



JÉSSICA CARLA DAS DÔRES RIBEIRO

**PROBIOTICS FOR BROILERS EXPOSED TO HEAT
STRESS FROM 15 DAYS OF AGE**

LAVRAS - MG

2021

JÉSSICA CARLA DAS DÔRES RIBEIRO

**PROBIOTICS FOR BROILERS EXPOSED TO HEAT STRESS FROM 15
DAYS OF AGE**

Master's dissertation presented to the Federal University of Lavras, as part of the requirements of the Graduate Program in Animal Science, area of concentration in Nutrition and Production of Non-Ruminants, to obtain the Master's title.

Advisor

Dra. Luciana de Paula Naves

Co-Advisors

Dra. Mariana Martins Drumond

Dra. Pamela Mancha-Agresti

Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

LAVRAS - MG

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Repositório
Insitucional da Biblioteca Universitária da UFLA**

Ribeiro, Jéssica Carla das Dôres.

Probiotics for broilers exposed to heat stress from 15 days of age
/ Jéssica Carla das Dôres Ribeiro. - 2021.

60 p. : il.

Orientador(a): Luciana de Paula Naves.

Coorientador(a): Mariana Martins Drumond, Pamela Mancha-
Agresti, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Poultry. 2. Performance. 3. Additive. I. Naves, Luciana de
Paula. II. Drumond, Mariana Martins. III. Mancha-Agresti, Pamela.
IV. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. V. Título.

JÉSSICA CARLA DAS DÔRES RIBEIRO

**PROBIOTICS FOR BROILERS EXPOSED TO HEAT STRESS FROM 15
DAYS OF AGE**

**PROBIÓTICOS PARA FRANGOS DE CORTE EXPOSTOS A ESTRESSE POR
CALOR A PARTIR DE 15 DIAS DE IDADE**

Master's dissertation presented to the Federal University of Lavras, as part of the requirements of the Graduate Program in Animal Science, area of concentration in Nutrition and Production of Non-Ruminants, to obtain the Master's title.

APPROVED on November 24, 2021.

Dra. Luciana de Paula Naves	UFLA
Dra. Mariana Martins Drumond	CEFET-MG
Dr. Paulo Borges Rodrigues	UFLA



Dra. Luciana de Paula Naves
Advisor

LAVRAS - MG

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar e me dar forças durante todo o caminho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade de grandes momentos que me proporcionaram enriquecimento profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e funcionários do DZO/UFLA, pelos ensinamentos transmitidos e apoio nas atividades desenvolvidas à campo e no laboratório.

À minha orientadora Profa. Dra. Luciana de Paula Naves, pela amizade, paciência, confiança, dedicação, incentivo e ensinamentos.

À Dra. Mariana Martins Drumond e Dra. Pamela Mancha-Agresti, pelos ensinamentos e dedicação na realização das análises de biologia molecular.

Ao Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo e seu grupo de pesquisa, pelo fornecimento dos probióticos, parceria na condução das análises realizadas no Laboratório de Genética Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais e pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca, por colaborar com sugestões e considerações importantes em relação ao trabalho.

Ao meu pai Carlos, por todo o apoio e à minha filha Aylla, por ser minha motivação em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Hélder, por ser meu parceiro e por tudo que representa pra mim.

Aos meus amigos Andressa, Maria Izabel, João Pedro, Daiane, Pedro, Daniela, Caroline e Joanna pela amizade, companheirismo, paciência e pelo apoio na condução do experimento. Sem a ajuda de vocês eu não seria nada!

Ao Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia Avícola, pelas experiências e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

E a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e incentivaram para a realização do presente trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O setor avícola demanda aditivos alternativos à antibióticos que possam ser utilizados como melhoradores de desempenho. Portanto, um experimento foi conduzido para avaliar os efeitos de probióticos sobre o desempenho, saúde intestinal e *status redox* de frangos de corte expostos a estresse por calor a partir dos 15 dias de idade. Foram utilizados 720 frangos Cobb-500 distribuídos em oito tratamentos (dietas), avaliados em seis repetições de 15 frangos cada, sendo: dieta basal (DB) sem antibiótico e probiótico (T1); DB suplementada com bacitracina de zinco (T2), DB suplementada com probiótico comercial de *Bacillus subtilis* DSM 17299 (T3); DB suplementada com probióticos não-comerciais de *Lactococcus lactis* NCDO 2118, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, *Escherichia coli* CEC 15 ou *Saccharomyces boulardii* (T4, T5, T6 e T7, respectivamente) e DB suplementada com a associação dos quatro probióticos não-comerciais (T8). O consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) foram determinados no período de 1 a 42 dias de idade dos frangos. Aos 42 dias de idade avaliou-se: rendimento de carcaça e cortes, deposição de gordura abdominal, temperatura cloacal, peso e comprimento do intestino, atividade das enzimas mieloperoxidase e peroxidase eosinofílica no jejuno, histomorfometria do jejuno, expressão gênica no jejuno (occludina, zonulina, interleucina-8, colecistoquinina, grelina e proteína de choque térmico-70) e fígado (proteína de choque térmico-70), além da mensuração do teor de malondialdeído (MDA) e atividade da superóxido dismutase (SOD) no intestino, fígado e sangue. Os frangos alimentados com a dieta T1 exibiram menor ($P < 0,05$) GP e peso vivo ao abate, além de pior CA ($P < 0,05$). Entretanto, as dietas contendo um ou o *blend* de probióticos resultaram em melhor GP, CA e peso vivo ao abate, semelhante ao observado para os frangos do grupo T2. A maior ($P < 0,05$) temperatura cloacal foi determinada nos frangos do grupo T6. Houve maior produção ($P < 0,05$) de MDA no fígado dos frangos dos grupos T1 e T7 e menor ($P < 0,05$) no grupo T3. No sangue, o teor de MDA foi maior ($P < 0,05$) nos frangos do T4 e menor ($P < 0,05$) no grupo T5. A dieta T8 resultou em maior ($P < 0,05$) atividade sérica da SOD, enquanto que as dietas T1 e T5 resultaram em menor ($P < 0,05$). Não houve efeito ($P > 0,05$) das dietas experimentais para os demais parâmetros avaliados. Conclui-se que frangos de corte desafiados por estresse por calor a partir dos 15 dias de idade e alimentados com dieta basal sem antibiótico e probiótico exibem pior desempenho. Entretanto, todos os probióticos não-comerciais avaliados, suplementados isoladamente ou como *blend*, mostraram-se eficientes em melhorar o desempenho dos frangos em magnitude semelhante ao observado quando a dieta contém o antibiótico bacitracina de zinco ou o probiótico comercial *Bacillus subtilis* DSM 17299.

Palavras-chave: Aditivo. Avicultura. Desempenho. Nutrição funcional. Saúde intestinal.

ABSTRACT

The poultry sector demands alternative additives to antibiotics that can be used as performance enhancers. Therefore, an experiment was conducted to evaluate the effects of probiotics on performance, intestinal health and redox status of broilers exposed to heat stress from 15 days of age. A total of 720 Cobb-500 broilers were distributed in eight treatments (diets), evaluated in six replicates of 15 broilers, as follows: basal diet (BD) without antibiotic and probiotic (T1); BD supplemented with zinc bacitracin (T2), BD supplemented with a commercial probiotic of *Bacillus subtilis* DSM 17299 (T3); BD supplemented with non-commercial probiotic of *Lactococcus lactis* NCDO 2118, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, *Escherichia coli* CEC 15 or *Saccharomyces boulardii* (T4, T5, T6 and T7, respectively), and BD supplemented with the association of the four non-commercial probiotics (T8). Feed intake (FI), weight gain (WG) and feed conversion (FC) were determined in the period from 1 to 42 days of age. Carcass and cuts yield, abdominal fat deposition, cloacal temperature, weight and length of intestine, activity of myeloperoxidase and eosinophilic peroxidase enzymes in the jejunum, jejunal histomorphometry, gene expression in the jejunum (occludin, zonulin, interleukin-8, cholecystokinin, ghrelin and heat shock protein-70) and liver (heat shock protein-70), in addition to malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity were measured in the intestine, liver and blood of broilers at 42 days old. Broilers fed diet T1 exhibited lower ($P < 0.05$) WG and live weight at slaughter, in addition to worse FC ($P < 0.05$). However, diets containing one or the probiotics blend resulted in better WG, FC and live weight at slaughter, similar to that observed for broilers of the T2 group. The highest ($P < 0.05$) cloacal temperature was determined in broilers of the T6 group. There was higher ($P < 0.05$) hepatic MDA concentration in the broilers of the T1 and T7 groups, and lower concentration ($P < 0.05$) in group T3. In blood, the MDA content was higher ($P < 0.05$) in the T4 group and lower ($P < 0.05$) in the T5 group. The T8 diet resulted in higher ($P < 0.05$) serum SOD activity, while diets T1 and T5 resulted in lower ($P < 0.05$). There was no effect ($P > 0.05$) of the experimental diets for the other evaluated parameters. It is concluded that broilers challenged by heat stress from 15 days of age and fed diet without antibiotic and probiotic exhibit worse performance. However, all non-commercial probiotics evaluated, supplemented alone or as a blend, were shown to be efficient in improving broiler performance in a similar magnitude to that observed when the diet contains the antibiotic zinc bacitracin or the commercial probiotic of *Bacillus subtilis* DSM 17299.

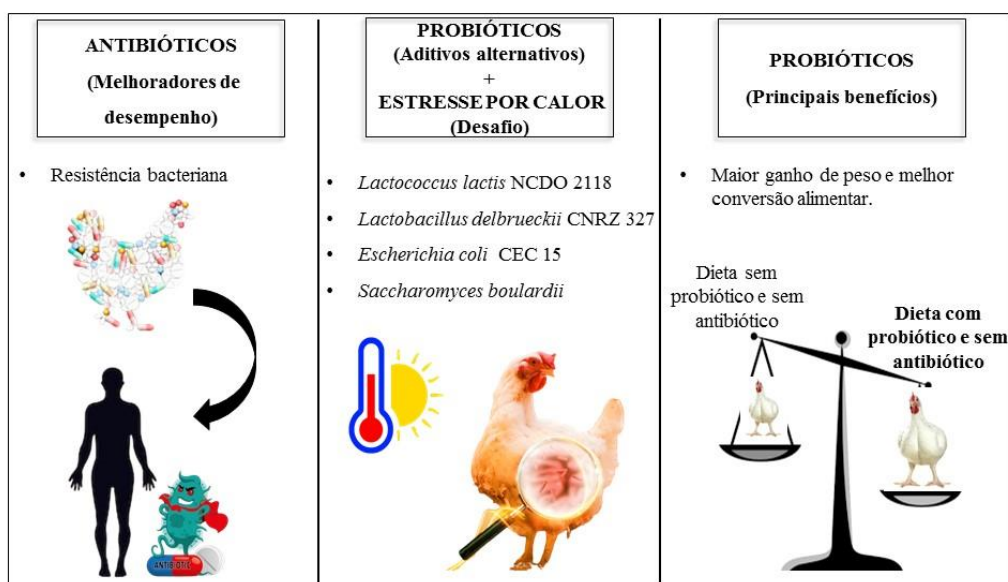
Keywords: Additive. Poultry. Performance. Functional nutrition. Gut health.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

Probióticos para frangos de corte expostos a estresse por calor a partir dos 15 dias de idade

Elaborado por **Jéssica Carla das Dôres Ribeiro** e orientado por **Luciana de Paula Naves**

A utilização de antibióticos como melhoradores de desempenho na produção animal vem sendo questionada e restringida devido a preocupações relacionadas a geração de resistência bacteriana à antibióticos utilizados na terapia humana. Portanto, a avicultura industrial tem buscado estratégias nutricionais para minimizar o uso de antibióticos como melhoradores do desempenho de frangos de corte. Neste contexto, tem recebido destaque os probióticos, definidos como microrganismos vivos capazes de beneficiar a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. Outro desafio atual da avicultura moderna consiste na elevação da temperatura ambiente, o que pode resultar em perdas econômicas ao setor avícola principalmente quando galpões de criação não climatizados são utilizados. Considerando que há relatos de que probióticos podem ser benéficos a frangos expostos a estresse por calor, a presente pesquisa foi conduzida para avaliar os efeitos de quatro probióticos não-comerciais, suplementados na dieta individualmente ou de maneira associada, sobre o desempenho, saúde intestinal e estresse oxidativo de frangos de corte expostos ao calor a partir dos 15 dias de idade. Em geral, foi observado que frangos alimentados com dietas contendo um ou os quatro probióticos apresentaram maior peso ao abate e melhor conversão alimentar, ou seja, maior capacidade de converter os nutrientes da dieta em peso corporal.



Probióticos não-comerciais e seu potencial como aditivo alternativo a antibióticos melhoradores do desempenho de frangos de corte submetidos a estresse por calor.

Dissertação de Mestrado em Zootecnia na UFLA, defendida em 24/11/2021.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Avicultura de corte e saúde intestinal das aves	3
2.2 Estresse por calor e os efeitos benéficos dos probióticos	4
2.3 Estresse oxidativo.....	6
2.4 Antibióticos melhoradores de desempenho	7
2.5 Probióticos	8
2.5.1 <i>Lactococcus lactis</i>	10
2.5.2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	11
2.5.3 <i>Escherichia coli</i>	12
2.5.4 <i>Saccharomyces boulardii</i>	13
REFERÊNCIAS.....	15
SECOND PART – MANUSCRIPT	23
Performance, intestinal health, and redox status of broilers fed diets containing probiotics and exposed to heat stress from 15 days of age.....	23

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango corresponde a uma importante atividade comercial, sendo a avicultura industrial um setor responsável por gerar proteína animal de alta qualidade nutricional a partir de rápidos ciclos produtivos, nos quais os frangos são abatidos em idade próxima aos 42 dias. Portanto, eficiência alimentar e alto desempenho das aves são fatores centrais para o sucesso na produção de frangos de corte. Neste contexto, desde meados do século passado, o uso de doses subterapêuticas de antibióticos como melhoradores de desempenho passou a ser empregado na produção mundial de frangos de corte como uma estratégia para diminuir prejuízos por mortes e doenças no plantel, colaborando para o estabelecimento de melhores índices produtivos (SALIM et al., 2018). Todavia, seu uso generalizado na produção animal tem gerado cada vez mais preocupações por parte do mercado consumidor, entidades de regulação e sociedade em geral no que diz respeito a maior resistência bacteriana à antibióticos utilizados na terapia humana. Acompanhando a proibição do uso de antibióticos como melhoradores de desempenho na produção de frangos de corte pela União Europeia em 2006, cada vez mais países tem também restringido seu uso desde então (SALIM et al., 2018). Diante deste cenário, o estabelecimento de estratégias alternativas ao uso de antibióticos como melhoradores de desempenho vem ao encontro de demandas do setor avícola e pesquisas prévias demonstram que a suplementação de dietas com probióticos pode beneficiar a saúde (WU et al., 2019) e melhorar o desempenho de frangos de corte (AMERAH et al., 2013; REIS et al., 2017).

Outro desafio atual da avicultura brasileira e de diversos outros países no mundo consiste na elevação da temperatura ambiente, reflexo direto do aquecimento global pelo qual o mundo está passando. Linhagens que exibem rápida taxa de crescimento são ainda mais susceptíveis ao estresse por calor, devido sua maior atividade metabólica e elevada produção de calor corporal (GREENE et al., 2019). O estresse por calor pode desencadear diversas alterações fisiológicas e metabólicas, tais como a elevação da temperatura corporal, depressão do sistema imune, prejuízos estruturais e funcionais do epitélio intestinal, desequilíbrio da microbiota intestinal entre outros, podendo impactar negativamente na produção avícola (LARA; ROSTAGNO, 2013; ROSTAGNO, 2020). Wang et al. (2018) demonstraram que a suplementação da dieta com *Bacillus subtilis*

melhorou o desempenho, comportamento e imunidade de frangos submetidos a estresse por calor. Sugiharto et al. (2017), em um trabalho de revisão, compilaram trabalhos nos quais probióticos dietéticos apresentaram benefícios na produção de frangos de corte, porém os autores ressaltam que é preciso considerar que diferentes probióticos podem desencadear respostas distintas e que, inclusive, há trabalhos nos quais nenhum efeito foi observado em frangos alimentados com dietas suplementadas com probióticos.

Até o momento, nenhum trabalho foi encontrado sobre os efeitos dos probióticos não-comerciais *Lactococcus lactis* NCDO 2118, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, *Escherichia coli* CEC 15 e *Saccharomyces boulardii* em frangos de corte criados em condição de estresse por calor. Portanto, este experimento foi conduzido para avaliar os efeitos desses quatro probióticos não-comerciais, suplementados na dieta individualmente ou como *blend*, sobre o desempenho, saúde intestinal e *status redox* de frangos de corte de rápido crescimento expostos a estresse por calor a partir dos 15 dias de idade, comparando-os a dietas suplementadas com o antibiótico bacitracina de zinco ou com o probiótico comercial de *Bacillus subtilis* DSM 17299.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Avicultura de corte e saúde intestinal das aves

A indústria avícola se destaca no mercado de alimentos por fornecer proteína de alta qualidade e menor custo para o consumidor. Além disso, é uma atividade relevante para a economia brasileira devido à geração de emprego e renda para o país (SILVA et al., 2012). De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2021), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, com 13,8 milhões de toneladas produzidas no ano de 2020 e um consumo per capita de 45,27 kg/hab. O Brasil também se destaca como o maior exportador mundial de carne de frango com 4,2 milhões de toneladas exportadas no ano de 2020 (ABPA, 2021).

Um dos principais fatores que contribuíram para a alta produtividade com redução nos custos de produção foram os avanços em nutrição associados a melhorias genéticas, de sanidade e ambiência (SAKOMURA et al., 2014). Visto que a nutrição das aves representa de 70 a 80% dos custos de produção, a porção absorptiva do intestino deve apresentar estruturas morfológicamente conservadas e em estado de homeostase para que haja o máximo aproveitamento dos nutrientes. Conseqüentemente, o “intestino saudável” favorece os processos de digestão e absorção intestinal, resultando em maior aproveitamento dos nutrientes da dieta, menor poluição ambiental, maior bem-estar e imunidade aos animais além de uma microbiota equilibrada (NAHM, 2002; COSTA et al., 2008). Assim, a manutenção de boa saúde do trato gastrointestinal (TGI) se faz necessária para regular e manter suas funções digestivas, absorptivas, metabólicas e endócrinas equilibradas de modo a beneficiar o hospedeiro (SVIHUS, 2014; PERRY, 2006; RONDÓN, 2019).

O TGI é composto por uma microbiota que inclui diversos microrganismos como bactérias, fungos e protozoários. De acordo com Stanley; Hughes; Moore (2014) e Oakley et al. (2014), a microbiota possui mais de 1000 espécies bacterianas que podem estar aderidas ao epitélio através das fímbrias ou livres na luz intestinal, podendo ser benéficas ou patogênicas para o hospedeiro. A eubiose intestinal, nada mais é do que a manutenção do equilíbrio entre esses microrganismos, que funciona como proteção à colonização de patógenos. Porém, quando há o desequilíbrio, ou seja, a disbiose intestinal, pode resultar em diarreias, infecções localizadas ou sistêmicas, redução da digestão e absorção de nutrientes, necrose intestinal e formação de toxinas, as quais podem prejudicar a produção de frangos de corte (MAIORKA, 2004). A colonização

intestinal efetiva ocorre logo após a eclosão do pintainho e tende a persistir ao longo do ciclo de vida da ave, passando a compor a microbiota normal. A partir dos quatro dias de vida ocorre aumento significativo no número de bactérias intestinais, com tendência à estabilidade a partir da segunda semana de vida, sendo variável em número e diversidade ao longo do TGI. Isso implica maior necessidade de atenção no atendimento das exigências nutricionais corretas, principalmente na fase inicial, devido à microbiota ainda em desenvolvimento e também à baixa capacidade de digestão.

2.2 Estresse por calor e os efeitos benéficos dos probióticos

No Brasil, são utilizados em sua maioria galpões convencionais para criação avícola, principalmente devido ao alto custo das instalações tecnificadas com ambiente controlado. Isso implica que nem sempre as condições de conforto térmico são possíveis durante todo o ciclo de produção, ocasionando assim um estresse por calor que pode prejudicar a fisiologia, imunologia, microbiologia e o bem-estar das aves (SUGIHARTO et al., 2017).

O estresse é uma resposta biológica adaptativa para restaurar a homeostase, sendo que o estresse térmico por calor é um dos desafios ambientais mais comum para as aves (ROSTAGNO, 2020). As aves são animais homeotérmicos, cuja temperatura interna permanece constante, independente das variações de temperatura do meio externo. Esses animais em estado de estresse, embora sejam capazes de realizar ajustes fisiológicos e comportamentais, frequentemente exibem pior desempenho zootécnico (MARCHINI, 2012). Estima-se que com o aumento de 1,0°C na temperatura ambiente durante os meses de verão há redução de 4,5% na produção de frangos de corte (JOHNSON et al., 2015).

A zona de conforto térmico para frangos de corte é variável com a idade, sendo que a temperatura ideal na primeira semana de vida varia de 32 a 35°C. Na segunda semana é de 29 a 32°C. Posteriormente, há uma diminuição gradativa até a quinta semana estabilizando-se em 20°C (ABREU; ABREU, 2011). A maturação do sistema termorregulador das aves ocorre por volta de 10 a 15 dias de idade (FURLAN; MACARI, 2008), sendo que após esse período as aves ficam mais suscetíveis a efeitos do estresse por calor. Foi observado que frangos de corte com seis semanas de idade expostos a apenas 3 horas diárias ao calor ($35 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ UR), apresentaram aumento na temperatura corporal e na taxa respiratória (HAN et al., 2010). Altas temperaturas também provocam efeitos negativos na produção de frangos de corte como

queda expressiva no consumo de alimentos (BOIAGO et al., 2013) e aumento no consumo de água tornando as excretas e a cama mais úmidas, diminuição da taxa de crescimento, piora na conversão alimentar, aumento da morbidade e mortalidade das aves. Além disso, compromete o sistema imunológico (JIANG et al., 2020), eleva a produção de corticosterona e reduz a atividade de enzimas antioxidantes (SUGIHARTO et al., 2017). O estresse por calor também pode desencadear alterações na arquitetura intestinal como redução do número de vilos e menor taxa de proliferação dos enterócitos, afetando diretamente a digestão e absorção de nutrientes (MARCHINI, 2012). Desta forma, o estresse térmico é responsável por perdas econômicas no setor avícola, principalmente durante algumas estações do ano e em regiões mais quentes (MIGNON-GRASTEAU et al., 2015).

A administração de probióticos para frangos de corte pode diminuir os efeitos do estresse por calor, reduzindo a concentração de corticosterona circulante (SOHAIL et al., 2012). Embora os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não sejam completamente compreendidos, há uma ligação entre o microbioma intestinal, eixo hipotalâmico-hipofisário e o estresse (GAREAU et al., 2007; RHEE; POTHOUKAKIS; MAYER, 2009). De acordo com Kawahito et al. (1994), o microbioma intestinal pode estimular neurônios sensoriais e a produção de citocinas. Assim, essas citocinas e outros fatores desconhecidos secretados pelas células enterocromafins pode influenciar a função da glândula adrenal diminuindo as concentrações de corticosterona.

Pesquisas com probióticos para frangos de corte relatam benefícios destes aditivos, como no estudo de Jahromi et al. (2016) em que a suplementação com uma mistura probiótica (*Lactobacillus pentosus* ITA23 e *Lactobacillus acidophilus* ITA44) nas dietas para frangos de corte submetidos à estresse por calor melhorou o ganho de peso médio diário das aves, a capacidade antioxidante do fígado, além de interferir positivamente na microbiota do ceco com aumento das bactérias benéficas e diminuição de *Escherichia. coli*. Foi observado por Ashraf et al. (2013) que houve aumento na altura e na área de superfície das vilosidades do jejuno, além de maior número de células caliciformes em frangos de corte expostos a estresse cíclico por calor por 8 h diárias (35°C, 75% UR) e alimentados com dieta contendo probióticos. No estudo de Abdelaqader et al. (2020) com administração dietética de *Bacillus subtilis* para frangos de corte expostos a estresse por calor crônico (30 ± 1°C e 64 ± 2% UR) de 22 a 35 dias de idade, foi observado que houve efeito positivo no ganho de peso, conversão alimentar, altura de vilosidade, área de superfície das vilosidades, profundidade de cripta e área de

células epiteliais absorptivas, além de maior número de bactérias benéficas intestinais (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*). Com isso, a suplementação de probióticos na dieta de frangos de corte pode ser uma alternativa viável para a indústria avícola podendo melhorar a saúde, desempenho e o bem-estar das aves criadas em condições de estresse térmico.

2.3 Estresse oxidativo

Durante o metabolismo celular, especialmente na mitocôndria, são formados produtos intermediários como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH) nomeados como espécies reativas de oxigênio (EROs). A síntese do radical superóxido acontece quando um elétron é adicionado a uma molécula de oxigênio, por exemplo no processo da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias. As demais EROs são sintetizadas a partir do superóxido. Porém, em contrapartida, o organismo desenvolveu mecanismos de defesa antioxidantes para neutralizar ou minimizar os danos aos tecidos e órgãos, devido à produção constante de radicais livres (ARAÚJO, 2015). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante.

As defesas antioxidantes no organismo podem ser não enzimáticas, sendo exercidas por vitaminas, produtos naturais e produtos sintéticos adicionados na dieta. Já as enzimas com ação antioxidantes compreendem principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (ARAÚJO, 2015). Para atacar bactérias invasoras indesejáveis, os macrófagos após fagocitose podem produzir elevadas concentrações de O_2^- e também outras EROs. De acordo com Li et al. (2012) foi observado que em condições *in vitro* o probiótico *Enterococcus faecium* EF1 possui capacidade de evitar a estimulação imunológica excessiva em macrófagos ativados. Isso implica que o mesmo pode inibir o excesso do radical O_2^- , que podem causar danos às células e, conseqüentemente, afetar o desempenho animal.

A enzima SOD é uma importante defesa às células que são expostas ao oxigênio por catalisar a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (ARAÚJO, 2015). Também elimina EROs nas células por meio de um mecanismo de reação em cadeia, além de proteger as membranas celulares da peroxidação lipídica. Durante o estresse térmico, por exemplo, o corpo gera maior quantidade de EROs, o que pode prejudicar as funções celulares do corpo, resultando em estresse oxidativo (SUMANU et al., 2019).

O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, sendo utilizado como biomarcador para a avaliação do estresse oxidativo (ARAÚJO, 2015). A peroxidação lipídica é a degradação oxidativa dos lipídios que ocorre como resultado de dano oxidativo por radicais livres, geralmente por EROs, que capturam os elétrons dos lipídios das membranas celulares, resultando em uma reação em cadeia bem definida com a formação de produtos finais, como o MDA. O aumento da concentração de MDA ocorre em resposta a situações estressantes em frangos de corte, incluindo o estresse por calor (SUMANU et al., 2019).

No estudo de Roushdy; Zagloul; El- Tarabany (2018), frangos de corte de 22 a 42 dias de idade em condições de estresse térmico crônico (4 ou 6 horas/dia a 36°C), exibiram pior conversão alimentar e aumento nos níveis séricos da enzima SOD. O grupo submetido à estresse térmico por 6 horas/dia apresentou maior nível sérico de MDA. De maneira semelhante, Wang et al. (2019) observaram que frangos de corte com 28 dias de idade expostos por 1 semana à temperatura de 36°C por 8 horas/dia, pioraram o desempenho e aumentou a produção de EROs e os níveis séricos de corticosterona e MDA. Liu et al. (2020) mostraram que 10 horas diárias à temperatura de 32°C durante 2 semanas para frangos de corte, induziu o estresse oxidativo com redução da atividade de enzimas antioxidantes e aumento de MDA no intestino delgado.

2.4 Antibióticos melhoradores de desempenho

Desde 1940, os antibióticos foram utilizados na produção animal tanto para controlar doenças infecciosas quanto como melhoradores de desempenho, quando em doses subterapêuticas (AL-KHALAIFAH, 2018), beneficiando a produtividade das aves com melhorias no ganho de peso, conversão alimentar, redução na taxa de mortalidade e na carga microbiana no TGI.

O sistema de produção livre de antibióticos tem sido cada vez mais requerido pelo mercado consumidor, principalmente após a proibição do uso de antibióticos como melhoradores de desempenho pela União Europeia em 2006. Assim, o desafio a ser enfrentado é manter a alta produtividade das aves e, ao mesmo tempo, garantir a segurança alimentar ao consumidor evitando contribuir para a possibilidade de geração de resistência bacteriana a antibióticos utilizados na terapia humana (DERAZ; ELKOMY; KHALIL, 2019). Outra preocupação é que com novas ferramentas nutricionais utilizadas na produção avícola pode-se aumentar o custo de produção, sendo

necessário também um incremento nos preços do produto final, muitas vezes não aceitos e pagos pelo consumidor (SMITH, 2011; CERVANTES, 2015).

Como parte das estratégias nutricionais, há crescente demanda por pesquisas que estabeleçam novos aditivos dietéticos capazes de minimizar os efeitos negativos do estresse por calor nas aves. Uma alternativa promissora corresponde ao uso de probióticos e prebióticos (DERAZ; ELKOMY; KHALIL, 2019), estudados como melhoradores do equilíbrio microbiano intestinal, protetores contra patógenos intestinais e moduladores do sistema imunológico (SONG et al., 2013). Na década de 70, Tortuero (1973) realizou a primeira tentativa de utilização de bactérias vivas em substituição aos antibióticos para aves. Desde então, diversos experimentos têm sido conduzidos com probióticos para a compreensão dos seus efeitos e mecanismos de ação em frangos de corte.

2.5 Probióticos

De acordo com a Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO, 2002), os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. O número de bactérias probióticas viáveis diminui drasticamente durante a passagem da digesta pelo TGI, devido à presença de ácidos, bile, enzimas e mudanças de pH, os quais ocasionam condições adversas. Além disso, a taxa de sobrevivência do probiótico no TGI depende também da maneira pela qual ele foi produzido e armazenado. Neste contexto, a utilização de agentes protetores apropriados aos probióticos pode aumentar sua viabilidade e taxa de colonização intestinal tanto em organismos hospedeiros humanos quanto nos animais (ARCHACKA et al., 2019).

A administração oral de probióticos tem sido utilizada para melhorar a microbiota e a funcionalidade intestinal, assim como para modular a produção de citocinas promovendo maior eficiência da mucosa intestinal contra patógenos (RAJPUT et al., 2013a). É importante ressaltar que durante os primeiros dias de vida dos pintos de corte, o sistema imunológico e a microbiota intestinal ainda se encontram em desenvolvimento. Portanto, o uso de probióticos dietéticos neste período mais crítico pode melhorar a saúde geral e o desempenho de frangos na fase inicial resultando, inclusive, em benefícios durante o restante do ciclo produtivo (MANAFI; HEDAYATI; MIRZAI, 2018). Seifi et al. (2017), também ressaltam que os probióticos devem ser utilizados desde o início do alojamento das aves, uma vez que esses animais ao

eclodirem do ovo são considerados estéreis do ponto de vista microbiológico, havendo assim a necessidade de uma rápida colonização do trato gastrointestinal das aves jovens pelas bactérias benéficas presentes no aditivo utilizado nas rações.

O uso de probióticos para otimizar o controle de doenças entéricas é relevante visto que podem suprimir a colonização intestinal por bactérias patogênicas por vários mecanismos de ação. Alguns dos mecanismos estão relacionados à competição por sítios de ligação, competição por nutrientes, antagonismo direto, estímulo do sistema imune, restauração da microbiota, efeito nutricional e redução/neutralização de enterotoxinas (BORTOLUZZI et al., 2019). Outros benefícios proporcionados pelos probióticos incluem: fermentação de substratos resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta e consequentemente redução do pH; produção de metabólitos, como vitaminas do complexo B e enzimas digestivas; estimulação do sistema imunológico influenciando a renovação dos enterócitos; diminuição dos níveis intestinais de amônia promovendo desintoxicação do conteúdo do cólon e redução das concentrações séricas de colesterol (RONDÓN, 2019).

A maioria dos probióticos utilizados pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (BALs), as quais são classificadas como Gram positivas produtoras de ácido láctico pela fermentação de carboidratos. As BALs produzem diversos compostos antimicrobianos como ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas. Todos estes compostos, principalmente as bacteriocinas (compostos proteicos), podem promover efeito bactericida com ou sem lise celular ou também ocasionar efeito bacteriostático, inibindo a multiplicação bacteriana (MORENO et al., 1999; SILVA et al., 2020). As cepas probióticas mais utilizadas são bactérias do tipo *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei* e *L. salivarius*), *Bacillus subtilis*, *Enterococcus* (*E. faecium* e *E. faecalis*) e *Bifidobacterium* spp., leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae*).

Embora a recomendação de uma composição probiótica ideal dependa de diversos fatores, é consenso que a eficácia dos probióticos é dependente da espécie microbiana, da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e do tempo de administração utilizado. É importante ressaltar que a administração dietética de uma mistura de microrganismos com ação probiótica pode ser uma estratégia interessante para aumentar a diversidade da microbiota e, consequentemente, melhorar a saúde intestinal. No estudo de Song et al. (2014), a suplementação da dieta com uma mistura

probiótica (*B. lincheniformis*, *B. subtilis* e *L. plantarum*) aumentou a altura das vilosidades no jejuno, o nível de ocludinas e a presença de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no intestino delgado, além de melhorar a conversão alimentar e diminuir a presença de coliformes no intestino delgado de frangos de corte submetidos ao estresse por calor (33°C, 10 h/dia). Tais resultados demonstram que a mistura de probióticos melhorou a saúde intestinal. De maneira semelhante, Sohail et al. (2012) observaram que a mistura probiótica (*L. plantarum*, *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *S. salivarius* ssp. *Thermophilus*, *E. faecium*) fornecida para frangos de corte após os 21 dias de idade e submetidos à estresse por calor, resultou em maior largura e área de superfície das vilosidades no íleo comparado ao grupo controle.

2.5.1 *Lactococcus lactis*

O gênero *Lactococcus* é classificado como uma BAL com importância econômica e de interesse industrial. Além de possuir genoma completamente sequenciado também se apresenta como um microrganismo de fácil manipulação e segurança (com o status de GRAS - *Generally Recognized As Safe*). É amplamente utilizado na indústria alimentícia para fabricação de produtos lácteos e, atualmente, há crescentes pesquisas sobre sua utilização para a produção de vacinas vivas de mucosa e aplicações promissoras como suplementos probióticos (ARCHACKA et al., 2019). Além disso, o seu uso prolongado tem menor potencial imunotolerante ou efeitos colaterais, por se tratar de uma bactéria não invasiva e não comensal.

A fim de conceder benefícios à saúde no organismo do hospedeiro, os *L. lactis* devem permanecer metabolicamente ativos no cólon. Por isso, devem ser resistentes à acidez gástrica quando administrados concomitantemente com alimentos, mantendo-se então biologicamente ativos durante a passagem pelo TGI (ARCHACKA et al., 2019).

A maioria dos trabalhos com BALs são com espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, porém cepas como *L. lactis* também exibem efeitos benéficos no TGI e possuem propriedades probióticas. Por exemplo, a subespécie *lactis* NCDO 2118 é uma cepa não láctea, isolada de ervilha congelada e fermentadora de xilose, por ser associada às plantas (SIEZEN et al., 2008). Tal cepa é capaz de produzir o ácido gama-aminobutírico (GABA), produto da descarboxilação do L-glutamato mediado pela enzima glutamato descarboxilase, sendo o neurotransmissor mais amplamente distribuído no sistema nervoso central de vertebrados (MAZZOLI et al., 2010). Foi

relatado por Dai et al. (2011) efeitos benéficos do GABA em frangos de corte submetidos ao estresse por calor (30 a 34°C, por 9h diárias), observando-se melhor desempenho e melhora nas características de carcaça. Além disso, houve aumento nas concentrações séricas de T3, insulina, glutamina, glutamato e redução de corticosterona. Os autores reportam que GABA é um agente anti-estresse que influencia na atividade da tireoide e inibe interneurônios hipotalâmicos e vias aferentes envolvidas na regulação de hormônio adrenocorticotrópico.

Os efeitos de *L. lactis* NCDO 2118 ainda foram pouco elucidados, porém Luerce et al. (2014) avaliou o potencial de modulação imunológica da linhagem em condições *in vitro* e observou que a mesma foi capaz de reduzir os níveis de secreção de IL-8 induzida por IL-1 β em células Caco-2, sugerindo um efeito anti-inflamatório. No mesmo estudo, porém em condições *in vivo*, a administração oral da cepa aliviou os sintomas de colite em camundongos associado ao aumento na produção de IL-6 e IL-10 no cólon, além do número aumentado de células T reguladoras (CD4 +) em linfonodos mesentéricos e no baço. Já no estudo de Sousa (2013) com camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*, houve efeito da administração oral de *lactis* NCDO 2118 apenas na redução da atividade das enzimas N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO), que parece estar relacionada com a diminuição da inflamação intestinal.

Portanto, visto que esta linhagem possui propriedades anti-inflamatórias e ainda não foram encontradas pesquisas na literatura científica com a utilização da mesma para frangos de corte, há necessidade de avaliação dos seus possíveis efeitos probióticos e de ser uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais em aves.

2.5.2 *Lactobacillus delbrueckii*

O gênero *Lactobacillus* é um dos maiores grupos de BALs compreendendo cerca de 50 espécies, sendo que *L. delbrueckii* apresenta três subespécies (*delbrueckii*, *bulgaricus* e *lactis*). Estas bactérias tem sido muito utilizadas nos processos de fermentação de alimentos, principalmente em laticínios, na fabricação de queijos e iogurte (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2004).

É uma bactéria Gram positiva, longa e filamentosa, considerada acidúrica ou acidofílica, pois requer para seu crescimento ótimo um pH baixo (4,6 a 5,4) (CANBAY et al., 2015). Os *Lactobacillus* constituem uma porção significativa da microbiota intestinal, sendo alguns dos seus benefícios probióticos já relatados como: aumento da

produção de imunoglobulinas, indução da expressão de interferon em macrófagos, acidificação do ambiente local, efeitos hipocolesterolêmicos, ligação de compostos mutagênicos, produção de bacteriocinas e prevenção de adesão de bactérias patogênicas às células epiteliais (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2004). No sequenciamento do genoma de *Lactobacillus delbrueckii*, foi confirmado que a cepa é um membro do complexo *acidophilus*, grupo de *Lactobacillus* que contém espécies com propriedades probióticas (NICOLAS et al., 2007; ROCHA et al., 2012).

A cepa *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 327 é uma bactéria láctea isolada de queijo, capaz de suprimir a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) em células epiteliais intestinais *in vitro* por meio da redução da fosforilação de I κ B (inibidor da NF- κ B) (ROCHA et al., 2012). O NF- κ B é um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória. Em posterior estudo *in vivo* com camundongos, com colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS), Rocha et al. (2014) observaram que *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 327 reduziu produção de TGF- β , IL-6 e IL-12 no cólon e TGF- β e IL-6 no baço. Também ocasionou uma expansão de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ nos linfonodos cecais, além de quase anular alterações histológicas intestinais no cólon (perda de arquitetura da mucosa, edema, depleção de células caliciformes, etc.) causadas por DSS. Este foi o primeiro estudo a mostrar que *Lactobacillus* administrados via oral podem não apenas modular as respostas imunológicas das mucosas, mas também sistêmicas, e constituir um tratamento eficaz para as doenças inflamatórias intestinais. Considerando os resultados benéficos obtidos em camundongos no estudo de Rocha et al. (2014), há o interesse em verificar se *L. delbrueckii lactis* CNRZ 327 exibe ação probiótica para frangos de corte, já que essa informação não foi encontrada na literatura científica até o presente momento.

2.5.3 *Escherichia coli*

Desde o momento da eclosão, o pintainho é exposto a diversos microrganismos presentes no ambiente, na água e na ração, que podem colonizar seu TGI. Além disso, a colonização por *Escherichia* pode ocorrer antes mesmo da eclosão, por meio da transmissão vertical *in ovo*, quando há exposição à essa bactéria (PEDROSO; LEE, 2015).

Escherichia coli é uma proteobactéria, Gram negativa e anaeróbia facultativa presente em altas concentrações na microbiota intestinal nos primeiros dias de vida dos pintainhos. Jurburg et al. (2019) observaram que em pintainhos de um dia de idade houve

predomínio de *Escherichia/Shigella* no conteúdo fecal, representando 42,5% de toda comunidade microbiana, e que houve diminuição gradual até o 28º dia, quando a população de *E. coli* foi reduzida a aproximadamente 0,1%.

Há muitas controvérsias na literatura, pois a *E. coli* pode se apresentar como cepas comensais, probióticas ou altamente patogênicas, sendo a *E. coli* comensal residente na camada de muco e adaptada para o uso deste componente como fonte de nutrientes ao seu metabolismo. Algumas *E. coli* podem alterar a estrutura e funcionalidade do epitélio intestinal comprometendo o desenvolvimento saudável da microbiota, enquanto outras podem estimular a maturação de algumas células que contribuem para a homeostase intestinal e maturação do sistema imune (ESCRIBANO-VASQUEZ et al., 2019).

Analisando amostras de íleo e cólon, Escribano-Vasquez et al. (2019) verificaram que a inoculação de *E. coli* CEC 15 em camundongos aumentou a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no *turnover* de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (*duox2*, *duoxa2*, *nos2*, *gpx2* e *nox1*), peptídeos antimicrobianos (*reg3-γ*, *reg3-β*, *pla2g2a*, *ang4*, *fut2*) e fatores envolvidos na resposta imune (interleucinas, TNF- α , IFN- γ) os quais estão relacionados à manutenção da homeostase intestinal. Considerando os resultados benéficos obtidos com camundongos no estudo de Escribano-Vasquez et al. (2019), há o interesse em verificar se a cepa não-patogênica *E. coli* CEC 15 exibe ação probiótica para frangos de corte, já que essa informação não foi encontrada na literatura científica até o presente momento.

2.5.4 *Saccharomyces boulardii*

A microbiota comensal é composta por aproximadamente 10^{14} células de diferentes microrganismos, sendo que leveduras compõem uma fração menor que 0,1% da mesma. As leveduras pertencem ao grupo de células eucarióticas simples, diferenciando-se dos probióticos bacterianos que são células procariotas. Se desenvolvem bem em pH entre 7 e 8, porém seu crescimento ideal ocorre entre 4,5 e 6,5. Algumas espécies ainda podem crescer em pH 3,0 e tolerar condições altamente ácidas em pH 1,5 sendo resistentes a enzimas gastrointestinais, sais biliares, ácidos orgânicos e variações de pH e temperatura (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007). Portanto, são promissoras como probióticos devido sua ação em diferentes locais no TGI, além de resistir à antibióticos e não transmitir material genético, proporcionando maior segurança em combinação com antibioticoterapia (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007).

Dentre as leveduras probióticas se destaca a *Saccharomyces boulardii*, isolada pela primeira vez a partir de frutos de lichia por Henri Boulard na década de 1920 e é um dos probióticos que oferece características benéficas à saúde intestinal. Esta cepa pode exercer efeito benéfico contra patógenos entéricos, como *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigela* e *E. coli*, sendo seus principais mecanismos de ação a produção de fatores que neutralizam as toxinas bacterianas e modulação via sinalização da célula hospedeira na resposta pró inflamatória durante a infecção bacteriana (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007). Os resultados de Manafi; Hedayati; Mirzaie (2018) mostraram que frangos de corte suplementados com *S. boulardii* apresentaram menor número de coliformes como *Salmonella* e *E. coli* no ceco, além de melhorar o desempenho e a morfologia das vilosidades intestinais.

Rajput et al. (2013a) observaram que *S. boulardii* melhora significativamente o peso vivo, modula a morfologia intestinal (aumento dos níveis de ocludinas e claudinas, altura e largura das vilosidades e o número de células caliciformes) e está envolvida no mecanismo de desenvolvimento da imunidade da mucosa em frangos de corte. Além disso, pode melhorar a atividade das enzimas digestivas e funções antioxidantes, sendo considerado um aditivo antioxidante natural para rações de frangos de corte (RAJPUT et al., 2013b). Também exerce efeitos sobre a prevenção e tratamento de diarreias, sendo que após uma disbiose a *S. boulardii* proporciona reestabelecimento mais rápido da microbiota saudável (MORÉ; SWIDSINSKI, 2015).

Portanto, estudos que avaliam o potencial probiótico de *S. boulardii* para frangos de corte ainda são escassos e ainda não se conhece os efeitos desta levedura quando os mesmos são criados em condição de estresse por calor. Diante do exposto, o presente estudo faz-se necessário para compreensão desses fatores.

REFERÊNCIAS

- ABDELQADER, A.; ABUAJAMIEH, M.; HAYAJNEH, F.; AL-FATAFTAH, A. R. Probiotic bacteria maintain normal growth mechanisms of heat stressed broiler chickens. **Journal of Thermal Biology**, v. 92, 8 p., 2020.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2021**. Disponível em: <https://bit.ly/3eyFRNO> Acesso em 08 nov. 2021.
- ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 256, p.1-14, 2011.
- AL-KHALAIFAH, H. S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. **Poultry Science**, v. 97, n.11, p. 3807-3815, 2018.
- AMERAH, A. M.; VAN RENSBURG, C. J.; PLUMSTEAD, P. W.; KROMM, C.; DUNHAM, S. Effect of feeding diets containing a probiotic or antibiotic on broiler performance, intestinal mucosa-associated avian pathogenic *E. Coli* and litter water-soluble phosphorus. **Journal of Applied Animal Nutrition** v. 1, n. 7, 2013.
- ARAÚJO, R. S. **Expressão gênica em frangos de corte submetidos a diferentes níveis de alimentos alternativos**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2015.
- ARCHACKA, M.; BIALAS, W.; DEMBCZYPNSKI, R.; OLEJNIK, A.; SIP, A.; SZYMANOWSKA, D.; CELINSKA, E.; JANKOWSKI, T.; OLEJINIK, A.; ROGODZINSKA, M. Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. **Food Chemistry**, v. 274, p. 733-742, 2019.
- ASHRAF, S.; ZANEB, H.; YOUSAF, M. S.; IJAZ, A.; SOHAIL, M. U.; MUTI, S.; USMAN, M. M.; IJAZ, S.; REHMAN, H. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 68-73, 2013.
- BOIAGO, M. M.; BORBA, H.; SOUZA, P. A.; SCATOLINI, A. M.; FERRARI, F. B.; GIAMPIETRO-GANECO, A. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes fontes de selênio, zinco e manganês, criados sob condições de estresse térmico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 241-247, 2013.
- BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B. S.; DORIGAM, J. C. P.; MENCONI, A.; SOKALE, A.; DORANALLI, K.; APPLGATE, T. J. *Bacillus subtilis* DSM 32315 supplementation attenuates

the effects of *Clostridium perfringens* challenge on the growth performance and intestinal microbiota of broiler chickens. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, 2019.

CANBAY, E.; HABIP, A.; KARA, G.; EREN, Z.; AKYILMAZ, E. A microbial biosensor based on *Lactobacillus delbruecki* sp. bacterial cells for simultaneous determination of lactic and pyruvic acid. **Food Chemistry**, v. 169, p. 197-202, 2015.

CERVANTES, H. M. Antibiotic-free poultry production: is it sustainable? **Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 1, p. 91-97, 2015.

COSTA, F. G. P.; GOULART, C. C.; FIGUEREIDO, D. F.; OLIVEIRA, C. F. S.; SILVA, J. H. V. Economic and environmental impact fusing exogenous enzymes on poultry feeding. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 4, p. 311-314, 2008.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 767-778, 2007.

DAI, S. F.; GAO, F.; ZHANG, W. H.; SONG, S. X.; XU, X. L.; ZHOU, G. H. Effects of dietary glutamine and gamma-aminobutyric acid on performance, carcass characteristics and serum parameters in broilers under circular heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, n. 1-2, p. 51-60, 2011.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 106-122, 2004.

DERAZ, S. F.; ELKOMY, A. E.; KHALIL, A. A. Assessment of probiotic-supplementation on growth performance, lipid peroxidation, antioxidant capacity, and cecal microflora in broiler chickens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2019.

ESCRIBANO-VASQUEZ, U.; VERSTRAETEN, S.; MARTIN, R.; CHAIN, F.; LANGELLA, P.; THOMAS, M.; CHERBUY, C. The commensal *Escherichia coli* CEC 15 reinforces intestinal defences in gnotobiotic mice and is protective in a chronic colitis mouse model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 17 p., 2019.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**, 2002. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Acesso em 12 dez. 2021.

FURLAN, R. L.; MACARI, M. Termorregulação. In: Macari, M.; Furlan R.L.; Gonzales, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2ed. Jaboticabal: Funesp, p.209-230, 2008.

GAREAU, M. G.; JURY, J.; MACQUEEN, G.; SHERMAN, P. M.; PERDUE, M. H. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. **Gut**, v. 56, n. 11, p. 1522-1528, 2007.

GREENE, E. S.; RAJAEI-SHARIFABADI, H.; DRIDI, S. Feather HSP70: a novel non-invasive molecular marker for monitoring stress induced by heat exposure in broilers. **Poultry Science**, v. 98, n. 9, p. 3400-3404, 2019.

HAN, A.Y.; ZHANG, M.H.; ZUO, X.L.; ZHENG, S.S.; ZHAO, C.F.; FENG, J.H.; CHENG, C. Effect of acute heat stress on calcium concentration, proliferation, cell cycle, and interleukin-2 production in splenic lymphocytes from broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, n. 10, p. 2063-2070, 2010.

JAHROMI, M. F.; ALTAHER, Y. W.; SHOKRYAZDAN, P.; EBRAHIMI, R.; EBRAHIMI, M.; IDRUS, Z.; TUFARELLI, V.; LIANG, J. B. Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 7, p. 1099-1110, 2016.

JIANG, S.; MOHAMMED, A. A.; JACOBS, J. A.; CRAMER, T. A.; CHENG, H. W. Effect of symbiotic on thyroid hormones, intestinal histomorphology, and heat shock protein 70 expression in broiler chickens reared under cyclic heat stress. **Poultry Science**, v. 99, n. 1, p. 142-150, 2020.

JOHNSON, J. S.; ABUAJAMIEH, M.; FERNANDEZ, M. V.; SEIBERT, J. T.; STOAKES, S. K.; NTEEBA, J.; KEATING, A. F.; ROSS, J. W.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. Thermal stress alters postabsorptive metabolism during pre- and postnatal development. In: Sejian V.; Gaughan J.; Baumgard L.; Prasad C. (Eds.) **Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation**. Springer, New Delhi, 2015. p. 61-79.

JURBURG, S. D.; BROUWER, M. S. M.; CECCARELLI, D.; VAN DER GOOT, J.; JANSMAN, A. J. M.; BOSSERS, A. Patterns of community assembly in the developing chicken microbiome reveal rapid primary succession. **Microbiology Open**, v. 8, n. 9, 10 p., 2019.

KAWAHITO, Y.; SANO, H.; KAWATA, M.; YURI, K.; MUKAI, S.; YAMAMURA, Y.; KATO, H.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L.; KONDO, M. Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon. **Gastroenterology**, v. 106, n. 4, p. 859-865, 1994.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 356-369, 2013.

LI, W.; HUANG, Q.; LI, Y.; RAJPUT, I. R.; HUANG, Y.; HU, C. Induction of probiotic strain *Enterococcus faecium* EF1 on the production of cytokines, superoxide anion and prostaglandin E2 in a macrophage cell line. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 4, p. 530-534, 2012.

LIU, G.; ZHU, H.; MA T.; YAN, Z.; ZHANG, Y.; GENG, Y.; ZHU, Y.; SHI, Y. Effect of chronic cyclic heat stress on the intestinal morphology, oxidative status and cecal bacterial communities in broilers. **Journal of Thermal Biology**, v. 91, 47 p., 2020.

LUERCE, T. D.; GOMES-SANTOS, A. C.; ROCHA, C. S.; MOREIRA, T. G.; CRUZ, D. N.; LEMOS, L.; SOUSA, A. L.; PEREIRA, V. B.; AZEVEDO, M.; MORAES, K.; CARA, D. C.; LEBLANC, J G.; AZEVEDO, V.; FARIA, A. M. C.; MIYOSHI, A. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. **Gut Pathogens**, v. 6, n. 33, 11 p., 2014.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. **In: Anais do V Simpósio Brasil Sul de Avicultura**. Chapecó - Santa Catarina, Brasil, p. 26-41, 2004.

MANAFI, M.; HEDAYATI, M.; MIRZAIE, S. Probiotic *Bacillus species* and *Saccharomyces boulardii* improve performance, gut histology and immunity in broilers chickens. **South African Journal of Animal Science**, v. 48, n. 2, 11 p., 2018.

MARCHINI, C. F. P. **Desempenho, alterações ósseas e intestinais de frangos de corte submetidos ao estresse cíclico por calor**. 2012. 110 f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal - Produção Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MAZZOLI, R.; PESSIONE, E.; DUFOUR, M.; LAROUTE, V.; GIUFFRIDA, M. G.; GIUNTA, C.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LOUBIÈRE, P. Glutamate-induced metabolic changes in *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during GABA production: combined transcriptomic and proteomic analysis. **Amino Acids**, v. 39, n. 3, p.727-737, 2010.

MIGNON-GRASTEAU, S.; MORERI, U.; NARCY, A.; ROUSSEAU, X.; RODENBURG, T. B.; TIXIER-BOICHARD, M.; ZERJAL, T. Robustness to chronic heat stress in laying hens: a meta-analysis. **Poultry Science**, v. 94, n. 4, p. 586-600, 2015.

MORÉ, M.; SWIDSINSKI, A. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis - a review. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 8, p. 237-255, 2015.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITAO, M. F. F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Food Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.

NAHM, K. H. Efficient feed nutrient utilization to reduce pollutants in poultry and swine manure. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 1-16, 2002.

NICOLAS, P.; BESSIERES, P.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E.; VAN DE GUCHTE, M. Extensive horizontal transfer of core genome genes between two *Lactobacillus* species found in the gastrointestinal tract. **BMC Ecology and Evolution**, v. 7, n. 141, 2007.

OAKLEY, B. B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H.; KIM, W. K.; MAURER, J. J.; PEDROSO, A.; LEE, M. D.; COLLETT, S. R.; JOHNSON, T. J.; COX, N. A. The chicken gastrointestinal microbiome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 360, n. 2, p. 100-112, 2014.

PEDROSO, A. A.; LEE, M. D. The composition and role of the microbiota in chickens. *In*: NIEWOLD, T. (org.). **Intestinal Health: Key to maximise growth performance in livestock**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2015. p. 21-37.

PERRY, G. C. **Avian gut function in health and disease**. University of Bristol, UK, 2006. 384 p.

RAJPUT, I. R.; LI, L. Y.; XIN, X.; WU, B. B.; JUAN, Z. L.; CUI, Z. W.; YU, D. Y.; LI, W. F. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 4, p. 956-965, 2013a.

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

REIS, M. P.; FASSANI, E. J.; GARCIA JÚNIOR, A. A. P.; RODRIGUES, P. B.; BERTECHINI, A. G.; BARRETT, N.; PERSIA, M. E.; SCHIMIDT, C. J. Effect of *Bacillus subtilis* (DSM 17299) on performance, digestibility, intestine morphology, and pH in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 26, n. 4, p. 573-583, 2017.

RHEE, S. H.; POTHOUKAKIS, C.; MAYER, E. A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. **Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 5, p. 306-314, 2009.

ROCHA, C. S.; GOMES-SANTOS, A. C.; MOREIRA, T. G.; DE AZEVEDO, M.; LUERCE, T. D.; MARIADASSOU, M.; DELAMARE, A. P. L.; LANGELLA, P.; MAGUIN, E.; AZEVEDO, V.; DE FARIA, A. M. C.; MIYOSHI, A.; VAN DE GUCHTE, M. Local and systemic immune mechanisms underlying the anti-colitis effects of the aairy bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. **Plos One**, v. 9, n. 1, 8 p., 2014.

ROCHA, C. S.; LAKHDARI, O.; BLOTTIERE, H. M.; BLUGEON, S.; SOKOL, H.; BERMUDEZ-HUMARAN, L. G.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; DORÉ, J.; LANGELLA, P.;

MAGUIN, E.; VAN DE GUCHTE, M. Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 4, p. 657-666, 2012.

RONDÓN, E. O. O. Holistic view of intestinal health in poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 1-8, 2019.

ROSTAGNO, M. H. Effects of heat stress on the gut health of poultry. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 4, p 1-9, 2020.

ROUSHDY, E. M.; ZAGLOOL, A. W.; EL-TARABANY, M. S. Effects of chronic thermal stress on growth performance, carcass traits, antioxidant indices and the expression of HSP70, growth hormone and superoxide dismutase genes in two broiler strains. **Journal of Thermal Biology**, v. 74, p. 337-343, 2018.

SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSECHILD, L. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 678 p., 2014.

SALIM, H. M.; HUQUE, K. S.; KAMARUDDIN, K. M.; BEG, M. D. A. H. Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. **Science Progress**, v. 101, n. 1, p. 52-75, 2018.

SEIFI, K.; TORSHIZI, M. A. K.; RAHIMI, S.; KAZEMIFARD, M. Efficiency of early, single-dose probiotic administration methods on performance, small intestinal morphology, blood biochemistry, and immune response of Japanese quail. **Poultry Science**, v. 96, n. 7, p. 2151-2158, 2017.

SIEZEN, R. J.; STARRENBURG, M. J.; BOEKHORST, J.; RENCKENS, B.; MOLENAAR, D.; VAN HYLCKAMA Vlieg, J. E. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 424-436, 2008.

SILVA, H. R.; NASCIMENTO, R. C. V.; FURTADO, M. C.; BALIEIRO, A. L.; BARBOSA, J. B. Technological applications of lactic acid bacteria (BALs) in milk products. **Revista Ingi**, v. 4, n. 1, p.681-690, 2020.

SILVA, W. T. M.; BORSATTI, L.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; POZZA, M. S. S.; GIUSTI, L. D. B. Inulina na produção de frangos de corte. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 3, p.16-24, 2012.

SMITH, J. A. Experiences with drug-free broiler production. **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2670-2678, 2011.

SOHAIL, M. U.; HUME, M. E.; BYRD, J. A.; NISBET, D. J.; IJAZ, A.; SHABBIR, M. Z.; REHMAN, H. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2235-2240, 2012.

SONG, J.; JIAO, L. F.; XIAO, K.; LUAN, Z. S.; SHI, B.; ZHAN, X. A. Cello-oligosaccharide ameliorates heat stress-induced impairment of intestinal microflora, morphology and barrier integrity in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, n. 3-4, p. 175-181, 2013.

SONG, J.; XIAO, K.; KE, Y. L.; JIAO, L. F.; HU, C. H.; DIAO, Q. Y.; SHI, B.; ZOU, X. T. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p. 581-588, 2014.

SOUSA, R. O. **Administração oral das bactérias probióticas *Lactobacillus* spp. controla a translocação bacteriana e reduz a ileíte experimental induzida por *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

STANLEY, D.; HUGHES, R. J.; MOORE, R. J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n.10, p. 4301-4310, 2014.

SUGIHARTO, S.; YUDIARTI, T.; ISROLI, I.; WIDIASTUTI, E.; KUSUMANTI, E. Dietary supplementation of probiotics in poultry exposed to heat stress- a review. **Annals of Animal Science**, v. 17, n. 3, p. 591-604, 2017.

SUMANU, V. O.; ALUWONG, T.; AYO, J. O.; OGBUAGU, N. E. Evaluation of changes in tonic immobility, vigilance, malondialdehyde, and superoxide dismutase in broiler chickens administered fisetin and probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) and exposed to heat stress. **Journal of Veterinary Behavior**. v. 31, p. 36-42, 2019.

SVIHUS, B. Function of the digestive system. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 23, n. 2, p.306-314, 2014.

TORTUERO, F. Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome intestinal flora. **Poultry Science**, v. 52, n. 1, p. 197-203, 1973.

WANG, J.; XUE, X.; LIU, Q.; ZHANG, S.; PENG, M.; ZHOU, J.; CHEN, L.; FANG, F. Effects of duration of thermal stress on growth performance, serum oxidative stress indices, the expression and localization of ABCG2 and mitochondria ROS production of skeletal muscle, small intestine and immune organs in broilers. **Journal of Thermal Biology**, v. 85, 10 p., 2019.

WANG, W. C.; YAN, F. F.; HU, J. Y.; AMEN, O. A.; CHENG, H. W. Supplementation of *Bacillus subtilis* based probiotic reduces heat stress related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. **Journal Of Animal Science**, v. 96, p. 1654-1666, 2018.

WU, Y.; WANG, B.; ZENG, Z.; LIU, R.; TANG, L.; GONG, L.; LI, W. Effects of probiotics *Lactobacillus plantarum* 16 and *Paenibacillus polymyxa* 10 on intestinal barrier function, antioxidative capacity, apoptosis, immune response, and biochemical parameters in broilers. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 5028-5039, 2019.

SECOND PART – MANUSCRIPT

Preliminary version written according to ABNT standards – Scientific Journal in selection phase

Performance, intestinal health, and redox status of broilers fed diets containing probiotics and exposed to heat stress from 15 days of age

Jéssica Carla da Dôres Ribeiro et al.

ABSTRACT

The poultry sector demands alternative additives to antibiotics that can be used as performance enhancers. Therefore, an experiment was conducted to evaluate the effects of probiotics on performance, intestinal health and redox status of broilers exposed to heat stress from 15 days of age. A total of 720 Cobb-500 broilers were distributed in eight treatments (diets), evaluated in six replicates of 15 broilers, as follows: basal diet (BD) without antibiotic and probiotic (T1); BD supplemented with zinc bacitracin (T2), BD supplemented with a commercial probiotic of *Bacillus subtilis* DSM 17299 (T3); BD supplemented with non-commercial probiotic of *Lactococcus lactis* NCDO 2118, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, *Escherichia coli* CEC 15 or *Saccharomyces boulardii* (T4, T5, T6 and T7, respectively), and BD supplemented with the association of the four non-commercial probiotics (T8). Feed intake (FI), weight gain (WG) and feed conversion (FC) were determined in the period from 1 to 42 days of age. Carcass and cuts yield, abdominal fat deposition, cloacal temperature, weight and length of intestine, activity of myeloperoxidase and eosinophilic peroxidase enzymes in the jejunum, jejunal histomorphometry, gene expression in the jejunum (occludin, zonulin, interleukin-8, cholecystokinin, ghrelin and heat shock protein-70) and liver (heat shock protein-70), in addition to malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity were measured in the intestine, liver and blood of broilers at 42 days old. Broilers fed diet T1 exhibited lower ($P < 0.05$) WG and live weight at slaughter, in addition to worse FC ($P < 0.05$). However, diets containing one or the probiotics blend resulted in better WG, FC and live weight at slaughter, similar to that observed for broilers of the T2 group. The highest ($P < 0.05$) cloacal temperature was determined in broilers of the T6 group. There was higher ($P < 0.05$) hepatic MDA concentration in the broilers of the T1 and T7 groups, and lower concentration ($P < 0.05$) in group T3. In blood, the MDA content was higher ($P < 0.05$) in the T4 group and lower ($P < 0.05$) in the T5 group. The T8 diet resulted in higher ($P < 0.05$) serum SOD activity, while diets T1 and T5 resulted

in lower ($P < 0.05$). There was no effect ($P > 0.05$) of the experimental diets for the other evaluated parameters. It is concluded that broilers challenged by heat stress from 15 days of age and fed diet without antibiotic or probiotic exhibit worse performance. However, all non-commercial probiotics evaluated supplemented alone or as a blend showed to be efficient in improving the broiler performance in a similar magnitude to that observed when the diet contained the antibiotic zinc bacitracin or the commercial probiotic of *Bacillus subtilis* DSM 17299.

Keywords: Feed additive. Functional nutrition. Gut health. Performance. Poultry.

1 INTRODUCTION

Brazil has a prominent position in global agribusiness, being the largest exporter and the third-largest producer of broiler meat, with 4.292 million tons exported and 13.845 million tons produced in 2020 (ABPA, 2022). Industrial poultry is a sector responsible for generating animal protein of high nutritional quality from fast production cycles, in which broilers are slaughtered at an age close to 42 days. Therefore, feed efficiency and high broiler performance are central factors for broiler production success. In this context, since the last century middle, the use of subtherapeutic doses of antibiotics as broiler performance enhancers was considered a strategy to reduce losses due to deaths and diseases, collaborating for the establishment of better productive indices of the lots (SALIM et al., 2018).

However, the widespread use of antibiotics in animal production has generated increasing concerns on the part of the consumer market, regulatory entities and society in general with regard to greater bacterial resistance to antibiotics used in human therapy. Following the ban on the antibiotics use as performance enhancers in the broilers production by the European Union in 2006, more and more countries have also restricted their use since then (SALIM et al., 2018). Given this scenario, the establishment of alternative strategies to the antibiotics use as performance enhancers are aligned with poultry sector demands (RAFIQ et al., 2022), and previous research shows that dietary supplementation with probiotics can benefit the health (WU et al., 2019) and improve the broilers performance (AMERAH et al., 2013; REIS et al., 2017).

Another current poultry challenge, mainly in countries with a tropical climate, is the increased ambient temperature due to global warming that the world is going through. Lineages that exhibit rapid growth rates are even more susceptible to heat stress, due to their higher metabolic activity and higher body heat production (LIU et al., 2020). Heat stress can trigger several physiological and metabolic changes, such as increased body temperature, immune system depression, structural and functional damage to the intestinal epithelium, intestinal microbiota imbalance, among others, which can negatively impact the broiler production (ST-PIERRE et al., 2003; LARA and ROSTAGNO, 2013; ROSTAGNO, 2020; NAWAZ et al., 2021).

Wang et al. (2018) demonstrated that dietary supplementation with *Bacillus subtilis* improved the performance, behavior and immunity of broilers exposed to heat stress. Sohail et al. (2013), Al-Fataftah and Abdelqader (2014), Jahromi et al. (2016), and Abdelqader et al. (2020) also observed that probiotics added in the feed improved the performance of broilers reared under heat stress conditions. Sugiharto et al. (2017), in a review work, compiled studies in which diets containing probiotics resulted in benefits for the production of broilers under heat stress. On the other hand, these authors also emphasize that it is necessary to consider that distinct probiotics can trigger different

effects, and that there are studies in which no effect was observed in broilers fed diets supplemented with probiotics.

Up to the present date, no work has been found evaluating the effects of the non-commercial probiotics *Lactococcus lactis* NCDO 2118, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, *Escherichia coli* CEC 15, and *Saccharomyces boulardii* on broilers reared under heat stress conditions. Therefore, this experiment was conducted to evaluate the effects of these four non-commercial probiotics, supplemented in the diet individually or as a blend, on performance, intestinal health and redox status of fast-growing broilers exposed to heat stress from 15 days of age, comparing them to diets supplemented with the antibiotic zinc bacitracin or with the commercial probiotic of *Bacillus subtilis* DSM 17299.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Ethics statement

The experiment was conducted in a conventional shed for broilers in the Poultry Sector of the Animal Science Department of the Federal University of Lavras (UFLA). All experimental procedures involving broilers were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UFLA, under protocol number 006/2020.

2.2 Broilers, experimental design and diets

One-day old male Cobb-500 broiler chicks were acquired from a commercial hatchery. The experimental design was randomized blocks with the right and left sides of the shed as the blocks. Eight diets were evaluated in six replicates (experimental units; boxes) of 15 broilers each, totaling 48 experimental units and 720 broilers. The experimental diets were T1: basal diet (BD) without probiotic and antibiotic; T2: BD supplemented with zinc bacitracin (55 mg of active ingredient/kg of feed); T3: BD supplemented with a commercial probiotic of *Bacillus subtilis* DSM 17299 (1×10^9 CFU/kg of feed); T4, T5, T6, and T7: BD supplemented with non-commercial probiotics of *Lactococcus lactis* NCDO 2118, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, *Escherichia coli* CEC 15 or *Saccharomyces boulardii*, respectively (each supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed); and T8: BD supplemented with the combination of the four non-commercial probiotics (from T4 to T7; 1×10^9 CFU of each probiotic/kg of feed, totaling 4×10^9 CFU/kg of feed).

Non-commercial probiotics were produced in the Laboratory of Cellular and Molecular Genetics of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). The BD was based on corn and soybean meal, formulated according to the nutritional requirements reported in the lineage manual (COBB, 2018) for periods from 1 to 7, 8 to 21, 22 to 35, and 36 to 42 days of age (Table 1). The diets and

water were provided *ad libitum* to the broilers throughout the experimental period from 1 to 42 days of age.

2.3 Facilities and environmental conditions

Each box, with dimensions of 2.0×1.5 m, contained an incandescent lamp for heating, a tubular feeder, and a bell drinker, and the floor was covered with wood shavings. Each side of the shed was equipped with fans. Curtains were installed on the sides of the shed to control ventilation and the incidence of sunlight. The mean relative humidity recorded in the shed throughout the experimental period was $50.5 \pm 5.1\%$. The light program used consisted of 1 h of darkness (1 to 7 days of age), 8 h of darkness (8 to 20 days of age), 7 h of darkness (21 to 35 days of age) and 6 h of darkness (36 to 42 days of age) (COBB, 2018).

The ambient temperatures were recorded every 30 min by seven data logger sensors (Onset, HOBO model), positioned at a height compatible with the broilers height and distributed three on each shed side and one on central hall of the shed. Throughout the experimental period, the curtains and heating lamps were management so that the internal temperature of the shed remained as high as possible between 09:00 a.m. and 5:00 p.m., but without exceeding a mean of 32°C for the period (CHENG et al., 2019). In the other hours of the day (5:00 p.m. to 9:00 a.m.), the curtains, lamps and fans were management to provide milder ambient temperatures.

According to the lineage manual (COBB, 2018), the thermal comfort temperatures for broilers as a function of age are 32°C from 1 to 3 days, 30°C from 4 to 7 days, 28°C from 8 to 14 days, 25°C from 15 to 21 days, 22°C from 22 to 35 days, and 20°C from 36 to 42 days. By considering the temperatures recorded in the shed (Table 2), it is possible observe that the mean temperatures were lower than the reference values in the period from 1 to 14 days of age of broilers. However, it is important to emphasize that each box contained a heating lamp, which we left on whenever necessary, and that the data logger sensors were not positioned close to the heat lamps, to avoid interference in the temperature records. Thus, until 14 days of age, there was no cold stress because the broilers used the heating source as needed for their thermoregulation. On the other hand, the broilers were exposed to heat stress from 15 to 42 days of age. In this experiment, the heat challenge was established in this period as it is a critical phase in the broiler industry, in which large economic losses occur especially in tropical and subtropical regions. From 15 days of age, commercial lineages broilers are more vulnerable to heat stress due to high metabolic heat production and its reduced ability to dissipate excess body heat due to feather coverage and limited sweat glands (LIU et al., 2020). Moreover, heat stimulation from days 15 to 42 has been used previously as an environmental stressor for broilers (MAHMOUD et al., 2015; MOHAMMED et al., 2018; JIANG et al., 2020).

2.4 Experimental procedures and evaluated parameters

The broilers performance was determined over the total rearing period from 1 to 42 days of age. At 42 days of age and after fasting for 8 h, one broiler from each experimental unit was selected according to the mean weight of the plot (standard deviation $\pm 3\%$), which corresponding to six broilers per treatment. These broilers were used to determine the carcass and cuts yield, and abdominal fat deposition.

Moreover, another broiler from each experimental unit was selected at 42 days of age according to the mean weight of the plot (standard deviation $\pm 3\%$), corresponding to six broilers per treatment. These broilers were not subjected to fasting, to avoid emptying of their digestive tract and standardize slaughter in the absorptive state. These broilers were used for determining of the cloacal temperature, intestinal length and weight, activities of enzymes related to inflammatory infiltrate in the jejunum, intestinal histomorphometry, gene expression in the jejunum and liver, and redox status in the jejunum, liver, and blood.

2.4.1 Performance, carcass and cuts yield, and abdominal fat deposition

The broilers performance was measured from 1 to 42 days of age. Feed intake equaled the difference between the amount of feed provided and the leftovers in a period. The weight gain was calculated by subtracting the final weight from the initial weight of the broilers. The feed conversion was calculated by dividing the feed intake by the weight gain of the broilers. The mortality of the broilers was recorded daily and used to correct the performance results.

At 42 days of age and after fasting for 8 h, the selected broilers were individually weighed, slaughtered by cervical dislocation followed by bleeding, scalded, plucked, and eviscerated. The carcass yield equaled the relationship between the weight of the clean carcass (without feet, head, and neck) and the live weight. The yields of wings, thighs + drumsticks, and breast were calculated by correlating the cut weight with the weight of the eviscerated clean carcass. To determine the percentage of abdominal fat deposition, the fat present in the region between the bursa of Fabricius and the cloaca was collected, weighed, and correlated with the weight of the eviscerated clean carcass as described by Gomide et al. (2014).

2.4.2 Cloacal temperature, length and weight of the intestine, and activities of enzymes related to inflammatory infiltrate in the jejunum

Once the broilers were selected, their cloacal temperature was measured using a digital thermometer ($\pm 0.01^\circ\text{C}$ accuracy) kept inside the cloaca for approximately 1 min. Posteriorly, the

broilers were individually weighed, slaughtered by cervical dislocation followed by bleeding, and eviscerated. The entire intestine (duodenum associated with pancreas, jejunum, ileum, cecum, and colon) was weighed on an analytical scale and measured with a tape measure (FERNANDES et al., 2014).

Fragments approximately 1 cm long were collected from the jejunum, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until the determination of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase activities. The enzymatic activities were measured in the homogenate of jejunum tissue as described by De Jesus et al. (2019). Briefly, the homogenate preparation consisted of tissue extraction with 0.1 M PBS (pH 7.4) followed by centrifugation ($3000 \times g$ for 10 min) and resuspension of the pellet with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB-Sigma-Aldrich, USA) in phosphate buffer. After centrifugation ($3000 \times g$ for 15 min), the supernatant was collected. The absorbances were measured in the colorimetric assays at 492 nm and 450 nm by using a microplate spectrophotometer (Bio-Rad 450 model, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for the determination of eosinophil peroxidase and myeloperoxidase activity, respectively. Results are expressed as enzyme units (based on absorbance)/mg of tissue.

2.4.3 Intestinal histomorphometry

After slaughter, jejunum fragments of approximately 6 cm were longitudinally opened, carefully washed, rolled in the form of a roulade from the proximal portion to the distal portion, and transferred to a collection jar with a lid containing 10% buffered formalin solution. The fragments were kept in the jar for at least 48 h until processing. Then, the samples were dehydrated in an increasing series of ethanol, cleaned with xylene, and embedded in paraffin blocks. After blocks cleavage, 5- μm cross-sections were placed on a glass slide and stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic evaluation.

The histological fields were observed by means of an optical microscope with a $4\times$ magnification objective (Olympus CX31, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Olympus SC30) and coupled to the image acquisition system (AnalySIS getIT). Images were analyzed using ImageJ software (version 1.52a) with a calibrated micrometric ruler. A total of 15 intact and well-oriented villi-crypt units were measured for each analyzed image. The following parameters were measured: villus height, from the base to the villus apex; villus width, in about the middle of the villus; crypt depth, from the muscularis mucosae to the villus base; crypt width, in about the middle of the crypt; and mucosa height, from the base of the muscularis mucosae to the villi apex. The villus/crypt ratio was calculated by dividing the villus height by the crypt depth. Villus surface area

(VSA) and intestinal absorption area (IAA) were calculated using the formulas described by Dong et al. (2014) and Kisielinski et al. (2002), respectively:

$$\text{VSA: } \pi \frac{\text{Villi width}}{2} \sqrt{\left(\frac{\text{Villi width}}{2}\right)^2 + \text{Villi height}^2}$$

$$\text{IAA: } \frac{(\text{Villi width} \cdot \text{Villi height}) + \left(\frac{\text{villi width}}{2} + \frac{\text{crypt width}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{villi width}}{2}\right)^2}{\left(\frac{\text{Villi width}}{2} + \frac{\text{Crypt width}}{2}\right)}$$

2.4.4 RNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Approximately 1 cm of jejunum and 0.2 g of liver were collected and stored in RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at -20°C until extraction for RT-qPCR analysis. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, quantified in a NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and evaluated for integrity in 1.0% agarose gel electrophoresis. cDNA was generated from total RNA by using the commercial ImProm II Reverse Transcription System kit (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Quantitative PCR was performed with SYBR® Green (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) under the following conditions: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 5 s, at 56°C for 10 s, at 72°C for 25 s, at 65°C for 5 s, and at 95°C for 50 s. The levels of target genes were calculated by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ comparative method with normalization to β -actin and GAPDH (endogenous references) in the same sample. The reactions were performed in duplicate. In the jejunum, the genes expression of intestinal barrier (tight junctions – occludin and zonulin), interleukin-8, hormones (cholecystokinin and ghrelin), and heat shock protein (HSP70) were evaluated. Moreover, HSP70 mRNA expression was measured in the liver.

2.4.5 Redox status

To evaluate the redox status, 2 mL of blood was collected in tubes without anticoagulant but containing clot activator (BD Vacutainer, Juiz de Fora, MG, Brazil). After blood centrifugation (1000 \times g for 20 min at 4°C), the serum was collected and stored at -80°C. Samples of approximately 1 cm in length of jejunum and 0.2 g of liver were also collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Therefore, the activity of the superoxide dismutase (SOD) enzyme and the

concentration of malondialdehyde (MDA) were determined in the jejunum and liver extracts, and serum.

SOD activity was determined by indirect method using the SOD assay colorimetric kit (catalog number 19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The assay enzyme was conducted by following the manufacturer instruction. The tissue extract or serum was incubated at 37°C for 20 min after gentle shaking and added 20 µL of the kit enzyme working solution. The absorbance readings were performed at 450 nm and the SOD activity was calculated using the equation:

$$\% \text{ SOD activity} = \left\{ \frac{[(\text{blank 1} - \text{blank 3}) - (\text{sample A} - \text{sample A's blank 2})]}{\text{blank 1} - \text{blank 3}} \right\} \times 100$$

where blank 1 was a mixture of ddH₂O, working solution, and enzyme working; blank 2 contained the sample with working solution and dilution buffer; while ddH₂O, working solution and dilution buffer were added in the blank 3.

The proteins contents in the tissue extract or serum were determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard protein. Therefore, the SOD activity results were expressed as % activity/mg protein.

The MDA concentration was determined by using the Lipid Peroxidation Assay colorimetric kit (catalog number MAK085, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). In this kit, lipid peroxidation is determined by the reaction of MDA with thiobarbituric acid to form a colorimetric product at 532 nm, proportional to the MDA present in the sample. The MDA concentration was expressed as nmol/mL of jejunum or liver extract, or serum. All absorbance readings were performed by using the PowerWave™ XS Microplate Scaring Spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Potton, United Kingdom).

2.5 Statistical analysis

The data were analyzed with SAS on demand for academics (SAS Institute Inc., 2012). The data normality was assessed by the Shapiro–Wilk test. Data with normal distribution were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure, and when significant, the means of the treatments were compared using Tukey’s test at 5% probability. The data with a non-normal distribution were subjected to nonparametric variance analysis using the NPAR1 WAY procedure by applying the Kruskal–Wallis test, and the means of the treatments were compared using Tukey’s test at 5% probability. Jejunum histomorphometric data (crypt depth, crypt width, mucosa height, and villus surface area), gene expression in the jejunum (occludin, zonulin, HSP70, cholecystokinin,

ghrelin, and IL-8), HSP70 expression in the liver, and eosinophil peroxidase activity exhibited non-normal distribution. All other data exhibited normal distribution.

3 RESULTS

There was no difference ($P > 0.05$) in feed intake by broilers from 1 to 42 days of age, being determined the average intake of 5.433 kg of feed/broiler when all treatments are considered (Table 3). However, the broilers raised under heat-stress condition and fed diet without zinc bacitracin and probiotic exhibited lower ($P < 0.05$) weight gain and live weight at slaughter, in addition to worse ($P < 0.05$) feed conversion. All diets containing probiotics supplemented alone or in combination resulted in weight gain, feed conversion, and live weight at slaughter similar to those observed for the broilers that received basal diet supplemented with antibiotic. There was no difference ($P > 0.05$) between treatments for carcass yield, cuts yield (wings, thighs + drumsticks, or breast), and the percentage of abdominal fat deposition determined at 42 days old broilers.

The highest ($P < 0.05$) cloacal temperature was measured in the broilers that received the diet supplemented with *E. coli* (Table 4). The diets containing *L. delbrueckii* and *S. boulardii* resulted in intermediate cloacal temperature, and the other evaluated diets resulted in the lowest cloacal temperature. On the other hand, the evaluated diets did not affect ($P > 0.05$) the length and weight of the intestine, and the activity of myeloperoxidase or eosinophilic peroxidase in the jejunum (Table 4).

The dietary treatments also did not influence ($P > 0.05$) the villus height or width, crypt depth or width, mucosa height, villus/crypt ratio, villus surface area, and intestinal absorption area at 42 days old broilers (Table 5). Moreover, the gene expression evaluated in the jejunum (occludin, zonulin, HSP70, cholecystokinin, ghrelin, and interleukin-8) and liver (HSP70) was similar ($P > 0.05$) between all treatments (Table 6).

The MDA concentration and SOD activity in the jejunum were similar ($P > 0.05$) between the broilers of all evaluated treatments (Table 7). In the liver, the experimental diets also did not influence ($P > 0.05$) SOD activity, however, there was a higher ($P < 0.05$) MDA concentration when the broilers received the basal diet without zinc bacitracin and probiotic or the basal diet supplemented with *S. boulardii*, while lower ($P < 0.05$) MDA concentration was measured in the broilers fed basal diet supplemented with *B. subtilis*. In the blood, the MDA content was higher ($P < 0.05$) in broilers fed basal diet supplemented with *L. lactis* and lower ($P < 0.05$) when *L. delbrueckii* was used. Supplementation of the basal diet with the probiotics blend resulted in the highest ($P < 0.05$) serum SOD activity, while the lowest ($P < 0.05$) activity was determined in the broilers fed basal diet without zinc bacitracin and probiotic or basal diet containing *L. delbrueckii*.

4 DISCUSSION

Heat stress is one of the most common environmental challenges in poultry production, and it can harm the physiology, immunology, microbiology, and welfare of broilers (ROSTAGNO, 2020). Dietary supplementation with probiotics has been considered as a nutritional strategy to reduce the detrimental effects of heat stress in poultry (SUGIHARTO et al., 2017). In this study, the diet supplementation with one or the probiotics blend improved the broilers weight gain without affecting feed intake, which resulted in improved feed conversion. This result is noteworthy because the feed conversion is an animal productivity index calculated by the feed intake divided by the weight gain of the broilers. Considering that feed cost corresponding to approximately 70% of the total production costs, the improvement in feed conversion may reflect in economic gain for broiler farming (THIRUMALAISAMY et al., 2016). Furthermore, it is important emphasize that the broilers fed diets containing one or the probiotics blend exhibited improved performance similar to broilers that received basal diet supplemented with zinc bacitracin. This result is in align with the necessity of reduce the antibiotic use as a growth enhancer in the broiler production (RAFIQ et al., 2022).

The supply of diets supplemented with *B. subtilis* for broilers exposed to 35°C during five hours daily (AL-FATAFTAH and ABDELQADER, 2014) or 32°C for ten hours daily (WANG et al., 2018) also resulted in better feed conversion and heavier broilers, without changes in feed intake. Sohail et al. (2013), Jahromi et al. (2016), and Abdelqader et al. (2020) also observed that probiotics use in the feed improved the performance of broilers reared under heat stress conditions, justifying such results by improvements in the intestinal absorption, immune system modulation, and better gut microbiota profile. As in our work there was no probiotics effect on intestinal histomorphometry, expression of the evaluated genes, redox status in the jejunum, and myeloperoxidase and eosinophil peroxidase activities, investigation of other parameters related to uptake of nutrients from the feed, such as microbiome, can help to understand the mechanisms by which the evaluated probiotics can improve broiler performance. Moreover, it is important to remember that differences in the type and dose of probiotics, evaluated intestinal segment, period and intensity of heat exposure can influence probiotics functions and viability and, consequently, explain divergent results between studies (SUGIHARTO et al., 2017).

On the day of housing, the one-day-old chicks were individually weighed and distributed so that all experimental units had similar initial mean broiler weights. Therefore, as the diet supplementation with zinc bacitracin, one probiotic, or the probiotics blend increased the weight gain, the higher preslaughter live weight exhibited by the broilers of these treatments is justified. The higher weight of broiler at slaughter is desirable by producers and professionals related to the poultry industry because broilers are marketed based on their weight in kg. Moreover, there is a significant

consumer market that prefers buy heavier broilers that exhibit higher meat quantity. In turn, the carcass and cut yields (wings, thighs + drumsticks, and breast), as well as abdominal fat deposition, were not influenced by diet supplementation with zinc bacitracin or probiotic. Similarly, Rehman et al. (2020) also did not observe worse carcass yield of broilers fed diets supplemented with probiotics.

Cloacal temperature reflects the core body temperature resulting from the balance between heat loss and heat gain in broiler chickens (EDGAR et al. 2013). Studies report that the benefits of probiotics in reducing cloacal temperature may be due to mitigation of oxidative stress (ALUWONG, et al., 2017; SUMANU et al., 2021), but knowledge on this subject is still incipient. According to Macari and Furlan (2001), physiological mechanisms of thermoregulation are triggered by broilers when the cloacal temperature exceeds 41.1°C. This study show that broilers fed diet supplemented with non-pathogenic *E. coli* exhibited the highest cloacal temperature, however without prejudice to the zootechnical performance. Thus, compared to the other evaluated additives, it may be deduced that *E. coli* exhibits smaller antistress effect in mitigating heat stress in broilers, although the molecular mechanisms involved need to be further investigated.

The probiotics evaluated in the present experiment was not enough to change the length and weight of the intestine or to modify the histomorphology of the jejunum, corroborating with the reported by Wang et al. (2016). Already Ashraf et al. (2013), reported positive effects of dietary supplementation with probiotic on villus height and surface area in jejunum of broilers reared under heat stress. However, they exposed the broilers to highest temperature (35°C for 8 hours daily from day 21 to 42) and this greater thermal challenge may have enabled a more conducive environment for the probiotic improve the absorptive structural capacity in the jejunum. As there was no effect of probiotics on jejunal histomorphometry, the results of this study suggest that the higher broilers performance may be associated with parameters that could not be investigated, such as microbiome modulation and changes in feed digestibility.

The proteins occludin and zonulin contribute to the adhesion between intestinal cells, what justifies its gene expression be used as a biomarker of intestinal permeability in broilers (CHEN et al., 2015; GILANI et al., 2016). Oxidative stress can affect the expression of tight junctions in the duodenum and jejunum of broilers (CHEN et al., 2022). Therefore, as there was no change in malondialdehyde concentration and superoxide dismutase activity in the jejunum, the redox status maintenance in this segment may explain the similar gene expression of occludin and zonulin among all experimental groups. The impaired gut barrier function may result in high paracellular intestinal permeability that, in its turn, may facilitate translocation of intestinal bacteria causing inflammatory processes (LEE, 2015; STURGEON and FASANO, 2016). According Vieira et al. (2009), myeloperoxidase and eosinophil peroxidase are enzymes considered appropriate and reliable markers

for neutrophil and eosinophil infiltration, respectively. Therefore, the zonulin and occludin gene expression results of this work suggest that the intestinal barrier function was not altered by the experimental diets evaluated, which may justify similar myeloperoxidase and eosinophil peroxidase activities in the jejunum. Agreeing with these results, no difference was observed in the expression of the gene encoding interleukin-8, a cytokine that exhibits the primary function of recruit and activate neutrophils in response to infection (WIGLEY and KAISER, 2003).

Cholecystokinin and ghrelin are hormones directly correlated to voluntary intake of feed (DUNN, et al., 2013; LEI et al., 2013). The basal diet supplementation with zinc bacitracin, one probiotic or the probiotics blend did not alter the gene expression of these hormones corroborating with the similar feed intake observed between the experimental groups. In a recent and robust review, Han et al. (2021) summarize the impacts of specific changes in the microbial compositions on appetite-related hormones, which play a key role in modulating brain behavior and function through the humoral or the neural pathway. However, knowledge about the effects of probiotics on the microbiome modulation and its impact on secretion of appetite-related hormones in broilers is still incipient.

Heat shock proteins play an important role in the protection and repair of cells and tissues by interacting with molecules damaged by stressors, such as heat. In this study, the dietary treatments did not influence the HSP70 mRNA expression in the jejunum and liver. Jiang et al. (2020) evaluated two inclusion levels of symbiotic in feeds for broilers exposed to heat stress (32°C for 9 h daily from 15 to 42 days of age) and also did not observe treatment effects on the HSP70 mRNA expression in the liver and hypothalamus. On the other hand, studies have shown that expression of HSP70 gene in broilers is regulated in response to heat stress (GU et al., 2012; SONG et al., 2017; WANG et al., 2018), but of a manner directly correlated with the degree of heat stimulation to which broilers are exposed which may justify contradictory results in the scientific literature. Moreover, Wang et al. (2018) related reduction of HSP70 mRNA expression in broilers reared under heat stress (32°C for 10 h daily from 15 to 43 days of age) when the diets were supplemented with *Bacillus subtilis*. The mechanism resulting in low level of HSP70 probiotic-fed broiler is not clear but it has been reported that probiotics alleviate stress reactions by blunting the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (SOHAIL et al., 2010, 2012) decreasing the trigger point for HSP70 synthesis (WANG et al., 2018). As we highlighted earlier, differences in the type and dose of probiotics, evaluated tissue, period and intensity of heat exposure can influence probiotics functions and viability and, consequently, explain divergent results between studies (SUGIHARTO et al., 2017).

Oxidative stress occurs when the production of reactive species exceeds the antioxidant capacity of the organism. Stressful situations, including heat stress, may result in increased MDA

production, which is a widely used biomarker due to its ability to cause cellular oxidative damage, such as lipid peroxidation. In turn, SOD enzyme activity has been conventionally used as an important indicator of antioxidant capacity. Bai et al. (2017) and Gong et al. (2018) reported that dietary supplementation with *Bacillus* can decrease the MDA concentration in the liver of broilers raised in thermal comfort conditions, and the present work demonstrates that this benefit also occurs when broilers exposed to heat stress receive diet supplemented with *Bacillus subtilis* DSM 17299. In the blood, *L. delbrueckii* was the probiotic that resulted in the lowest MDA concentration. Recently, Chen et al. (2021) related that dietary supplementation with *L. delbrueckii* decreased the MDA content in the serum and intestinal mucosa of lipopolysaccharide-challenged piglets, alleviating the oxidative damage. To date, no report was found about the *L. delbrueckii* effects on redox status of broilers exposed to heat indicating the need for further study in this area. SOD activity was not influenced by the experimental diets in the liver, however, supplementation of the basal diet with the probiotics blend resulted in the highest serum SOD activity. These results indicate that there was synergism between the non-commercial probiotics *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *E. coli*, and *S. boulardii*, potentiating the effect of the blend as an additive capable of increasing the systemic antioxidant capacity of heat-challenged broilers. This result signals the need for further studies with the objective of deeper investigations about the potential of the probiotics blend as a functional additive to improve the antioxidant capacity of broilers. However, in general, the different probiotics effects on the MDA concentration and SOD activity were not sufficient to alter the broiler performance, considering that all probiotics evaluated supplemented alone or as a blend were efficient in improving broiler performance in a similar magnitude to that observed when the diet contained zinc bacitracin.

5 CONCLUSIONS

It is concluded that broilers challenged by heat stress from 15 days of age and fed diet without zinc bacitracin or probiotic exhibit worse performance. However, all non-commercial probiotics evaluated supplemented alone or as a blend showed to be efficient in improving the broiler performance in a similar magnitude to that observed when the diet contained the antibiotic zinc bacitracin or the commercial probiotic of *Bacillus subtilis* DSM 17299.

REFERENCES

ABDELQADER, A.; ABUAJAMIEH, M.; HAYAJNEH, F.; AL-FATAFTAH, A. R. Probiotic bacteria maintain normal growth mechanisms of heat stressed broiler chickens. **Journal of Thermal Biology**, v. 92, 2020.

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2021**. Available at <https://bit.ly/3eyFRNO> [Verified 25 February 2022].
- AL-FATAHTAH, A. R.; ABDELQADER, A. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 198, p. 279-285, 2014.
- ALUWONG, T.; SUMANU, V. O.; AYO, J. O.; OCHEJA, B.; ZAKARI, F.; MINKA, N. Daily rhythms of cloacal temperature in broiler chickens of different age groups administered with zinc gluconate and probiotic during the hot-dry season. **Physiological Reports**, v. 5, n. 12: e13314, 2017.
- AMERAH, A. M.; VAN RENSBURG, C. J.; PLUMSTEAD, P. W.; KROMM, C.; DUNHAM, S. Effect of feeding diets containing a probiotic or antibiotic on broiler performance, intestinal mucosa-associated avian pathogenic *E. coli* and litter water-soluble phosphorus. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 1, n. 7, 2013.
- ASHRAF, S.; ZANEB, H.; YOUSAF, M. S.; IJAZ, A.; SOHAIL, M. U.; MUTI, S.; USMAN, M. M.; IJAZ, S.; REHMAN, H. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 68-73, 2013.
- BAI, K.; HUANG, Q.; ZHANG, J.; HE, J.; ZHANG, L.; WANG, T. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 1, p. 74-82, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHEN, F.; CHEN, J.; CHEN, Q.; YANG, L.; YIN, J.; LI, Y.; HUANG, X. *Lactobacillus delbrueckii* protected intestinal integrity, alleviated intestinal oxidative damage, and activated toll-like receptor–Bruton’s tyrosine kinase–nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in weaned piglets challenged with lipopolysaccharide. **Antioxidants**, v. 10, n. 3:468, 2021.
- CHEN, J.; TELLEZ, G.; RICHARDS, J. D.; ESCOBAR, J. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2:14, 2015.
- CHEN, S.; XUE, Y.; SHEN, Y.; JU, H.; ZHANG, X.; LIU, J.; WANG, Y. Effects of different selenium sources on duodenum and jejunum tight junction network and growth performance of broilers in a model of fluorine-induced chronic oxidative stress. **Poultry Science**, v. 101:101664, 2022.

- CHENG, Y. F.; CHEN, Y. P.; CHEN, R.; SU, Y.; ZHANG, R. Q.; HE, Q. F.; WANG, K.; WEN, C.; ZHOU, Y. M. Dietary mannan oligosaccharide ameliorates cyclic heat stress-induced damages on intestinal oxidative status and barrier integrity of broilers. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4767-4776, 2019.
- COBB VANTRESS. **Broiler Management Guide**. 2018. 112 p.
- DE JESUS, L. C. L.; DRUMOND, M. M.; DE CARVALHO, A.; SANTOS, S. S.; MARTINS, F. S.; FERREIRA, Ê.; FERNANDES, R. S.; DE BARROS, A. L. B.; DO CARMO, F. L. R.; PEREZ, P. F.; AZEVEDO, V.; MANCHA-AGRESTI, P. Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 197-207, 2019.
- DONG L.; ZHONG, X.; AHMAD, H.; LI, W.; WANG, Y.; ZHANG, L.; WANG, T. Intrauterine growth restriction impairs small intestinal mucosal immunity in neonatal piglets. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, v. 62, n. 7, p. 510-518, 2014.
- DUNN, I. C.; MEDDLE, S. L.; WILSON, P. W.; WARDLE, C. A.; LAW, A. S.; BISHOP, V. R.; HINDAR, C.; ROBERTSON, G. W.; BURT, D. W.; ELLISON, S. J. H.; MORRICE, D. M.; HOCKING, P. M. Decreased expression of the satiety signal receptor CCKAR is responsible for increased growth and body weight during the domestication of chickens. **American Journal of Physiology**, v. 304, n. 9:E909-21, 2013.
- EDGAR, J. L.; NICOL, C. J.; PUGH, C. A.; PAUL, E. S. Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. **Physiology & Behavior**, v. 119, p. 195-200, 2013.
- FERNANDES, B. C. S.; MARTINS, M. R. F. B.; MENDES, A. A.; MILBRADT, E. L.; SANFELICE, C.; MARTINS, B. B.; AGUIAR, E. F.; BRESNE, C. Intestinal integrity and performance of broiler chickens fed a probiotic, a prebiotic, or an organic acid. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 16, n. 4, p. 417-424, 2014.
- GILANI, S.; HOWARTH, G. S.; KITESSA, S. M.; FORDER, R. E. A.; TRAN, C. D.; HUGHES, R. J. New biomarkers for intestinal permeability induced by lipopolysaccharide in chickens. **Animal Production Science**, v. 56, p. 1984-1997, 2016.
- GOMIDE, E. M.; RODRIGUES, P. B.; NAVES, L. P.; BERNARDINO, V. M. P.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, E. J.; FREITAS, R. T. F. Phytase and amino acids for broilers from 36 to 42 days of age. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, p. 295-300, 2014.
- GONG, L.; WANG, B.; MEI, X.; XU, H.; QIN, Y.; LI, W.; ZHOU, Y. Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. **Animal Science Journal**, v. 89, p. 1561-1571, 2018.

- GU, X.H.; HAO, Y.; WANG, X.L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. **Poultry Science**, v. 91, p. 790-797, 2012.
- HAN, H.; YI, B.; ZHONG, R.; WANG, M.; ZHANG, S.; MA, J.; YIN, Y.; YIN, J.; CHEN, L.; ZHANG, H. From gut microbiota to host appetite: gut microbiota-derived metabolites as key regulators. **Microbiome**, v. 9, n. 162, 2021.
- JAHROMI, M. F.; ALTAHER, Y. W.; SHOKRYAZDAN, P.; EBRAHIMI, R.; EBRAHIMI, M.; IDRUS, Z.; TUFARELLI, V.; LIANG, J. B. Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 7, p. 1099-1110, 2016.
- JIANG, S.; MOHAMMED, A. A.; JACOBS, J. A.; CRAMER, T. A.; CHENG, H. W. Effect of synbiotics on thyroid hormones, intestinal histomorphology, and heat shock protein 70 expression in broiler chickens reared under cyclic heat stress. **Poultry Science**, v. 99, n. 1, p. 142-150, 2020.
- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A.; KLOSTERHALFEN, B.; SCHUMPELICK, V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n. 3, p. 131-135, 2002.
- LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 356-369, 2013.
- LEE, S. H. Intestinal permeability regulation by tight junction: Implication on inflammatory bowel diseases. **Intestinal Research**, v. 13, n. 1, p. 11-18, 2015.
- LEI, L.; HEPENG, L.; XIANLEI, L.; HONGCHAO, J.; HAI, L.; SHEIKHAHMADI, A.; YUFENG, W.; ZHIGANG, S. Effects of acute heat stress on gene expression of brain-gut neuropeptides in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 11, p. 5194-5201, 2013.
- LIU, L.; REN, M.; REN, K.; JIN, Y.; YAN, M. Heat stress impacts on broiler performance: a systematic review and meta-analysis. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6205-6211, 2020.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L. Environment in poultry production. In: SILVA, I. J. O. (Ed.). **Environment in poultry production of tropical climate**. Piracicaba: FUNEP, 2001. v. 1, p. 31-87.
- MAHMOUD, U. T.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; DARWISH, M. H. A.; APPLGATE, T. J.; CHENG, H. W. Behavioral changes and feathering score in heat stressed broiler chickens fed diets containing different levels of propolis. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 166, p. 98-105, 2015.

- MOHAMMED, A. A.; JACOBS, J. A.; MURUGESAN, G. R.; CHENG, H. W. Effect of dietary synbiotic supplement on behavioral patterns and growth performance of broiler chickens reared under heat stress. **Poultry Science**, v. 97, p. 1101-1108, 2018.
- NAWAZ, A. H.; AMOAH, K.; LENG, Q. Y.; ZHENG, J. H.; ZHANG, W. L.; ZHANG, L. Poultry response to heat stress: its physiological, metabolic, and genetic implications on meat production and quality including strategies to improve broiler production in a warming world. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8: 699081, 2021.
- RAFIQ, K.; TOFAZZAL HOSSAIN, M.; AHMED, R.; HASAN, M. M.; ISLAM, R.; HOSSEN, M. I.; SHAHA, S. N.; ISLAM, M. R. Role of different growth enhancers as alternative to in-feed antibiotics in poultry industry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8: 794588, 2022.
- REHMAN, A.; ARIF, M.; SAJJAD, N.; AL-GHADI, M. Q.; ALAGAWANY, M.; ABD EL-HACK, M. E.; ALHIMAI, A. R.; ALMUTAIRI, B. O.; AMRAN, R. A.; HUSSEIN, E. O. S.; SWELUM, A. A. Dietary effect of probiotics and prebiotics on broiler performance, carcass, and immunity. **Poultry Science**, v. 99, n. 12, p. 6946-6953, 2020.
- REIS, M. P.; FASSANI, E. J.; GARCIA JÚNIOR, A. A. P.; RODRIGUES, P. B.; BERTECHINI, A. G.; BARRETT, N.; PERSIA, M. E.; SCHIMIDT, C. J. Effect of *Bacillus subtilis* (DSM 17299) on performance, digestibility, intestine morphology, and pH in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 26, n. 4, p. 573-583, 2017.
- ROSTAGNO, M. H. Effects of heat stress on the gut health of poultry. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 4, p. 1-9, 2020.
- SALIM, H. M.; HUQUE, K. S.; KAMARUDDIN, K. M.; BEG, M. D. A. H. Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. **Science Progress**, v. 101, n. 1, p. 52-75, 2018.
- SAS Institute Inc. **SAS on demand for academics**. 2012. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Available at <https://odamid.oda.sas.com/SASStudio/> [Verified 05 February 2022].
- SOHAIL, M. U.; HUME, M. E.; BYRD, J. A.; NISBET, D. J.; IJAZ, A.; SOHAIL, A.; SHABBIR, M. Z.; REHMAN, H. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2235-2240, 2012.
- SOHAIL, M. U.; IJAZ, A.; YOUNUS, M.; SHABBIR, M. Z.; KAMRAN, Z.; AHMAD, S.; ANWAR, H.; YOUSAF, M. S.; ASHRAF, K.; SHAHZAD, A. H.; REHMAN, H. Effect of supplementation of mannan oligosaccharide and probiotic on growth performance, relative weights of viscera, and population of selected intestinal bacteria in cyclic heat-stressed broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 485-491, 2013.

- SOHAIL, M. U.; IJAZ, A.; YOUSAF, M. S.; ASHRAF, K.; ZANEB, H.; ALEEM, M.; REHMAN, H. Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and *Lactobacillus*-based probiotic: dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, c-reactive protein, and humoral immunity. **Poultry Science**, v. 89, p. 1934-1938, 2010.
- SONG, Z.; CHENG, K.; ZHANG, L.; WANG, T. Dietary supplementation of enzymatically treated *Artemisia annua* could alleviate the intestinal inflammatory response in heat-stressed broilers. **Journal of Thermal Biology**, v. 69, p. 184-190, 2017.
- ST-PIERRE, N.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. E52- E77, 2003.
- STURGEON, C.; FASANO, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissue Barriers**, v. 4, n. 4:e1251384, 2016.
- SUGIHARTO, S.; YUDIARTI, T.; ISROLI, I.; WIDIASTUTI, E.; KUSUMANTI, E. Dietary supplementation of probiotics in poultry exposed to heat stress - a review. **Annals of Animal Science**, v. 17, n. 3, p. 591-604, 2017.
- SUMANU, V. O.; ALUWONG, T.; AYO, J. O.; OGBUAGU, N. E. Cloacal temperature responses of broiler chickens administered with fisetin and probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) and exposed to heat stress. **Experimental Results**, v. 2, e24, p. 1-12, 2021.
- THIRUMALAISAMY, G.; MURALIDHARAN, J.; SENTHILKUMAR, S.; HEMA SAYEE, R.; PRIYADHARSINI, M. Cost-effective feeding of poultry. **International Journal of Science Environment and Technology**, v. 5, n. 6, p. 3997-4005, 2016.
- VIEIRA, A. T.; FAGUNDES, C. T.; ALESSANDRI, A. L.; CASTOR, M. G. M.; GUABIRABA, R.; BORGES, V. O.; SILVEIRA, K. D.; VIEIRA, E. L. M.; GONÇALVES, J. L.; SILVA, T. A.; DERUAZ, M.; PROUDFOOT, A. E. I.; SOUSA, L. P.; TEIXEIRA, M. M. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2382-2391, 2009.
- WANG, W. C.; YAN, F. F.; HU, J. Y.; AMEN, O. A.; CHENG, H. W. Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 96, p. 1654-1666, 2018.
- WANG, X.; FARNELL, Y. Z.; PEEBLES, E. D.; KIESS, A. S.; WAMSLEY, K. G. S.; ZHAI, W. Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. **Poultry Science**, v. 95, n. 6, p. 1332-1340, 2016.

- WIGLEY, P.; KAISER, P. Avian cytokines in health and disease. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2003.
- WU, Y.; WANG, B.; ZENG, Z.; LIU, R.; TANG, L.; GONG, L.; LI, W. Effects of probiotics *Lactobacillus plantarum* 16 and *Paenibacillus polymyxa* 10 on intestinal barrier function, antioxidative capacity, apoptosis, immune response, and biochemical parameters in broilers. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 5028-5039, 2019.

Table 1 Ingredients and calculated nutritional composition (as-fed basis) of the basal diets provided to broilers in the different rearing periods.

Ingredients (g/kg)	Periods of broiler rearing (days of age)			
	1 to 7	8 to 21	22 to 35	36 to 42
Corn	562.60	614.55	624.82	645.15
Soybean meal, 45%	365.25	317.60	302.00	277.70
Soybean oil	25.60	24.20	33.29	37.60
Limestone	8.20	7.75	7.10	7.20
Dicalcium phosphate, 18.5%	18.75	17.50	15.45	15.60
Common salt	4.70	4.50	4.57	4.55
DL-Methionine, 99%	3.40	3.20	2.83	2.65
L-Lysine HCl, 99%	2.40	2.00	1.74	1.85
L-Threonine, 98.5%	1.10	0.70	0.20	0.20
Salinomycin, 12%	0.50	0.50	0.50	0.00
Choline chloride, 60%	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin supplement ¹	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral supplement ²	1.00	1.00	1.00	1.00
Kaolin (inert) ³	5.00	5.00	5.00	5.00
Nutritional composition				
AME (kcal/kg)	2975	3025	3100	3150
Crude protein (g/kg)	214.91	196.60	189.52	180.07
Calcium (g/kg)	9.04	8.41	7.61	7.61
Available phosphorus (g/kg)	4.50	4.21	3.81	3.80
Sodium (g/kg)	2.00	1.91	1.94	1.93
Digestible lysine (g/kg)	12.22	11.21	10.22	9.72
Digestible methionine + cysteine (g/kg)	9.13	8.54	8.03	7.63
Digestible threonine (g/kg)	8.30	7.33	6.63	6.32
Digestible tryptophan (g/kg)	2.42	2.18	2.10	1.97

AME: Apparent metabolizable energy.

¹ Levels per kg of supplement: folic acid 902.5 mg; pantothenic acid 12.0 g; biotin 77.0 mg; niacin 40.0 g; selenium 349.6 mg; vitamin A 8800,000.0 IU; vitamin B1 2499.0 mg; vitamin B12 16200.0 mcg; vitamin B2 5704.0 mg; vitamin B6 3998.4 mg; vitamin D3 3000000.0 IU; vitamin E 30000.0 IU; vitamin K3 2198.1 mg.

² Levels per kg of supplement: copper 7000.0 mg; iron 50.0 g; iodine 1500.0 mg; manganese 67.5 g; zinc 45.6 g.

³ Experimental diets containing zinc bacitracin (T2), commercial probiotic (T3), individually supplemented non-commercial probiotics (T4 to T7), and the non-commercial probiotics association (T8) were obtained by replacing kaolin (inert), as needed, with the respective additive. Therefore, kaolin substitutions corresponded to 0.37 g of 15% zinc bacitracin/kg of feed, corresponding to 55 mg of active ingredient/kg of feed (T2); 0.625 g of commercial probiotic (*Bacillus subtilis* DSM 17299)/kg of feed, corresponding to 1×10^9 CFU/kg of feed (T4); 1 g of non-commercial probiotics (*Lactococcus lactis* NCDO 2118, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, *Escherichia coli* CEC 15, or

Saccharomyces boulardii/kg of feed, corresponding to 1×10^9 CFU/kg feed (T4 to T7); 1 g of each non-commercial probiotic/kg of feed, corresponding to 4×10^9 CFU/kg feed (T8).

Table 2 Temperatures recorded in the shed throughout the experimental period.

Age of broilers	Temperature (°C) ¹ Between 9:00 a.m. and 5:00 p.m.			Temperature (°C) ¹ Between 5:00 p.m. and 09:00 a.m.			Calculated daily mean ²	Reference ³
	p.m.			a.m.				
	Minimum	Maximum	Mean	Minimum	Maximum	Mean		
1 to 3 days	22.4	33.7	28.1	14.6	24.3	19.5	23.8	32.0
4 to 7 days	23.9	33.8	28.8	16.8	25.5	21.1	25.0	30.0
8 to 14 days	20.6	32.7	26.7	14.2	23.3	18.7	22.7	28.0
15 to 21 days	26.8	33.4	30.1	16.1	26.0	21.0	25.6	25.0
22 to 35 days	26.4	34.2	30.3	16.2	26.2	21.2	25.8	22.0
36 to 42 days	25.3	33.9	29.6	17.2	26.5	21.8	25.7	20.0

¹ The ambient temperatures were recorded every 30 min by seven data logger sensors (Onset, HOBO model), positioned at a height compatible with the broilers height and distributed three on each shed side and one on central hall of the shed.

² Daily mean = (mean temperature between 9:00 a.m. and 5:00 p.m. + mean temperature between 5:00 p.m. and 9:00 a.m.) divided by 2.

³ According to the lineage manual (COBB, 2018).

Table 3 Performance, carcass and cuts yields, and abdominal fat deposition of broilers fed diets containing probiotics and exposed to heat stress from 15 days of age.

	1 to 42 days of age			At 42 days of age					
	FI (kg/bird)	WG (kg/bird)	FC (kg/kg)	LW (kg)	Carcass (%)	Wings (%)	Thighs + drumsticks (%)	Breast (%)	AF (%)
Basal diet (BD) ¹	5.453	3.222 ^b	1.70 ^a	3.270 _b	72.40	10.54	29.51	38.82	1.58
BD + zinc bacitracin ²	5.563	3.558 ^a	1.56 ^b	3.580 ^a	73.18	10.53	28.97	38.10	1.44
BD + <i>Bacillus subtilis</i> ³	5.337	3.513 ^a	1.52 ^b	3.580 ^a	74.13	10.17	30.28	39.07	1.52
BD + <i>Lactococcus lactis</i> ⁴	5.421	3.470 ^a	1.56 ^b	3.563 ^a	73.25	10.29	28.89	40.23	1.74
BD + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ⁴	5.391	3.473 ^a	1.55 ^b	3.517 ^a	73.35	10.30	28.69	40.31	1.22
BD + <i>Escherichia coli</i> ⁴	5.401	3.496 ^a	1.54 ^b	3.520 ^a	73.12	10.09	29.11	38.55	1.61
BD + <i>Saccharomyces boulardii</i> ⁴	5.537	3.584 ^a	1.55 ^b	3.557 ^a	73.77	10.29	28.16	40.77	1.51
BD + Blend of probiotics ⁵	5.362	3.495 ^a	1.54 ^b	3.520 ^a	74.23	10.32	28.02	40.47	1.73
SEM	0.0685	0.0338	0.0140	0.0469	0.5740	0.2416	0.5849	0.7555	0.1823
P-value	0.2391	<0.0001	<0.0001	0.0007	0.3904	0.8836	0.1871	0.1125	0.5558

FI: feed intake; WG: weight gain; FC: feed conversion; LW: live weight; AF: abdominal fat.

¹ BD: basal diet without probiotic and zinc bacitracin, formulated according to the nutritional requirements reported in the lineage manual (COBB, 2018) to broilers from 1 to 7, 8 to 21, 22 to 35, and 36 to 42 days of age.

² Zinc bacitracin 15% was added to the feed at 0.37 g/kg, corresponding to 55 mg of active ingredient/kg of feed.

³ Commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁴ Non-commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁵ Combination of the non-commercial probiotics *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *E. coli*, and *S. boulardii* (1×10^9 CFU of each probiotic/kg of feed, totaling 4×10^9 CFU/kg of feed).

^{a, b} Different lowercase letters in the same column differ by Tukey's test ($P < 0.05$).

Table 4. Cloacal temperature, length and weight intestinal, and enzyme activity in the jejunum of broilers fed diets containing probiotics and exposed to heat stress from 15 days of age.

	At 42 days of age				
	Cloacal temperature (°C)	Whole intestine + pancreas		Myeloperoxidase ⁶	Eosinophil peroxidase ⁶
		Centimeters	Grams		
Basal diet (BD) ¹	41.2 ^b	205.72	155.16	0.665	0.010
BD + zinc bacitracin ²	41.2 ^b	193.17	142.04	0.521	0.011
BD + <i>Bacillus subtilis</i> ³	41.4 ^b	196.02	145.13	0.469	0.010
BD + <i>Lactococcus lactis</i> ⁴	41.2 ^b	190.93	143.37	0.587	0.010
BD + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ⁴	41.5 ^{ab}	197.38	128.13	0.326	0.012
BD + <i>Escherichia coli</i> ⁴	41.9 ^a	192.33	145.48	0.423	0.015
BD + <i>Saccharomyces boulardii</i> ⁴	41.5 ^{ab}	184.42	146.63	0.713	0.016
BD + Blend of probiotics ⁵	41.4 ^b	194.47	142.18	0.614	0.019
SEM	0.0904	4.3491	5.3394	0.1474	0.0027
P-value	0.0001	0.0890	0.0850	0.6097	0.1200

¹ BD: basal diet without probiotic and zinc bacitracin, formulated according to the nutritional requirements reported in the lineage manual (COBB, 2018) to broilers from 1 to 7, 8 to 21, 22 to 35, and 36 to 42 days of age.

² Zinc bacitracin 15% was added to the feed at 0.37 g/kg, corresponding to 55 mg of active ingredient/kg of feed.

³ Commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁴ Non-commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁵ Combination of the non-commercial probiotics *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *E. coli*, and *S. boulardii* (1×10^9 CFU of each probiotic/kg of feed, totaling 4×10^9 CFU/kg of feed).

⁶ Results are expressed as enzyme units (based on absorbance)/mg of jejunum.

^{ab} Different lowercase letters in the same column differ by Tukey's test ($P < 0.05$).

Table 5 Histomorphometry of the jejunum of broilers fed diets containing probiotics and exposed to heat stress from 15 days of age.

	At 42 days of age							
	VH (μm)	VW (μm)	CD (μm)	CW (μm)	MH (μm)	V/C	VSA (mm^2)	IAA (mm^2)
Basal diet (BD) ¹	517.58	38.12	40.86	27.55	722.12	12.87	0.273	0.621
BD + zinc bacitracin ²	444.25	37.52	36.06	23.72	633.69	12.56	0.200	0.563
BD + <i>Bacillus subtilis</i> ³	517.63	41.46	38.71	25.34	714.79	13.65	0.275	0.664
BD + <i>Lactococcus lactis</i> ⁴	388.03	43.21	37.17	24.06	587.35	10.84	0.155	0.518
BD + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ⁴	395.08	39.15	34.99	22.08	576.73	11.37	0.161	0.519
BD + <i>Escherichia coli</i> ⁴	486.38	44.53	40.15	25.10	707.81	12.34	0.248	0.636
BD + <i>Saccharomyces boulardii</i> ⁴	486.38	39.22	34.41	25.83	640.97	14.22	0.249	0.606
BD + Blend of probiotics ⁵	496.02	38.07	41.80	26.93	689.67	11.96	0.254	0.602
SEM	32.7516	2.8725	3.3990	1.3360	53.6579	0.7936	0.0337	0.0432
P-value	0.0529	0.5748	0.6006	0.0762	0.1790	0.0811	0.0567	0.1899

VH: villus height; VW: villus width; CD: crypt depth; CW: crypt width; MH: mucosa height; V/C: villus/crypt ratio; VSA: villus surface area; IAA: intestinal absorption area.

¹ BD: basal diet without probiotic and zinc bacitracin, formulated according to the nutritional requirements reported in the lineage manual (COBB, 2018) to broilers from 1 to 7, 8 to 21, 22 to 35, and 36 to 42 days of age.

² Zinc bacitracin 15% was added to the feed at 0.37 g/kg, corresponding to 55 mg of active ingredient/kg of feed.

³ Commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁴ Non-commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁵ Combination of the non-commercial probiotics *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *E. coli*, and *S. boulardii* (1×10^9 CFU of each probiotic/kg of feed, totaling 4×10^9 CFU/kg of feed).

Table 6 Gene expression in broilers fed diets containing probiotics and exposed to heat stress from 15 days of age.

	At 42 days of age						
	Jejunum						Liver
	Occludin	Zonulin	IL-8	Cholecystokinin	Ghrelin	HSP70	HSP70
Basal diet (BD) ¹	1.86	1.12	1.80	0.71	2.72	1.27	3.11
BD + zinc bacitracin ²	1.03	1.06	1.45	0.18	0.76	0.64	0.42
BD + <i>Bacillus subtilis</i> ³	1.15	3.25	2.08	0.26	2.27	1.37	1.58
BD + <i>Lactococcus lactis</i> ⁴	1.81	1.91	3.75	0.26	3.90	1.74	0.09
BD + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ⁴	1.80	1.68	2.33	0.25	1.98	1.04	0.32
BD + <i>Escherichia coli</i> ⁴	1.03	1.31	0.90	0.17	0.62	0.72	0.82
BD + <i>Saccharomyces boulardii</i> ⁴	2.03	1.49	3.53	0.34	2.30	0.79	0.11
BD + Blend of probiotics ⁵	1.39	1.53	2.59	0.25	0.73	0.82	0.40
SEM	0.4714	0.5571	1.0022	0.0958	0.8479	0.3032	0.6842
P-value	0.4407	0.5526	0.6877	0.2666	0.2267	0.3767	0.3670

HSP70: heat shock protein; IL-8: interleukin-8.

¹ BD: basal diet without probiotic and zinc bacitracin, formulated according to the nutritional requirements reported in the lineage manual (COBB, 2018) to broilers from 1 to 7, 8 to 21, 22 to 35, and 36 to 42 days of age.

² Zinc bacitracin 15% was added to the feed at 0.37 g/kg, corresponding to 55 mg of active ingredient/kg of feed.

³ Commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁴ Non-commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁵ Combination of the non-commercial probiotics *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *E. coli*, and *S. boulardii* (1×10^9 CFU of each probiotic/kg of feed, totaling 4×10^9 CFU/kg of feed).

Table 7 Redox status in broilers fed diets containing probiotics and exposed to heat stress from 15 days of age.

	At 42 days of age					
	Jejunum		Liver		Blood	
	MDA	SOD	MDA	SOD	MDA	SOD
Basal diet (BD) ¹	0.0134	83.98	0.0300 ^a	82.56	0.0406 ^{ab}	51.08 ^c
BD + zinc bacitracin ²	0.0122	79.00	0.0224 ^{ab}	77.72	0.0693 ^{ab}	58.36 ^{bc}
BD + <i>Bacillus subtilis</i> ³	0.0140	81.23	0.0123 ^b	78.63	0.0509 ^{ab}	53.56 ^{bc}
BD + <i>Lactococcus lactis</i> ⁴	0.0115	81.94	0.0183 ^{ab}	77.30	0.0873 ^a	57.52 ^{bc}
BD + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ⁴	0.0196	78.06	0.0151 ^{ab}	79.38	0.0382 ^b	49.00 ^c
BD + <i>Escherichia coli</i> ⁴	0.0168	81.17	0.0176 ^{ab}	74.08	0.0510 ^{ab}	53.96 ^{bc}
BD + <i>Saccharomyces boulardii</i> ⁴	0.0263	79.50	0.0301 ^a	78.20	0.0709 ^{ab}	58.41 ^{bc}
BD + Blend of probiotics ⁵	0.0240	78.47	0.0252 ^{ab}	81.26	0.0635 ^{ab}	70.94 ^a
SEM	0.0043	2.1238	0.0034	2.9487	0.0100	4.2773
P-value	0.1842	0.5159	0.0057	0.6219	0.0399	0.0001

MDA: malondialdehyde, expressed as nmol/mL of jejunum or liver extract, or serum; SOD: superoxide dismutase enzyme, expressed as % activity/mg protein.

¹ BD: basal diet without probiotic and zinc bacitracin, formulated according to the nutritional requirements reported in the lineage manual (COBB, 2018) to broilers from 1 to 7, 8 to 21, 22 to 35, and 36 to 42 days of age.

² Zinc bacitracin 15% was added to the feed at 0.37 g/kg, corresponding to 55 mg of active ingredient/kg of feed.

³ Commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁴ Non-commercial probiotic supplemented alone at a concentration of 1×10^9 CFU/kg of feed.

⁵ Combination of the non-commercial probiotics *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *E. coli*, and *S. boulardii* (1×10^9 CFU of each probiotic/kg of feed, totaling 4×10^9 CFU/kg of feed).

^{a,b,c} Different lowercase letters in the same column differ by Tukey's test ($P < 0.05$).