

A análise química demonstrou que todas as amostras possuem composição centesimal semelhantes e que quantitativamente os ovoprodutos contêm a informação nutricional disponibilizada pelos fabricantes (Tabela 1). Além disso, os resultados estão de acordo com a literatura para a composição de ovos desidratados (American Egg Board, 2019; Ayadi et al. 2008; Hijo et al. 2010). Os diferentes parâmetros genéticos, nutricionais e de manejo das aves são fatores intrínsecos à qualidade dos ovos, e assim influenciadores potenciais da constituição química desse alimento (Nardone e Valfré, 1999). A linhagem e a idade das aves têm influência sobre o tamanho dos ovos e respectivas concentrações proteica e lipídica. Matrizes mais velhas produzem ovos mais pesados, com maior percentagem de gema e menor percentagem de clara (Suarez et al. 1997). Além disso, a composição da ração e o tipo de alojamento imposto às aves influenciam diretamente a concentração proteica, lipídica e de minerais que são depositados na clara e gema dos ovos (Mizumoto, Canniatti-Brazaca e Machado, 2006).

Perfil proteico

Os resultados obtidos na análise qualitativa das proteínas demonstraram semelhança entre as amostras (Figura 4). Além disso, o peso molecular e o perfil de proteínas observados são compatíveis com a constituição proteica esperada. O peso molecular das proteínas do ovo integral é similar ao das proteínas visualizadas no gel SDS-PAGE. As proteínas, mais abundantes no albúmen, como a ovalbumina tem peso molecular entre 42,4 e 45 kDa, a ovotransferrina entre 75 e 85 kDa, a ovomucoide, entre 28 e 43,1 kDa e as ovoglobulinas 2 e 3 entre 30 e 45 kDa (Mine, 2008). As proteínas mais abundantes na gema como as apoproteínas de LDL tem peso molecular entre 15 e 175 kDa, as apoproteínas de HDL entre 32 e 105 kDa, a fosvitina entre 33 e 40 kDa e as livetinas entre 22 e 80 kDa. A variação de peso molecular das apoproteínas de LDL e HDL e

livetinas pode ser explicada pela existência de proteínas estruturalmente diferentes agrupadas na mesma nomenclatura (Sartori et al. 2009; Shin et al. 2002; Mine, 2008). Portanto, o padrão de bandas observado encontra-se dentro do esperado.

Detecção da IgY

A análise por *Western blotting* confirmou a existência de anticorpos IgY nos ovoprodutos 1 e 2 e ovo comercial a partir da detecção das cadeias pesadas da IgY (Figura 5). Estruturalmente os anticorpos IgY são constituídos de cadeias polipeptídicas as quais são unidas por pontes dissulfetos. A exposição dessas moléculas a agentes redutores como o mercaptoetanol permite distinguir ambas às cadeias em cadeias leves e cadeias pesadas (Rahman et al. 2013). As primeiras pesam entre 21 e 30 kDa (Hatta et al. 2014; Garcia et al. 2005) e as últimas entre 64 e 70 kDa (Shin et al. 2002; Hatta et al. 2014). Dessa forma, o peso molecular encontrado na membrana de nitrocelulose (68 kDa) corrobora com a literatura.

Análise da reatividade da IgY

Os resultados obtidos com o ELISA indireto para a análise da reatividade da IgY demonstraram que os ovoprodutos 1 e 2 apresentam duas vezes mais IgY específicos contra *S. Typhimurium* quando comparados a ovos comerciais (Figura 6). Esses dados estão de acordo com o esperado para ovos de galinhas imunizadas com *S. Typhimurium*. Investigações prévias demonstraram que a imunização de aves e coelhos com células inteiras de *Salmonella* spp induzem o aumento dos níveis de anticorpos específicos à *Salmonella* no soro dos animais e gema dos ovos, respectivamente (Gordon et al. 2016; Bangi et al. 2012). Além disso, os resultados sugerem que as regiões de ligação ao antígeno e consequente atividade dos anticorpos IgY não foram inviabilizados pelo binômio tempo e temperatura utilizados durante o processo de secagem no *spray dryer*. Apesar do estudo de Hatta et al. (2014) ter demonstrado que a atividade da IgY diminui quando exposta a temperaturas superiores a 70°C ou quando exposta a 15 minutos ou mais à 70°C o estudo de Yokoyama et al. (1992) demonstrou que a atividade dos anticorpos IgY pode ser preservada quando expostos a altas temperaturas no *spray dryer* por um curto período de tempo. Assim, conclui-se que, os ovoprodutos 1 e 2 provêm de ovos obtidos de aves imunizadas e que a viabilidade da IgY pós-processamento foi preservada.

Análise de microrganismos indicadores

Apesar de nutricionalmente completos, os ovos potencialmente são veiculadores de patógenos. Os microrganismos indicadores coliformes totais e *S. aureus*, apesar de apresentarem baixo risco à saúde são associados à falta de higiene durante o processamento ou armazenagem dos alimentos. Os coliformes totais reúnem mais de 20 espécies de bactérias entéricas e não entéricas e a sua presença sugere uma contaminação ambiental e/ou fecal (Ray, 1996). O *S. aureus*, caracterizado como um patógeno oportunista é um microrganismo integrante da microbiota residente da pele e fossas nasais. Quando presente nos alimentos é associado à contaminação humana (Santos et al. 2007).

Os microrganismos indicadores mesófilos aeróbios e *Salmonella* spp indicam além das condições higiênico-sanitárias de processamento, o tempo e temperatura empregados nos procedimentos industriais. Os mesófilos aeróbios englobam tanto microrganismos deterioradores da matéria orgânica como

microrganismos patogênicos ambos capazes de se multiplicar na presença de oxigênio entre as temperaturas de 20°C e 45°C (Jay, 1996). A *Salmonella* spp, microrganismo patogênico zoonótico é atrelado a altas taxas de morbimortalidade e capaz de se multiplicar entre 7°C e 48°C (Asae, 2019). A exposição de ambos os microrganismos a 60°C por 3 min e 30 s é importante para a destruição destes e assim, necessária à comercialização de ovoprodutos (Usda, 1969).

Os resultados obtidos na análise de coliformes totais, *S. aureus*, mesófilos aeróbios e *Salmonella* spp demonstraram que microbiologicamente os ovoprodutos e os ovos comerciais são similares, processados adequadamente (Cp ovos, 2019; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2015, American Egg Board, 2019) e assim, passíveis ao consumo humano e animal (Tabela 2).

Morfometria das PPs do íleo dos animais

Os alimentos que escapam da digestão ou são parcialmente degradados pelo trato gastrointestinal podem induzir a tolerância oral ou a ativação da resposta imune local. Seus efeitos imunomoduladores podem ser benéficos ou danosos ao trato intestinal e assim responsáveis pelo estado de saúde sistêmico e local (Chehade e Mayer, 2005; Wakabayashi et al. 2006; Ferreira e Pinto, 2012).

Os resultados obtidos com a análise morfométrica das PPs demonstraram que a suplementação dos animais com os ovoproduto 1 e o ovo comercial quando comparados aos animais do grupo controle modulou a quantidade de folículos linfóides primários ($p = 0,009$; $p = 0,014$) e folículos linfóides secundários ($p = 0,031$; $p = 0,003$). Ambos os ovoproduto 1 e ovo comercial aumentaram a quantidade de folículos linfóides, portanto, imunoestimularam as PPs do íleo dos animais. Quanto aos dados relativos à quantidade e área das PPs, não houve diferenças entre os grupos. Além disso, os animais suplementados com o ovoproduto 2 não diferiram dos animais do grupo controle em nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 3).

Numericamente, os resultados obtidos para os animais do grupo controle corroboram com os dados publicados por outros autores. A quantidade média de PPs situadas em 20 cm do íleo de ratos *Sprague-Dawley* com 250-300g é de aproximadamente 5 (Wang et al. 2014), portanto, proporcional a quantidade encontrada na extensão de 8 cm. A área média das PPs situadas em 10 cm do íleo de animais com 160-190g é de 20 mm² (Bertoni e Gabella, 2001) e a quantidade de folículos linfóides primários e folículos linfóides secundários de ratos *Wistar* de 3 a 18 semanas de idade é de aproximadamente de 7 a 11 (Chen et al. 1995). As diferenças observadas podem ser associadas às diferentes linhagens e faixa etária dos animais analisados assim como a extensão intestinal observada (Wang et al. 2014).

Visto que as PPs compreendem agregados celulares ricos em linfócitos B, a imunoestimulação visualizada poderia induzir a produção de IgA secretora ou, a partir da quebra da tolerância oral, a produção de IgG e IgE local. A IgA secretora no lúmen intestinal inibe a adesão bacteriana às células epiteliais e neutraliza vírus e toxinas luminiais, portanto, é protetiva ao trato intestinal. Os anticorpos IgG ou IgE ao interagirem com os receptores dos mastócitos, basófilos e macrófagos podem estimular a secreção de mediadores pró-inflamatórios e assim, contribuir para o desenvolvimento da hipersensibilidade alimentar, uma reação danosa ao trato intestinal (Chehade e Mayer, 2005).

Segundo o estudo de Torché et al. (2006) o potencial imunogênico da IgY poderia ser correlacionado a imunoestimulação detectada, no entanto, segundo os estudos de Vega et al. (2011; 2015) esta, pode ser atribuída à outras moléculas co-estimulatórias da gema do ovo.

IgA anti-IgY

Os imunógenos administrados via intramuscular como a IgY induzem a resposta imune sistêmica (Lobato et al. 2017) e os imunógenos alimentares adquiridos via oral a resposta imune sistêmica e local (Jung, Hugot e Barreau, 2010). A análise da imunogenicidade da IgY administrada via oral neste estudo demonstrou que, não há diferenças para a produção de IgA fecal anti-IgY antes e após a suplementação dos animais dos grupos controle e testes (Dados não mostrados). Portanto, a concentração das IgY específicas e inespecíficas administradas não estimulou a produção de IgA anti-IgY no modelo experimental utilizado e assim, não pode ser atrelada a imunoestimulação das PPs.

Esses dados corroboram com os estudos de Vega et al. (2011; 2015) e são contrários aos estudos de Vega et al. (2012) e Torché et al. (2006). Os resultados obtidos por Vega et al. (2011; 2015) atribuem a imunoestimulação do GALT observada em seus experimentos à outras moléculas co-estimulatórias da gema do ovo visto que, a administração de leite acrescido de gema de ovo líquida ou desidratada, rica em IgY específica e IgY inespecífica, a bezerros infectados com rotavirus bovino, aumentou a quantidade das células secretoras de anticorpos IgA e IgG na lâmina própria intestinal, nos linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, embora apenas a IgY específica tenha prevenido o desenvolvimento dos sintomas clínicos da infecção.

Em contrapartida, os estudos de Vega et al. (2012) e Torché et al. (2006) relatam que a administração direta ou via oral da IgY à porcos induz a produção de anticorpos anti-IgY. O primeiro estudo relata que a administração de IgY específica semi-purificada à porcos infectados com rotavirus humano induziu a produção de IgG e IgA anti-IgY (Vega et al. 2012). Da mesma forma a administração direta da IgY encapsulada às placas de Peyer de porcos livres de patógenos específicos induziu a produção de IgA, IgG1 e IgG2 anti-IgY (Torché et al. 2006). A disparidade observada entre os dados de Vega et al. (2012) e Torché et al. (2006) e os resultados do presente estudo pode ser relacionada às diferentes espécies estudadas.

Morfometria intestinal da parede do íleo dos animais

Todo o intestino delgado contem as células efetoras do GALT, no entanto, o íleo é a porção mais responsiva frente aos antígenos luminiais e microrganismos intestinais (Barko, et al. 2018; Sommer e Bäckhed, 2015). Portanto, é alvo de estudo na busca por compostos imunomoduladores e seus efeitos.

A análise morfométrica da parede do íleo dos animais demonstra que, a suplementação via oral com os ovoprodutos 1 e 2 e o ovo comercial não teve influência sobre os parâmetros analisados. As suplementações não alteraram a espessura da parede total e camadas mucosa e submucosa do íleo, ou seja, a espessura das camadas onde se encontram as células do GALT efetor; não modificaram a altura dos vilos e profundidade das criptas, portanto, o tamanho da área absorptiva e de renovação celular ileal e; não alteraram a espessura das camadas muscular total, interna e externa não prejudicando a arquitetura ileal

normal (Tabela 4). Dessa forma, a administração via oral dos ovoprodutos não modulou a parede do íleo de ratos *Wistar* saudáveis.

Os dados obtidos para o grupo controle corroboram com os estudos de outros autores. Os estudos de Rosa et al. (2017) e Azevedo et al. (2007) demonstraram que a espessura da parede total do íleo de ratos *Wistar* machos de 2-6 meses de idade varia entre 450,2-692,1 μm e a espessura da camada mucosa entre 379,1-562,5 μm . A altura do vilão varia entre 194,7-280,0 μm e a profundidade das criptas em torno de 220,0 μm (Rosa et al. 2017; Batista et al. 2017). A espessura da submucosa e muscular total é de aproximadamente 22,4 μm e 65,0 μm , respectivamente (Rosa et al. 2017; Azevedo et al. 2007).

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que os ovoprodutos 1 e 2 contemplam as características descritas pelos fabricantes. O ovoproduto 2 quando administrado pela via oral a animais saudáveis não teve influência sobre os parâmetros analisados e a suplementação dos animais com os ovoprodutos não alterou a arquitetura ileal normal, portanto, não causaram prejuízos ao trato intestinal. Contrário a isso, a suplementação com os ovoproduto 1 e o ovo comercial imunoestimulou as PPs do íleo dos animais. Visto que os efeitos da imunoestimulação das PPs podem ser benéficos ou danosos ao trato intestinal, sugere-se aos próximos estudos a quantificação dos anticorpos séricos e fecais IgA, IgG e IgE e a determinação da (s) proteína (s) responsável (is) pela imunomodulação detectada.

Agradecimentos: A CAPES pela bolsa recebida, nº 88882.181318/2018-1.

Conformidade com os padrões éticos

Conflito de interesse: Todos os autores declararam não ter interesse financeiro concorrente com relação a este manuscrito.

Aprovação ética: Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo CEUA/UEL sob o protocolo 12121.2018.45.

Referências

American Egg Board (2019) Specifications for whole egg types. In: American Egg Board. Disponível em: <https://www.aeb.org/food-manufacturers/eggs-product-overview/egg-products-specifications/44-whole-egg-types/136-specifications>. Acesso em: 07 maio 2019.

Asae (2019) *Salmonella*. In: Autoridade de segurança alimentar e econômica. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt/?cn=541054135462AAAAAAAAAAAA>. Acesso em: 08 maio 2019.

Ayadi MA et al (2008) Effect of moderate spray drying conditions on functionality on dried egg white and whole egg. J Food Sci. Doi: 10.1111 / j.1750-3841.2008.00811.x.

Azevedo JF et al (2007) Análise morfológica da parede intestinal do íleo de

ratos submetidos a intensa carência de proteínas. Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar. Doi: org/10.25110 / arqvet. Doi: v10i2.2007.2053.

Bangi J et al (2012) Development of indirect competitive ELISA for the detection of *Salmonella typhimurium*. Romanian Biotechnological Letters. Doi: 2248-3942

Barko PC et al (2018) The Gastrointestinal Microbiome: A Review. Journal of Veterinary Internal Medicine. Doi: 10.1111 / jvim.14875

Batista TKA (2017) Efeitos da isquemia e reperfusão e a ação da curcumina na parede intestinal do íleo de ratos. In: Anais do Encontro Internacional de Produção Científica. Disponível em: <https://proceedings.science / epcc / papers / efeitos-da-isquemia-e-reperfusao-e-a-acao-da-curcumina-na-parede-intestinal-do-ileo-de-ratos>. Acesso em: 05 maio 2018.

Beçak W, Paulete J (1970) Técnicas de citologia e histologia. Livros Técnicos e Científicos S. A., São Paulo.

Bertoni S, Gabella G (2001) Hypertrophy of mucosa and serosa in the obstructed intestine of rats. J Anat. Doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19960725.x.

Carlander D, Wihelmsen M, Larsson A (2003) Immunoglobulin Y levels in egg yolk from three chicken genotypes. Journal Food and Agricultural Immunology. Doi: org / 10.1080 / 0954010031000138087.

Carvalho MG, Filho AT (2013) Capacidade antioxidante e estabilidade lipídica do ovo durante o processamento e estocagem. Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos. Doi: 10.14685 / rebrapa.v4i1.102.

Cehade M, Mayer L (2005) Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. J Allergy Clin Immunol. Doi: 10.1016 / j.jaci.2004.11.008.

Chen D et al (1995) Postnatal development of lymphoid follicles in rat Peyer's patches, with special reference to increased follicle number. Arch Histol Cytol. Doi: 10. 1679 / aohc.58.335.

Cp ovos (2019) Ovo integral pasteurizado desidratado. In: Cooperativa dos Produtores de Ovos. Disponível em: <http://www.cooperovos.com.br / doc / D1b%20OIPD.pdf>. Acesso em: 08 maio 2019.

Elmore SA (2006) Enhanced Histopathology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Toxicol Pathol. Doi: 10.1080 / 01926230600939989.

Ferreira JMS, Pinto FCH (2012) Alergia alimentar: definições, epidemiologia e imunopatogênese. Rev Bras Nutr Clin.

Garcia DA et al (2005) [Obtention, purification and characterization of IgY polyclonal antibodies, developed in hens, directed against Colombian isolates of *Giardia duodenalis*]. Biomedica. Doi: org / 10.7705 / biomedica.v25i4.1372

Gordon G et al (2016) Generation and characterization of IgY antibodies from lohmann brown hens immunized with *Salmonella* spp. for their subsequent application in nanotherapy. *Biology and Medicine*. Doi: 10.4172/0974-8369.1000284.

Hatta H et al (2014) Productivity and Some Properties of Egg Yolk Antibody (IgY) against Human Rotavirus Compared with Rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem*. Doi: org/10.1271/bbb.57.450.

Hijo AACT et al (2010) Caracterização físico-química de ovo em pó produzido por spray drying. In: Congresso da Pós-Graduação da Universidade Federal de Lavras. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/lavras/resumos/1786.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2017.

Jay JM *Modern Food Microbiology*. Chapman e Hall, New York.

Jung C, Hugot JP, Barreau F (2010) Peyer's patches: The immune sensors of the intestine. *Int J Inflam*. Doi: 10.4061/2010/823710.

Junqueira LCU, Carneiro J (2004) Métodos de estudo em histologia. In: Junqueira LCU, Carneiro J *Histologia básica*, 10^o ed. Guanabara Koogan

Legacy for Life (2016) I26 for health. In: Legacy for Life LLC. Disponível em: <https://www.i26forhealth.com/>. Acesso em: 08 ago. 2017.

Li X et al (2015) Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. *J Anim Sci Biotechnol*. Doi: 10.1186 / s40104-015-0038-8.

Li X et al (2016) Chicken egg yolk antibodies (IgY) modulate the intestinal mucosal immune response in a mouse model of *Salmonella typhimurium* infection. *Int Immunopharmacol*. Doi: 10.1016 / j.intimp.2016.04.036.

Lobato LP et al (2017) The effects of oat bran and soy flour on humoral immune response in rats fed hypercholesterolaemic diets. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. Doi: 10.5433/1679-0367.2017v38n2p165

Mahdavi AH et al (2010) Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal *Escherichia Coli* colonization, and immunocompetence of challenged *Broiler* chicks. *Poult Sci*. Doi: 10.3382 / ps.2009-00541.

Mine Y (2008) *Egg Bioscience and Biotechnology*. John Wiley & Sons.

Mizumoto EM, Canniatti-Brazaca SG, Machado FMVF (2006) Avaliação química e sensorial de ovos obtidos por diferentes tratamentos. *Ciência e Tecnologia de alimentos*. Doi: 0101-206.

My Wellness Journey (2016) Max GI Control. In: My Wellness Journey LLC. Disponível em: <http://mwjourney.com/wp-content/uploads/2016/06/Max-GI-Control-DRS.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2017.

Nardone A, Valfré F (1999) Effects of changing production methods on quality of meat milk and eggs. *Livestock Production Science*. Doi: org / 10.1016 / S0301-6226(99)00025-1.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2015) Response to Questions Posed by the Department of Defense Regarding Microbiological Criteria as Indicators of Process Control or Insanitary Conditions. In: Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Disponível em: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/2ea3f473-cd12-4333-a28e-b2385454c967/NACMCF-Report-Process-Control-061015.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08 ago. 2017.

Piovacari, SMF et al (2008) *Imunonutrição*. Einstein: Educação continuada em Saúde.

Rahman S et al (2013) Oral passive Igy-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract disease. *Hum Vaccin Immunother*. Doi: 10.4161 / hv.23383.

Ramiro-Puig E et al (2008) Intestinal immune system of Young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem*. Doi: 10.1016 / j.jnutbio.2007.07.002

Ray B (1996) *Fundamental food microbiology*. Boca Raton, CRC Press.

Rosa ACS et al (2017) Infecção aguda por *Toxoplasma gondii* promove mudanças morfoquantitativas nos neurônios nitrérgicos submucosos do íleo de ratos *Wistar*. In: *Anais do Encontro Internacional de Produção Científica*. Disponível em: <https://proceedings.science/epcc/papers/infeccao-aguda-por-toxoplasma-gondii-promove-mudancas-morfoquantitativas-nos-neuronios-nitrergicos-submucosos-do-ileo-de?lang=pt-br>. Acesso em: 05 maio 2018.

Salonen A, Vos WN (2014) Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu Rev Food Sci Technol*. Doi: 10.1146 / annurev-food-030212-182554.

Santos AL et al (2007) *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. Doi: org / 10.1590 / S1676-24442007000600005.

Sartori EV et al (2009) Concentração de proteínas em gemas de ovos de poedeiras (*Gallus gallus*) nos diferentes ciclos de postura e sua interferência na disponibilidade do ferro. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Doi: 0101-2061

Shin JH et al (2002) Use of Egg Yolk-Derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. Doi: 10.1128/cdli.9.5.1061-1066.2002.

Silva N et al (2007) *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Varela, São Paulo.

Sommer F, Bäckhed F (2015) The gut microbiota engages different signaling

pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Nature*. Doi: 10.1038/mi.2014.74.

Suarez ME et al (1997) Effect of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. *Poult Sci*. Doi: 10.1093 / ps / 76.7.1029.

Thimotheo M et al (2013) Efeitos do espaço de alojamento e da idade sobre desenvolvimento, integridade e proteção da mucosa intestinal de frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. Doi: org / 10.1590 / S0102 -09352013000100017.

Thu HM et al (2017) Chicken egg yolk antibodies (IgY) for prophylaxis and treatment of rotavirus diarrhea in human and animal neonates: A concise review. *Korean J Food Sci Anim Resour*. Doi: 10.5851 / kosfa.2017.37.1.1.

Tong C et al (2015) A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. *Poult Sci*. Doi: 10.3382 / ps / peu005.

Torché AM et al (2006) Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. Doi: 10.1016 / j.vetimm.2005.08.016.

United States Department of Agriculture (2018) FSIS microbiological testing program for pasteurized egg products, calendar years 1995-2017. In: Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Disponível em: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-reports/microbiology/testing-program-for-rte-meat-and-poultry-products/microbiological-testing-program-for-pasteurized-egg-products/pasteurized-egg-products>. Acesso em: 22 nov. 2018.

Us 6420337 b1(2000) Highly purified cytokine activating factor and methods of use. In: Google Patents. Disponível em: <https://www.google.com/patents/US6420337#forward-citations>. Acesso em: 08 ago. 2017.

Us 6803035 (2002) Anti-diarrheal and method for using the same. In: Google Patents. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US6803035#citedBy>. Acesso em: 08 ago. 2017.

Us 7083809 b2 (2003) Purified cytokine inhibitory fator. In: Google Patents. Disponível em: <http://www.google.ch/patents/US7083809>. Acesso em: 08 ago. 2017.

Usda (1969) Egg pasteurization manual. Agricultural Research Service, Albany.

Vega CG et al (2011) Egg yolk IgY: Protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol*. Doi: 10.1016 / j.vetimm.2011.05.003.

Vega CG et al (2012) IgY antibodies protect against human rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. PLoS One. Doi: 10.1371 / journal.pone.0042788.

Vega CG et al (2015) Egg yolk IgY antibodies: A therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. Res Vet Sci. Doi: 10.1016 / j.rvsc.2015.09.005.

Vulcano AB et al (2014) Oral infection with enteropathogenic *Escherichia Coli* triggers immune response and intestinal histological alterations in mice selected for their minimal acute inflammatory responses. Microbiol Immunol. Doi: 10.1111 / 1348-0421.12153.

Wakabayashi A (2006) Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. Immunology. Doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02418.x

Wang W (2014) Proliferation and apoptosis of Peyer's patches and its lymphocytes in experimental terminal ileitis. Int J Clin Exp Pathol. Doi: 1936-2625 / IJCEP0003290

Wershil BK, Furuta GT (2008) 4. Gastrointestinal mucosal immunity. J Allergy Clin Immunol. Doi: 10.1016 / j.jaci.2007.10.023.

Yokoyama H et al (1992) Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. Infect Immun. Doi: 0019-9567/92/030998-10\$02.00/0.

Zenebon O, Pascuet NS, Tiglea P (2008) Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Varela, São Paulo.

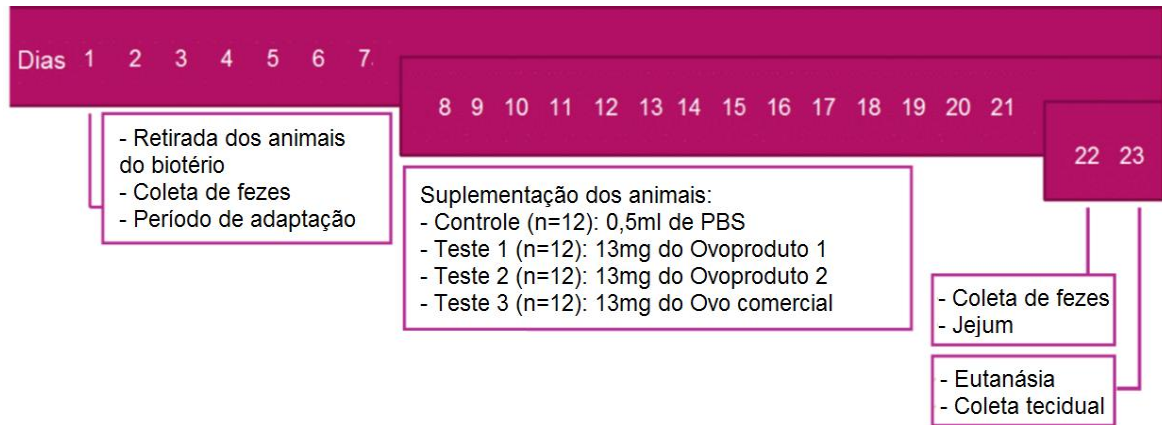


Figura 1 Ilustração cronológica dos eventos experimentais realizados *in vivo*. 1º dia, retirada dos animais do Biotério Central da UEL, transporte ao biotério de manipulação, aleatorização dos grupos e coleta de fezes. 1º-7º dia, período de adaptação. 8º-21º dia, suplementação dos grupos via gavagem. 22º dia, coleta de fezes e jejum de 12 horas. 23º dia, eutanásia e coleta tecidual.

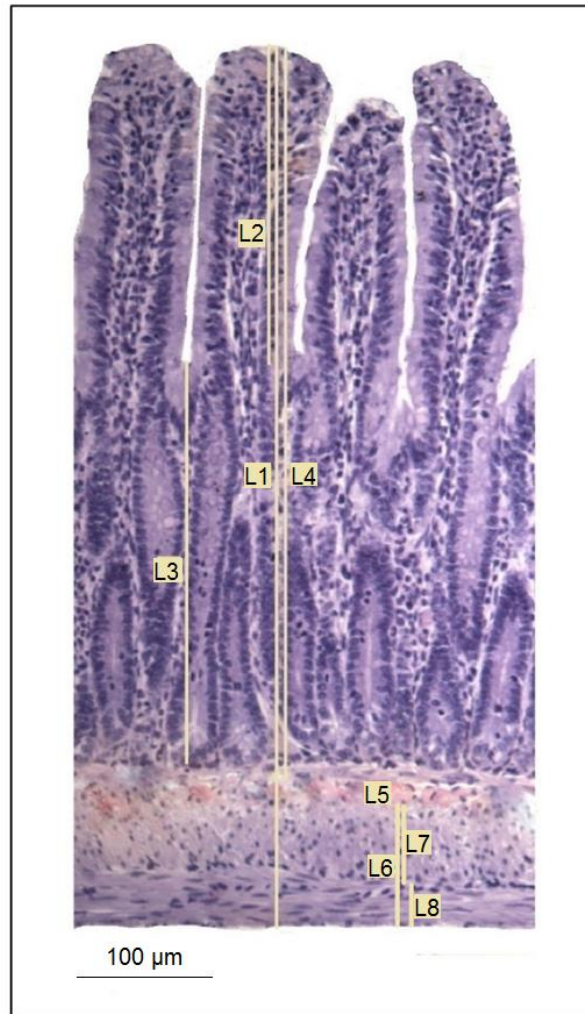


Figura 2 Avaliação morfométrica da parede do íleo. Mensuração da parede total do íleo (L1), vilão (L2), cripta (L3), mucosa (L4), submucosa (L5), muscular total (L6), muscular interna (L7) e muscular externa (L8). Imagem obtida com a objetiva de 10x. Barra de escala (-) = 100 μm. Coloração: Hematoxilina-Eosina.

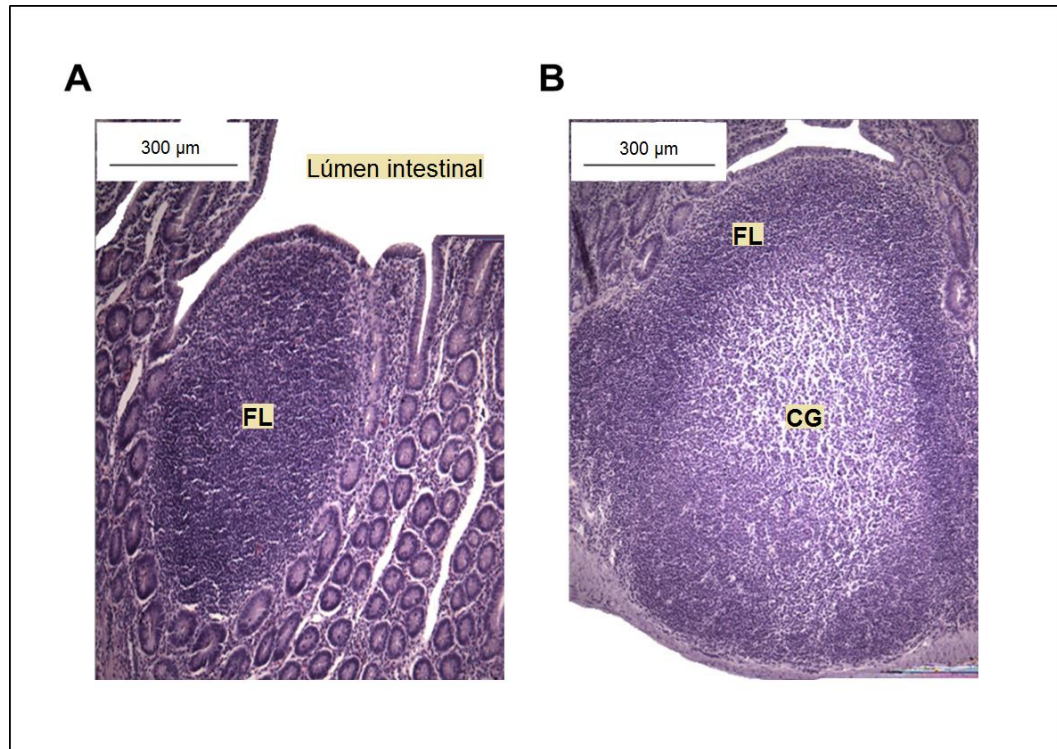


Figura 3 Avaliação histológica dos folículos linfoides. (A) Folículo linfoide primário. (B) Folículo linfoide secundário. FL = Folículo linfoide. CG = Centro germinativo. Imagem capturada sob a objetiva de 10x. Barra de escala (†) = 300 µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina.

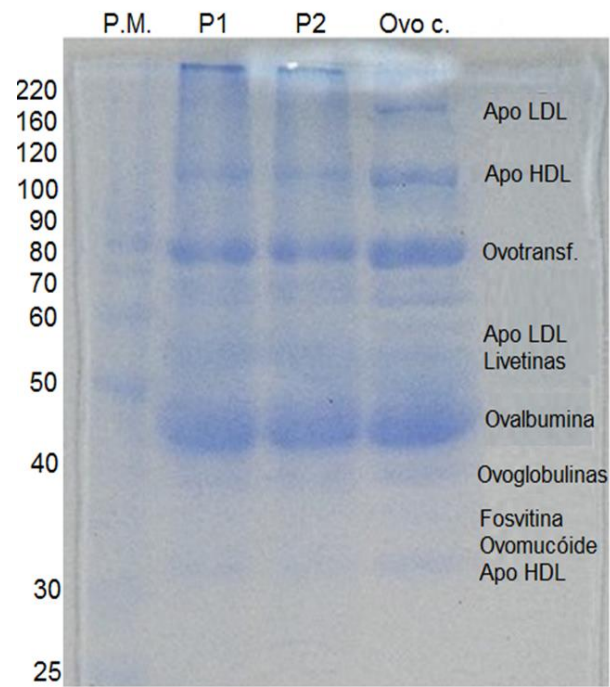


Figura 4 Perfil proteico dos ovoprodutos e ovo comercial. P.M.=Peso molecular, P1=Ovoproduto 1, P2=Ovoproduto 2, Ovo c.=Ovo comercial, Apo LDL=Apoproteína de lipoproteínas de baixa densidade, Apo HDL=Apoproteína de lipoproteínas de alta densidade, Ovotransf.=Ovotransferrina. (Gel SDS-PAGE a 10%. Peso molecular: Cat. 10747-012, Invitrogen).

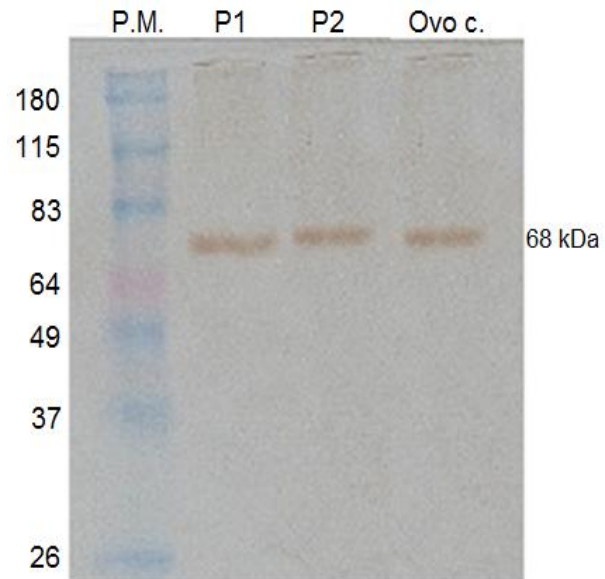


Figura 5 Imunodeteccção da IgY. P.M.=Peso molecular, P1=Ovoproduto 1, P2=Ovoproduto 2, Ovo c.=Ovo comercial. (Peso molecular: Cat. 10748-010, Invitrogen).

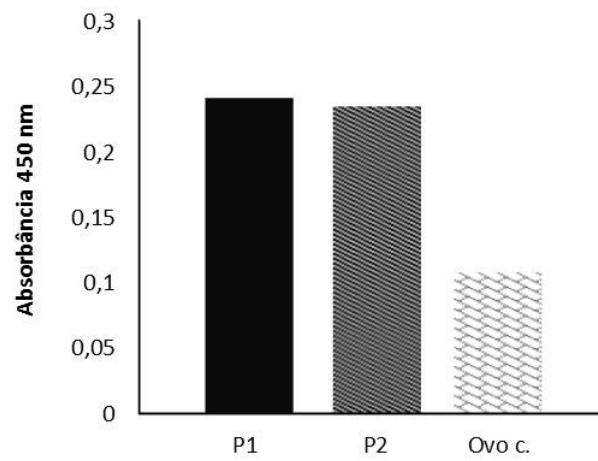


Figura 6 Reatividade da IgY contra *S. Typhimurium*. P1=Ovoproduto 1, P2=Ovoproduto 2, Ovo c.=Ovo comercial.

	P1	Fabric. P1	P2	Fabric. P2	Ovo c.	Ref ¹	Ref ²	Ref ³
Umidade	0,11 g	-----	0,11 g	-----	0,05 g	0,13 g	-----	0,13 g
Lipídeos	1,28 g	1,50 g	1,32 g	2,00 g	1,38 g	1,98 g	1,51 g	1,51 g
Proteínas	2,72 g	2,00 g	2,81 g	2,00 g	2,28 g	2,16 g	1,85 g *	2,17 g
Cinzas	0,17 g	-----	0,21 g	-----	0,15 g	0,19 g	0,28 g	0,15 g

Tabela 1 Composição centesimal dos ovoprodutos e ovo comercial. Dados expressos para 4,5g. P1 = Ovoproduto 1. P2 = Ovoproduto 2. Ovo c. = Ovo comercial. Fabric. = Informação nutricional fornecida pelos fabricantes. Ref = Resultados obtidos por outros autores. ¹American Egg Board (2019), ²Ayadi et al. (2008), ³Hijo et al. (2010). *Fator de correção utilizado 6,38.

Amostras	Coliformes totais	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp	Mesófilos aeróbios
P1	<3 NMP/g	Ausência	Ausência	Ausência
P2	<3 NMP/g	Ausência	Ausência	Ausência
Ovo c.	<3 NMP/g	Ausência	Ausência	Ausência
Ref ¹	<3 NMP/g	Ausência	Ausência	5x10 ³ UFC/g
Ref ²	10/g	10/g	Ausência	10 ⁴ /g
Ref ³	10/g	-----	Ausência	10 ³ /g

Tabela 2 Análise microbiológica dos ovoprodutos e ovo comercial. Quantidade de amostra analisada: 10g. P1 = Ovoproduto 1. P2 = Ovoproduto 2. Ovo c. = Ovo comercial. Ref = Quantidade máxima descrita por outros autores. NMP/g = Número Mais Provável/grama. UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama. ¹CP ovos (2019). ²NACMCF Executive Secretariat (2015). ³Amerian Egg Board (2019).

Morfometria das placas de Peyer					
Dados macroscópicos					
Parâmetros	Controle	P1	P2	Ovo c.	P
Quantidade de PPs	3 (2-3)	2 (2-3)	2 (2-3)	3 (2-4)	0,316
Área das PPs (mm ²)	12,21 (±4,01)	13,47 (±6,42)	13,75 (±3,90)	13,26 (±4,60)	0,874
Dados microscópicos					
Nº de FL primários	5 (3-6)	7 (6-7)**	6 (5-7)	7 (5-10)*	0,005
Nº de FL secundários	4 (3-5)	6 (5-7)*	5 (5-6)	6 (5-9)**	0,003

Tabela 3 Análise morfométrica das PPs do íleo dos animais. Teste ANOVA de um fator. Dados expressos como média (±DP). Teste Kruskal-Wallis, comparação entre pares. Dados expressos como mediana (25%-75%). *p<0,05 em relação ao grupo controle. **p<0,01 em relação ao grupo controle. P1 = Ovoproduto 1. P2 = Ovoproduto 2. Ovo c. = Ovo comercial. Nº = Número. FL = Folículos linfoides.

Morfometria da parede do íleo					
Parâmetros	Controle	P1	P2	Ovo c.	p
Parede total (µm)	519,4 (±104,8)	558,2 (±92,4)	558,4 (±80,9)	523,4 (±113,6)	0,643
Mucosa (µm)	417,7 (348,6-512,0)	484,6 (388,6-501,7)	437,9 (424,4-511,8)	455,7 (357,6-504,1)	0,623
Vilo	215,6 (±69,9)	243,9 (±53,2)	252,5 (±64,5)	224,4 (±61,7)	0,456
Cripta	202,2 (±45,1)	198,9 (±32,4)	201,2 (±29,2)	191,5 (±40,7)	0,891
Relação Vilo/Cripta	1,1 (±0,4)	1,2 (±0,2)	1,3 (±0,4)	1,2 (±0,3)	0,608
Submucosa (µm)	21,4 (±2,1)	22,0 (±2,36)	22,8 (±3,7)	21,1 (±3,8)	0,560
Muscular total (µm)	70,1 (±16,9)	79,0 (±15,2)	73,8 (±19,9)	77,0 (±20,8)	0,652
Muscular interna	45,4 (±12,3)	49,5 (±11,5)	45,8 (±14,4)	50,1 (±17,3)	0,781
Muscular externa	24,7 (±5,3)	29,4 (±5,9)	26,8 (±6,5)	26,6 (±5,8)	0,298

Tabela 4. Análise morfométrica do íleo dos animais. Teste ANOVA. Dados expressos como média (±DP). Teste Kruskal-Wallis. Dados expressos como mediana (25%-75%). P1 = Ovoproduto 1. P2 = Ovoproduto 2. Ovo c. = Ovo comercial.

4 CONCLUSÃO GERAL

A partir das análises de caracterização das amostras pode-se concluir que ambos os ovoprodutos 1 e 2 têm as características descritas pelos fabricantes. Eles são constituídos de ovo em pó, dotados de IgY específicos à *Salmonella* Typhimurium e microbiologicamente adequados ao consumo humano e animal.

Com a experimentação *in vivo* conclui-se que, a suplementação com o ovoproduto 1 e o ovo comercial imunoestimulou as PPs do íleo dos animais. Por outro lado, a suplementação com o ovoproduto 2 por via oral não tem influência sobre os parâmetros analisados. Além disso, a suplementação dos animais com os ovoprodutos não alteraram a arquitetura ileal normal, portanto, não causaram prejuízos ao trato intestinal.

A partir da análise da imunogenicidade dos anticorpos IgY sugere-se que a IgY não é responsável pela imunoestimulação detectada, pois, as concentrações administradas dessa imunoglobulina ao modelo experimental murino, não estimulou a resposta imune humoral de IgA fecal anti-IgY.

Para análise dos efeitos da imunoestimulação observada sugere-se aos próximos estudos a quantificação dos anticorpos séricos e fecais IgA, IgG e IgE, todos responsáveis pelo estado de saúde sistêmico e local. Sugere-se também a detecção da (s) proteína (s) responsável (is) pela imunomodulação detectada.