



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS

**EXPRESSÃO DE MUCINA E TRANSPORTADORES INTESTINAIS E PERFIL
MICROBIANO DE PINTAINHOS DE DIFERENTES LINHAGENS
DESAFIADAS COM *SALMONELLA* ENTERITIDIS**

AREIA
2022

MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS

**EXPRESSÃO DE MUCINA E TRANSPORTADORES INTESTINAIS E PERFIL
MICROBIANO DE PINTAINHOS DE DIFERENTES LINHAGENS
DESAFIADAS COM *SALMONELLA* ENTERITIDIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Patrícia Naves Givisiez
Coorientadores: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Prof. Dr. Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho

AREIA

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237e Santos, Maylane Rayane Brito dos.

Expressão de mucina e transportadores intestinais e perfil microbiano de pintainhos de diferentes linhagens desafiadas com Salmonella Enteritidis / Maylane Rayane Brito dos Santos. - Areia:s.n, 2022.

55 f. : il.

Orientação: Patrícia Naves Givisiez.

Coorientação: Celso José Bruno de Oliveira,
Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Frangos. 3. Linhagens. 4. Microbioma. 5. Salmonelose. I. Givisiez, Patrícia Naves. II. Oliveira, Celso José Bruno de. III. Moreira Filho, Alexandre Lemos de Barros. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636(043.2)



UNIVERSIDADE FEDERAL DÁ PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
UFPB – UFC

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “EXPRESSÃO DE MUCINA É TRANSPORTADORES INTESTINAIS E PERFIL MICROBIANO DE PINTAINHOS DE DIFERENTES LINHAGENS DESAFIADAS COM SALMONELLA ENTERITIDIS”

AUTORA: MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRÍCIA EMÍLIA NAVES GIVISIEZ

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez
Presidente
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof. Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva
Examinador
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP

Documento assinado digitalmente

gov.br

DENISE FONTANA FIGUEIREDO LIMA

Data: 12/09/2022 17:48:49-0300

Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa. Dra. Denise Fontana Figueiredo
Examinadora
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE

Prof. Dr. Heraldo Bezerra de Oliveira
Examinador

Centro Universitário Vale do Ipojuca - UNIFAVIP
Nubia Michelle Vieira da
Silva:04859149483

Digitally signed by Nubia Michelle Vieira da Silva:04859149483
DN: cn=Nubia Michelle Vieira da Silva:04859149483,
ou=IFSERTAOPE - Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Sertão Pernambucano, o=ICPEdu, c=BR
Date: 2022.09.13 11:08:52 -03'00'

Profa. Dra. Núbia Michele Vieira da Silva
Examinadora
Instituto Federal do Sertão Pernambucano - IFSertãoPE

Areia, 29 de agosto de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS – nasceu em Petrolina-PE no dia 10 de abril de 1992. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal do Vale do São Francisco de 2010, diplomando-se em abril de 2016.

Durante a graduação foi bolsista de monitoria no primeiro semestre de 2011 nas disciplinas de Química Geral e Química Analítica Experimental, e bolsista de iniciação científica do CNPq de 2011 a 2012 nos Laboratórios de Microbiologia e Bromatologia Animal, e no período de 2012 a 2014 no laboratório de Nutrição Animal na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Realizou trabalho de conclusão de curso intitulado: Desempenho de codornas europeias em desconforto térmico alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de energia, sob a orientação da professora Dr^a Débora Cristine de Oliveira Carvalho.

No ano de 2016 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba na área de concentração em Produção animal, tendo como linha de pesquisa Fisiologia de Não Ruminantes sob a orientação da professora Dr^a Patrícia Emília Naves Givisiez e finalizou o mestrado em 2018 com dissertação intitulada: Dinâmica de expressão de interleucinas no intestino de pintainhos de diferentes linhagens desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Em 2018 iniciou o doutorado do Programa de Doutorado em Zootecnia da UFPB na área de concentração em Produção de animal, tendo como linha de pesquisa Fisiologia de Não Ruminantes sob a orientação da professora Dr^a Patrícia Emília Naves Givisiez.

À minha família e amigos.

À família LAPOA.

**À amizade, ao companheirismo e por não medirem esforços para
auxiliar-me na rotina laboratorial e no conhecimento científico.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e oportunidade de presenciar tudo isso e ter permitido sobreviver a pandemia.

A universidade pela infraestrutura para realização do experimento.

Aos meus pais pelo apoio durante toda a minha formação e pelo empenho a mim dados para que conseguisse atingir um objetivo, e por acreditarem no meu potencial. E a meus irmãos por me ajudarem em todos os momentos, e me darem o ombro quando tive medo.

A minha orientadora Patrícia Givisiez pela orientação, paciência, amizade e por me abrir a porta para o conhecimento e aprendizagem tanto nos assuntos profissionais como os da vida.

A meus avós em memória: Chiquinho, Lica e Osvaldo, ao qual tenho um enorme apreço e não tiveram a oportunidade de presenciar tudo isso.

A Daniella Gonçalves por me aturar todos os dias e aguentar minhas crises por me sentir incapaz de finalizar esse tão sonhado doutorado. As minhas amigas: Artenia Gama, Cintia Araújo, Núbia Araújo e Patrícia Rodrigues por me apoiarem e dividirem seu tempo comigo, mesmos nos momentos mais difíceis, bem como abrirem mão de seus interesses para ajudar quando preciso, mesmo que distantes.

A Kika que compartilhou todo o doutorado os anseios, medos, alegrias e batalhas da pós-graduação e batalhas que enfrentamos com nós mesmo todos os dias. Por

ter me dado abrigo nas idas a Areia para finalizar o experimento e ter compartilhado seus dias comigo.

Aos meus colegas e amigos: Alexandre Moreira Filho, Candice Maria, Neiton, Silvana Lima, Mauro Saraiva, Núbia Silva, Larissa, Laelia Pessoa, Maria de Fátima, Priscylla Carvalho, Thalís, Hemilly, Daniela, Thamara, Edgley, Danielle, Kilmer, Nathan, Matheus e Daniel pelo convívio no laboratório.

Aos amigos que ganhei na pós e na cidade de Areia por todo auxílio e amizade: Eduarda Brito, Jorginho e Daniel.

À Capes e ao Cnpq pelo financiamento da bolsa de estudos.

Ao professor Walter pela ajuda nas análises estatísticas do presente trabalho. Aos colegas Gustavo e Matheus por auxílio nas análises de 16S.

As minhas melhores amigas Fernanda Sasaki e Graziela Martino, por sempre estarem comigo e me apoiando mesmo distantes.

Aos meus familiares pelo apoio e ajuda tanto financeira como assistencialismo. Principalmente minha querida avó Lucinda, meus tios Marlene e Francisco pelo apoio nas minhas condutas, sempre me dando estrutura para atingir o objetivo de concluir o curso. Ao meu cunhado Elismar Barbosa pelo seu apoio, conhecimento e amizade; sempre dialogando e me ajudando nos assuntos a fim quanto a nosso curso em comum.

Ao Laboratório de Produtos de Origem Animal pela assistência nas condutas das avaliações para o experimento, bem como colegas Alexandre Moreira Filho e Núbia Silva pelos apoios dados nas avaliações laboratoriais e auxílio nas decisões.

Ao professor Paulo Azevedo pela amizade, conselhos e auxílio no ambiente de trabalho.

Aos professores Celso Oliveira, Oliveira Caetano e Danila Campos pelo apoio na condução do experimento. À banca avaliadora de qualificação e defesa: Rafaela, Denise Fontana e Oliveira Caetano por toda colaboração no trabalho e sugestões dadas.

Aos colegas de pós-graduação: Edwilka, Jonathan, Naysson, Rafael, Iara, Fernanda por toda ajuda e parceria nas disciplinas e convívio na UFPB.

E por fim a todos que me ajudaram direto ou indiretamente: os funcionários da instituição (eletricistas, vaqueiro, tratoristas, pessoal da limpeza, seguranças, bibliotecários, etc).

“É impossível progredir sem mudança. Aqueles que não mudam as suas mentes, não conseguem mudar nada.”

(George Bernard Shaw)

EXPRESSION DE MUCINA E TRANSPORTADORES INTESTINAIS E PERFIL MICROBIANO DE PINTAINHOS DE DIFERENTES LINHAGENS DESAFIADAS COM *SALMONELLA* ENTERITIDIS

RESUMO GERAL: Objetivou-se avaliar e comparar a composição e diversidade e a expressão de mucina e transportadores de nutrientes em duas linhagens de frango. A composição do microbioma foi investigada em aves de duas linhagens por meio do sequenciamento do gene 16S do RNA ribossômico (rRNA) em 24, 96 e 168 horas após a inoculação (hpi) com *S. Enteritidis* ou meio de cultura estéril em duas linhagens de frangos. Amostras de mucosa jejunal foram colhidas para extração de RNA e posteriormente avaliação do gene da mucina (*Muc2*), dos transportadores intestinais de glicose (Sglt1, Glut2 e Glut5) e do transportador de aminoácidos (Asct1) e transportador de di-tripeptídeos (PepT1). De acordo com o índice de Shannon, referente ao tempo após inoculação mostra que o índice de diversidade alfa é significativamente menor nos tratamentos com 24h ($P < 0,05$). Os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* foram mais dominantes em 24, 96 e 168 hpi, há maior abundância de *Proteobacteria* em relação a *Firmicutes*, o inverso ocorre para 96 e 168 hpi. Não houve nenhum efeito significativo no período de 24 hpi para os transportadores intestinais, entretanto a expressão foi regulada positivamente para *Muc2* em Label. Além disso houve interação desafio linhagem no período de 168 hpi para *Glut2*. As Linhagens aparentemente apresentam de diferentes mecanismos no transporte intestinal quando desafiadas com *S. Enteritidis*.

Palavras-chave: frangos; linhagens; microbioma; salmonelose.

EXPRESSION OF MUCIN AND INTESTINAL TRANSPORTERS AND MICROBIAL PROFILE OF CHICKS OF DIFFERENT LINEAGES CHALLENGED WITH SALMONELLA ENTERITIDIS

GENERAL ABSTRACT: The objective was to evaluate and compare the composition and diversity and expression of mucin and nutrient transporters in two chicken strains. Microbiome composition was investigated in birds of two strains by sequencing the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene at 24, 96 and 168 hours after inoculation (hpi) with *S. Enteritidis* or sterile culture medium in two strains of chickens. Jejunal mucosa samples were collected for RNA extraction and later evaluation of the mucin gene (*Muc2*), the intestinal glucose transporters (SglT1, Glut2 and Glut5) and the amino acid transporter (Asct1) and di-tripeptide transporter (PepT1). According to the Shannon index, referring to the time after inoculation, it shows that the alpha diversity index is significantly lower in the treatments with 24h ($P < 0.05$). The phyla Proteobacteria and Firmicutes were more dominant at 24, 96 and 168 hpi, there is greater abundance of Proteobacteria in relation to Firmicutes, the opposite occurs at 96 and 168 hpi. There was no significant effect at 24 hpi for intestinal transporters, however expression was upregulated for *Muc2* in Label. In addition, there was lineage challenge interaction in the period of 168 hpi for *Glut2*. The strains apparently have different mechanisms in intestinal transport when challenged with *S. Enteritidis*.

Keywords: broilers; line; microbioma; salmonellosis.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos primers utilizados na qPCR:

61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1. Curvas de rarefação de amostras para cada ponto de tempo em horas pós inoculação (24, 96 e 168 hpi) 39
- Figura 2. Alfa diversidade pelo índice de Shannon para 24, 96 e 168 horas pós inoculação (hpi) em aves de diferentes linhagens inoculadas ou não com *Salmonella* aos 2 dias de idade..... 40
- Figura 3. Alfa diversidade pelo índice de Shannon para 24, 96 e 168 horas pós inoculação (hpi) em aves de diferentes linhagens inoculadas ou não com *Salmonella* aos 2 dias de idade..... 41
- Figura 4. Análise de Beta diversidade comparando todos os fatores (linhagens, desafio e período em horas). Análise Multivariada Permutacional de Variância usando matrizes de distância realizada com base no índice de Bray-Curtis..... 42
- Figura 5. Análise de Beta diversidade comparando os diferentes tempos após a inoculação. Análise Multivariada Permutacional de Variância usando matrizes de distância realizada com base no índice de Bray-Curtis..... 43
- Figura 6. Análise de Beta diversidade comparando os diferentes genótipos de frangos (Cobb e Label Rouge). Análise Multivariada Permutacional de Variância usando matrizes de distância realizada com base no índice de Bray-Curtis..... 43
- Figura 7. Abundância relativa de comunidades microbianas cecais em nível de filo comparando duas linhagens (Cobb e Label), horas pós inoculação (24, 96 e 168 hpi) e aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (Salm) ou caldo estéril (Sham)..... 45
- Figura 8. Abundância relativa de comunidades microbianas cecais em nível de gênero comparando duas linhagens (Cobb e Label), horas pós inoculação (24, 96 e 168 hpi) e aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (Salm) ou caldo estéril (Sham).) 46
- Figura 9. Análise de múltiplos grupos. Comparação entre as abundâncias dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente nos diferentes tratamentos por meio do gráfico Heatmap, utilizando análise de cluster..... 47
- Figura 10. Análise de múltiplos grupos. Comparação entre as abundâncias dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente ($p < 0.05$) por meio do gráfico Heatmap, utilizando análise de cluster, analisando os tratamentos de acordo com o tempo após a inoculação..... 48

Figura 11. Análise de abundância diferencial. Os gráficos apresentam a comparação da abundância dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente quando comparamos os diferentes tempos após a inoculação..... 49

Figura 12 - Análise de múltiplos grupos. A) Comparação entre as abundâncias dos Gêneros que se diferenciaram estatisticamente por meio do gráfico Heatmap, utilizando análise de cluster, analisando os tratamentos de acordo com a inoculação ou não com Salmonela. B) Os gráficos apresentam a comparação da abundância dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente ($p < 0.05$) quando comparamos a inoculação ou não com Salmonella 50

Capítulo 2

Figura 1. Expressão dos genes transportadores de glicose (*Sglt1* e *Glut2*), frutose (*Glut5*), aminoácidos (*Asct1*) e di e tripeptídeos (*PepT1*) no jejuno de aves 24 horas pós-infecção, considerando-se linhagens (A) e infecção com *Salmonella* Enteritidis (B). Não houve diferenças significativas para esses parâmetros..... 63

Figura 2. Expressão dos genes transportadores de glicose (*Sglt1*), frutose (*Glut5*), aminoácidos (*Asct1*) e di e tripeptídeos (*PepT1*) no jejuno de aves 168 horas pós-infecção, considerando-se linhagens (A) e infecção com *Salmonella* Enteritidis (B). O asterisco indica diferença estatística entre as duas linhagens (*PepT1*) ou entre infecção ou não com SE (*Glut5*)..... 63

Figura 3. Expressão do gene transportador de glicose (*Glut2*) no jejuno de aves 168 horas pós infecção. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as linhagens Cobb e Label Rouge dentro de cada grupo de desafio; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre não infectadas e infectadas dentro de uma mesma linhagem 64

Figura 4. Expressão do gene da mucina (*Muc2*) no jejuno de aves 24 (A) e 168 horas pós infecção (B). Em 24 hpi (A), letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as linhagens Cobb e Label Rouge dentro de cada grupo de desafio; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre não infectadas e infectadas dentro de uma mesma linhagem. Não houve diferenças entre linhagens e infecção no período de 168 hpi (B)..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAs –aminoácidos

AATs - transportadores de aminoácidos

ASCT1 - Transportador de aminoácidos alanina, serina, cisteína e treonina um

GADPH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Glut2 - Proteína transportadora de glicose dois

Glut5 - Transportador de frutose

HMBS - hidroximetilbilano sintase

MUC2 - Mucina dois

PepT1 - Transportador de peptídeo um

SglT1 - Co-transportador de sódio e glicose um

TGI - Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------|----|
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 17 |
|-----------------------------|----|

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| <u>Diversidade e microbioma cecal de aves de diferentes linhagens submetidas a desafio oral por <i>Salmonella Enteritidis</i></u> | 19 |
| RESUMO | 20 |
| ABSTRACT | 20 |
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 2.1. INCUBAÇÃO DOS OVOS | 22 |
| 2.2. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DAS AVES | 22 |
| 2.3. EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO POR PCR | 23 |
| 2.4. CONSTRUÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE BIBLIOTECA..... | 24 |
| 2.5. PROCESSAMENTO DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 24 |
| 3. RESULTADOS | 25 |
| 3.1. ALFA DIVERSIDADE - CURVA DE RAREFAÇÃO..... | 25 |
| 3.2. ALFA DIVERSIDADE – ÍNDICE DE SHANNON..... | 25 |
| 3.3. BETA DIVERSIDADE | 28 |
| 4. DISCUSSÃO | 38 |
| 5. CONCLUSÃO | 39 |

| | |
|--|-----------|
| REFERÊNCIAS | 40 |
| | |
| <u>CAPÍTULO II</u> | |
| <u>Expressão gênica de mucina e transportadores intestinais de aves de diferentes linhagens submetidas a desafio oral por <i>Salmonella</i></u> | |
| <u>Enteritidis</u> | 42 |
| RESUMO | 43 |
| ABSTRACT | 43 |
| 1. INTRODUÇÃO | 44 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 2.1. INCUBAÇÃO DOS OVOS | 45 |
| 2.2. INSTALAÇÕES E DIETA | 46 |
| 2.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DAS AVES..... | 46 |
| 2.4. EXTRAÇÃO DE RNA E EXPRESSÃO GÊNICA | 47 |
| 2.5. TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA | 48 |
| 3. RESULTADOS..... | 48 |
| 4. DISCUSSÃO | 51 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 52 |
| REFERÊNCIAS | 52 |
| | |
| CONSIDERAÇÕES E IMPLICAÇÕES FINAIS | 55 |

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o maior exportador de carne de frango, liderando ainda a quarta posição em consumo com 9,9 milhões de toneladas em 2020. Com base nesses dados, são de extrema importância os cuidados com a cadeia de produção das aves, a fim de evitar problemas sanitários decorrentes de enfermidades como as causadas por salmonelas. A produção e produtividade na cadeia avícola são prejudicadas quando há proliferação de agentes infecciosos, como os provenientes das cepas de *Salmonella* Enteritidis

Os efeitos deletérios podem ocorrer logo no início da vida das aves. À eclosão, apesar de estar anatomicamente completo, a capacidade funcional do sistema digestório ainda é imatura, seja considerando-se a absorção, a digestão ou capacidade imunológica, quando comparado ao sistema em aves adultas, tornando os pintinhos mais susceptíveis a infecções por patógenos, como Salmonelas. As salmoneloses aviárias são doenças causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, que possuem aproximadamente 2400 sorotipos, entre os quais cerca de 200 estão relacionadas a toxinfecções alimentares.

As salmonelas zoonóticas são responsáveis pela maioria dos problemas relacionados a gastroenterite ou por doenças transmitidas por alimento. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto em países emergentes quanto desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos, envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos

As aves comerciais são submetidas a intensos processos de melhoramento genético para aumento da produtividade mas que as tornam mais sensíveis a doenças diversas, incluindo problemas respiratórios e cardiovasculares. Além disso, as diferentes linhagens de frangos de corte apresentam características fisiológicas e imunológicas específicas; aves com intenso melhoramento genético perderam as características como rusticidade e resistência a doenças, enquanto aves pouco melhoradas e com crescimento lento, como as de criações orgânicas ou alternativas, possuem elementos genéticos que as capacitam para uma melhor resistência a algumas enfermidades.

As diferenças de desempenho dos animais estão relacionadas com o potencial genético das linhagens, idade ao abate, sexo, manejo, nutrição e sanidade. Além disso, mudanças no ambiente de criação, que diminuem as condições de estresse, são fatores essenciais para o aumento da produtividade e rentabilidade do sistema de produção, com isso a imunologia apresenta comportamento específico em determinadas espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie, entretanto os estudos nesse sentido ainda estão em processo de entendimento.

Ao longo do tempo, pesquisas na área de imunologia têm tido como objetivo elucidar como as células do sistema imune são ativadas e interagem para proteger o hospedeiro da invasão e da disseminação de microrganismos patogênicos. Além das diferenças das proporções de células do sistema imune nas diferentes linhagens de aves, há variação na microbiota intestinal, a qual tem influência direta sobre a competição entre os microrganismos e sobre o desempenho das aves. A microbiota intestinal ou microbioma é uma complexa comunidade de microrganismos que reside ou transita pelo trato intestinal, sendo formado por centenas de espécies distintas de bactérias e outros microrganismos. A caracterização do microbioma através da microbiologia clássica é limitada pelo fato de só se isolar uma parte dos microrganismos realmente presentes no TGI, impedindo uma visualização mais completa da dinâmica entre hospedeiro e microbiota residente.

Há grande número de trabalhos que relatam variações na microbiota quando se compara animais *germe-free* a animais inoculados com *Salmonella* Enteritidis, porém pouco conhecimento há sobre o desafio bacteriano em diferentes genótipos de frangos. Além disso, com as novas mudanças de formato de criações que serão implantadas visando o bem-estar das aves e a criação de aves com acesso ao ar livre, torna-se fundamental o entendimento da dinâmica das aves de crescimento lento que possivelmente possam ser utilizadas e/ou adaptadas para aves comerciais ou de crescimento rápido.

Com base nisso, o trabalho tem como objetivo avaliar e comparar dois genótipos de frangos (crescimento lento versus crescimento rápido) sob o aspecto da microbiota cecal e no transporte intestinal de proteínas e glicose.

CAPÍTULO I – Artigo I

Diversidade e microbioma cecal de aves de diferentes linhagens submetidas a desafio oral por *Salmonella* Enteritidis

Diversidade e microbioma cecal de aves de diferentes linhagens submetidas adesafio oral por *Salmonella* Enteritidis

Resumo

Objetivou-se avaliar a composição da microbiota de duas linhagens de frango desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis. A composição do microbioma foi investigada em aves de duas linhagens por meio do sequenciamento do gene 16S do RNA ribossômico (rRNA) em 1, 4 e 7 dias após a inoculação (dpi) com *S. Enteritidis* ou meio de cultura estéril. De acordo com o índice de Shannon, referente ao tempo após inoculação mostra que o índice de diversidade alfa é significativamente menor nos tratamentos com 24h ($P < 0,05$). Os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* foram mais dominantes em 24, 96 e 168 hpi, há maior abundância de *Proteobacteria* em relação a *Firmicutes*, o inverso ocorre para 96 e 168 hpi. A microbiota das aves das linhagens Label e Cobb apresentam dinâmica diferenciada, o que provavelmente permite que a linhagem de crescimento lento (Label) tenha uma composição de bactérias benéficas que viabiliza melhor resposta ao combate a patógenos como *Salmonella*.

Palavras-chaves: Cobb, Intestino, Label, Patógeno, Sequenciamento.

Diversity and cecal microbiome of birds of different strains submitted to oral challenge by *Salmonella* Enteritidis

Abstract

The objective was to evaluate the microbiota composition of two chicken lines challenged or not with *Salmonella* Enteritidis. Microbiome composition was investigated in birds of two strains by sequencing the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene at 1, 4 and 7 days after inoculation (dpi) with *S. Enteritidis* or sterile culture medium. According to the Shannon index, referring to the time after inoculation, it shows that the alpha diversity index is significantly lower in the treatments with 24h ($P < 0.05$). The phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes* were more dominant at 24, 96 and 168 hpi, there is greater abundance of *Proteobacteria* in relation to *Firmicutes*, the opposite occurs at 96 and 168 hpi. The microbiota of birds of the Label and Cobb strains have different dynamics, which probably allows the slow-growing strain (Label) to have a

composition of beneficial bacteria that enables a better response to fight pathogens such as Salmonella.

Keywords: Cobb, Gut, Label, Pathogen, Sequencing.

1. Introdução

Centenas de espécies distintas de bactérias e outros microrganismos habitam o trato gastrointestinal dos animais e esta complexa comunidade de microrganismos que reside ou transita pelo trato intestinal é designada como microbiota intestinal (Gerritsen et al., 2011). Foi relatado que a microbiota intestinal de um frango de corte compreende entre 200 a 350 espécies bacterianas diferentes (Sergeant et al., 2014), porém um relato anterior cita que cerca de 640 espécies bacterianas foram identificadas no trato gastrointestinal do frango de corte (Apajalahti et al., 2004). Esta microbiota desempenha uma série de funções no hospedeiro, desde o metabolismo até a maturação imunológica (Oakley et al., 2014). De fato, a presença e a composição da microbiota no trato intestinal estimulam a maturação do epitélio de uma maneira organizada (Cherbuy et al., 2010; El Aidy et al., 2012) e pode contribuir para a renovação do epitélio intestinal e promoção de resistência contra patógenos intestinais (Buchon et al., 2009).

A microbiota regula a eficiência absorptiva, afetando a maturação intestinal, a resposta imune, o tempo de permanência do bolo alimentar no trato digestivo e o aproveitamento de alguns nutrientes pouco digestíveis pelas enzimas endógenas do animal (Amit-Romach et al., 2004). É descrito que a microbiota afeta os metabolismos lipídico e energético, e a absorção de glicose pelo hospedeiro, além de fornecer uma fonte extra de vitaminas e minerais (Giella e Di-Rita, 2012; Hrdina et al., 2009; Ichihashi et al., 1992; Kau et al., 2011). O conhecimento dos microrganismos e de sua função metabólica é de grande importância para melhorar o desempenho dos frangos de corte. No trato gastrointestinal há mais células bacterianas do que células do próprio hospedeiro que abriga essa microbiota, e esta varia em número e composição em função da idade da ave e do segmento intestinal avaliado (Macari et al., 2002).

Há grande número de trabalhos que relatam variações na microbiota quando se compara animais germ-free a animais inoculados com *Salmonella* Enteritidis (Sergeant et al., 2014; Zeng et al., 2018; Richards et al., 2019) e outros patógenos como *Campylobacter jejuni* (Thibodeau et al., 2015), entretanto, esses trabalhos estão restritos a linhagens comerciais.

Aves de três linhagens comerciais (Ross, Cobb e Hubbard) tiveram, como característica em destaque do desenvolvimento da microbiota, diminuição de *Enterobacteriaceae* ao longo do tempo (Richards et al., 2019). Esta família de bactérias é considerada importante na

produção avícola, não apenas como patógenos, mas também por seus membros serem portadores de fatores genéticos responsáveis pela resistência antimicrobiana, como genes de beta-lactamase de espectro estendido (Saliu et al., 2017). Em trabalhos do nosso grupo (Santos et al., 2018), foi comprovado que linhagens de crescimento lento apresentam uma dinâmica diferenciada para combater a infecção pelo patógeno quando comparados a linhagem de crescimento rápido como as aves comerciais. Com base nisso, o trabalho tem por objetivo avaliar a microbiota de aves de duas diferentes linhagens de diferentes velocidades de crescimento (Cobb e Label Rouge) na presença ou não de desafio por *Salmonella* Enteritidis, de tal forma que possa gerar informações importantes sobre a modulação da microbiota em aves para estudos de imunonutrição.

2. Materiais e métodos

Todas as práticas de manejo, bem como abate e procedimentos de amostragem da presente pesquisa, foram submetidas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (protocolo de nº 186/2015). O experimento foi conduzido no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), na cidade de Areia – PB.

2.1. Incubação dos ovos

Foram utilizados 200 ovos com peso médio semelhante, provenientes de matrizes da linhagem Cobb500® e Label Rouge®. Os ovos foram distribuídos em três incubadoras artificiais (IP130, incubadoras Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) com controle de temperatura e viragem automática. As incubadoras foram mantidas em condições normais de incubação, com temperatura de 37,7°C, umidade relativa de 60% e viragem a cada duas horas. No décimo primeiro dia de incubação (DE11), procedeu-se à ovoscopia com o objetivo de descartar os embriões mortos e ovos claros. Após a eclosão, 100 pintainhos foram utilizados no experimento, cujo estado negativo para a presença de *Salmonella* foi confirmada por swab cloacal e cultivo bacteriano.

2.2. Infecção experimental das aves

Durante o experimento, frangos de cada linhagem ficaram divididos em dois grupos e alojados separadamente caixas de madeira com acesso livre a água e ração. Aos dois dias de

idade, as aves receberam, via intra-esofágica, 0,5mL de cultura de *Salmonella* Enteritidis ($1,6 \times 10^9$ UFC/mL) ou caldo nutriente estéril. A estirpe de *Salmonella* Enteritidis utilizada possui o gene de resistência ao ácido nalidíxico (SE^{Nal+}). Posteriormente as aves foram divididas em 4 (quatro) tratamentos, em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), sendo eles: Cobb sem Salmonela, Cobb com Salmonela, Label sem salmonela e Label com salmonela. Cada tratamento era composto por 25 (vinte e cinco) repetições, totalizando cem (100) aves.

Desta forma, 25 frangos Cobb foram inoculados por via oral com SE^{Nal+} , enquanto 25 frangos Cobb foram tratadas apenas com caldo nutriente estéril; 25 frangos Label foram inoculados por via oral com SE^{Nal+} , enquanto 25 frangos Label foram tratadas com caldo nutriente estéril. Seis aves selecionadas aleatoriamente de cada grupo foram sacrificadas por deslocamento cervical (seguindo as recomendações de boas práticas de eutanásia em animais) para coletar o conteúdo do ceco em diferentes horas pós inoculação: 24 hpi, 96 hpi e 168 hpi que correspondem 1, 4 e 7 dias pós inoculação (dpi), respectivamente. As amostras (100 mg) foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e imediatamente congeladas em ultra freezer a -80° .

2.3. Extração de DNA e amplificação por PCR

O DNA microbiano foi extraído das amostras usando o kit comercial (Power Soil DNA Isolation Kit, Qiagen, Alemanha) de acordo com os protocolos do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado por fluorometria (Qubit®3.0, Life Invitrogen, Estados Unidos). A região V3-V4 do gene rRNA ribossomal 16S foi amplificada por PCR usando a 2,5 μ L de DNA (5ng/ μ l), 5 μ l de cada primer (1 μ M) ; 12,5 de KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, South Africa) em volume total de 25 μ l. Os primers usados foram: 16SF: 5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG -3' e 16SR: 5'- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C -3'. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95° C por 3 min, seguido por 25 ciclos a 95° C por 30 s, 55° C por 30 s e 72° C por 30 s e uma extensão final a 72° C durante 5 min.

Os produtos de amplificação foram visualizados em de gel de agarose a 1,5%. Posteriormente, foi realizada a limpeza do produto da PCR utilizando 52,5 μ L de Tris (10 nM), 20 μ L de AMPure XP beads (Beckman Coulter, EUA) e 400 μ L de etanol 80% (Fisher BioReagents™, Bélgica). Os produtos de PCR purificados foram quantificados por fluorometria (Qubit®3.0, Life Invitrogen, Estados Unidos) e a qualidade foi avaliada usando o sistema de eletroforese capilar (Fragment Analyzer, Agilent).

2.4. Construção e Sequenciamento da Biblioteca

O produto da PCR, após a limpeza e quantificação, foi utilizado para construir a biblioteca utilizando-se o Index Nextera XT (Illumina, EUA). O sequenciamento foi realizado com kit Illumina V2(2 × 250 pb) em uma plataforma Illumina MiSeq de acordo com o protocolo padrão. Foi adicionado 15% de DNA Phix para o controle do sequenciamento (Kit Phix, Illumina).

2.5. Processamento de dados de sequenciamento e análise estatística

As sequências demultiplexadas em pares (*Paired-end reads*) foram obtidas da plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq em formato fastq e posteriormente processadas pela plataforma QIIME2. As sequências foram agrupadas (Joined), selecionadas pelos tamanhos (>240pb) de acordo com o controle de qualidade usando o PHRED score (Q>20) e derreplicadas por meio do VSEARCH. As quimeras foram verificadas e removidas utilizando o UCHIME. Foi realizado o agrupamento pelo método De Novo com 99% de similaridade para a obtenção das ASVs (Amplicon Sequence Variant). O número de sequências por amostra foi normalizado com base na amostra com menor número de sequências. A classificação taxonômica foi atribuída utilizando o método Naïve Bayes sobre o banco de dados SILVA (<https://www.arb-silva.de/>) com 99% para região V3-V4. As análises de alfa e beta diversidade foram realizadas utilizando os pacotes phyloseq e DESeq2 do programa R (R Core Team, 2021). As análises comparativas de múltiplos grupos foram realizadas por meio do programa estatístico STAMP (<https://beicolab.cs.dal.ca/software/STAMP>), utilizado o método de Farthest Neighbor e o teste estatístico ANOVA com nível de significância de 0,05 de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Análise de Diversidade

A diversidade de espécies contida nas amostras pode ser medida através da diversidade alfa que está representada através das curvas de rarefação (Figura 1) e da diversidade através do índice de Shannon (Figuras 2 e 3) representadas a seguir:

3.2. Alfa diversidade - Curva de rarefação

Foram selecionadas e padronizadas cinco amostras por tratamento com base análise das curvas de rarefação, com profundidade de 4000 *reads* por amostra (Figura 1).

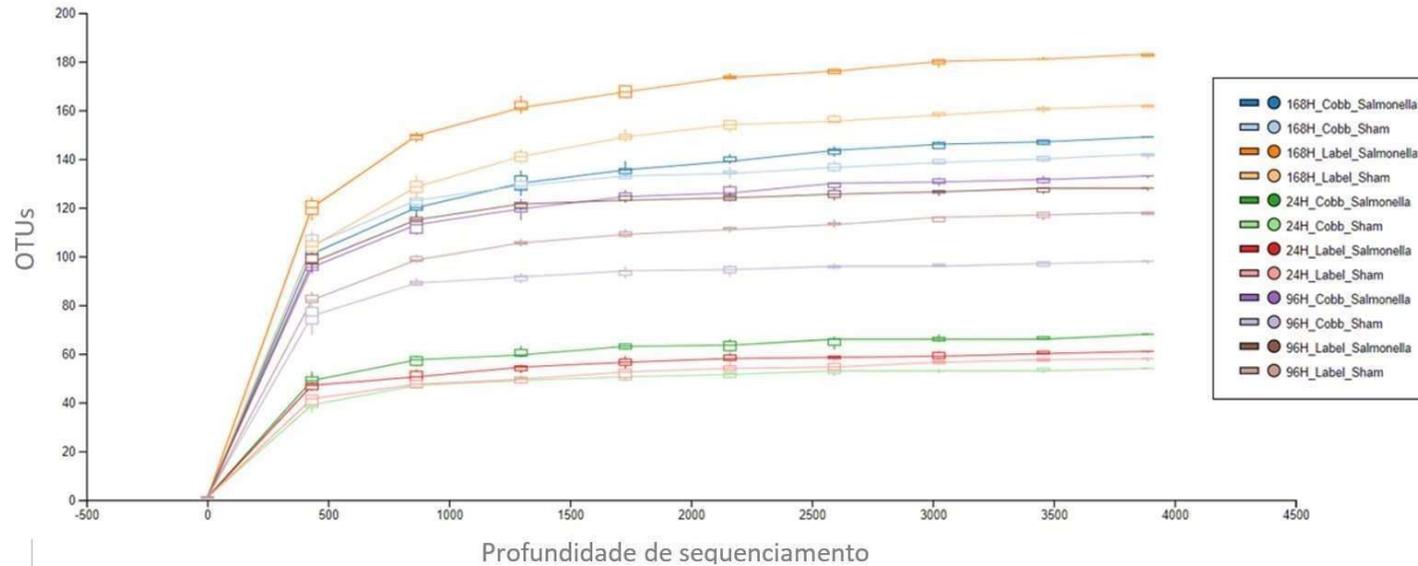


Figura 1. Curvas de rarefação de amostras para cada ponto de tempo em horas pós inoculação (24, 96 e 168 hpi). 168H_Cobb_Salm (Cobb com salmonela às 168 horas pós-inoculação/hpi), 168H_Cobb_Sham (Cobb controle às 168 hpi), 168_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 168 hpi) , 168_Label_Sham (Label controle às hpi), 96H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 96 hpi), 96H_Cobb_Sham (Cobb controle às 96 hpi), 96_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 96 hpi) e 96_Label_Sham (Label controle às 96 hpi); 24H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 24 horas pós-inoculação/hpi), 24H_Cobb_Sham (Cobb controle às 24 hpi), 24_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 24 hpi) e 24_Label_Sham (24_Label controle às hpi).

3.3. Alfa diversidade – Índice de Shannon

A análise da diversidade Shannon referente ao tempo após inoculação mostra que o índice de diversidade é significativamente menor nos tratamentos com 24h (Figura 2). A alfa diversidade foi significativamente menor ($p=0.001$) para três dos quatros tratamentos com 24h após a inoculação em relação aos demais tratamentos (Figura 3).

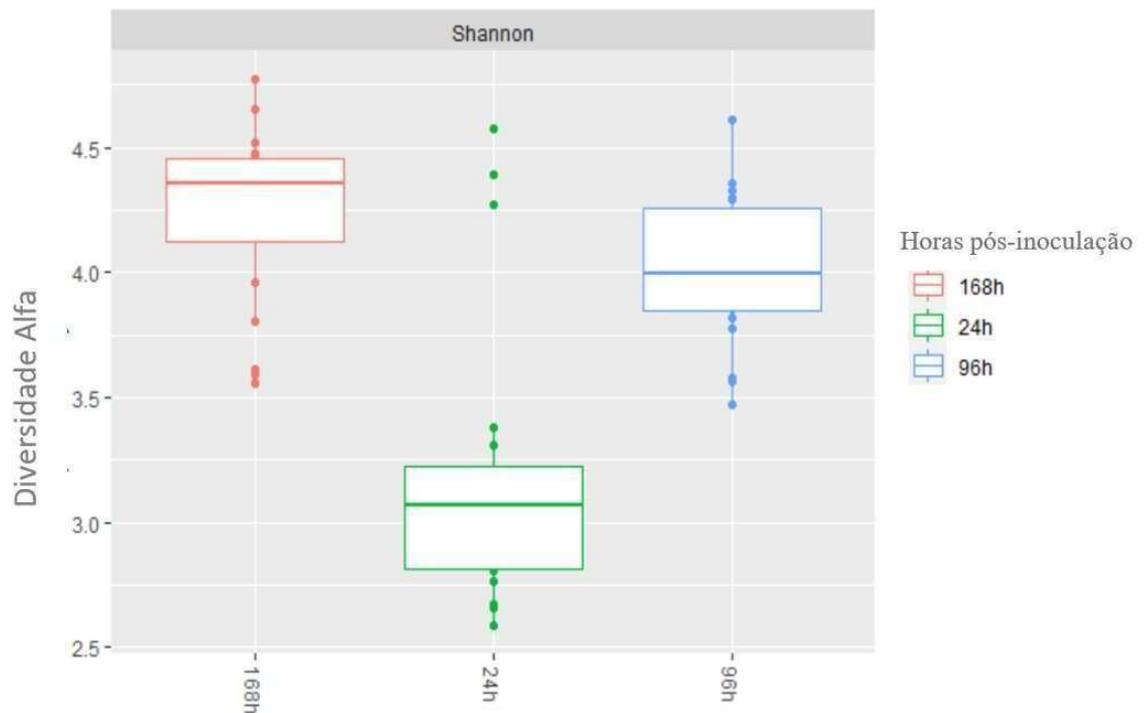


Figura 2. Alfa diversidade pelo índice de Shannon para 24, 96 e 168 horas pós inoculação (hpi) em aves de diferentes linhagens inoculadas ou não com Salmonella aos 2 dias de idade.

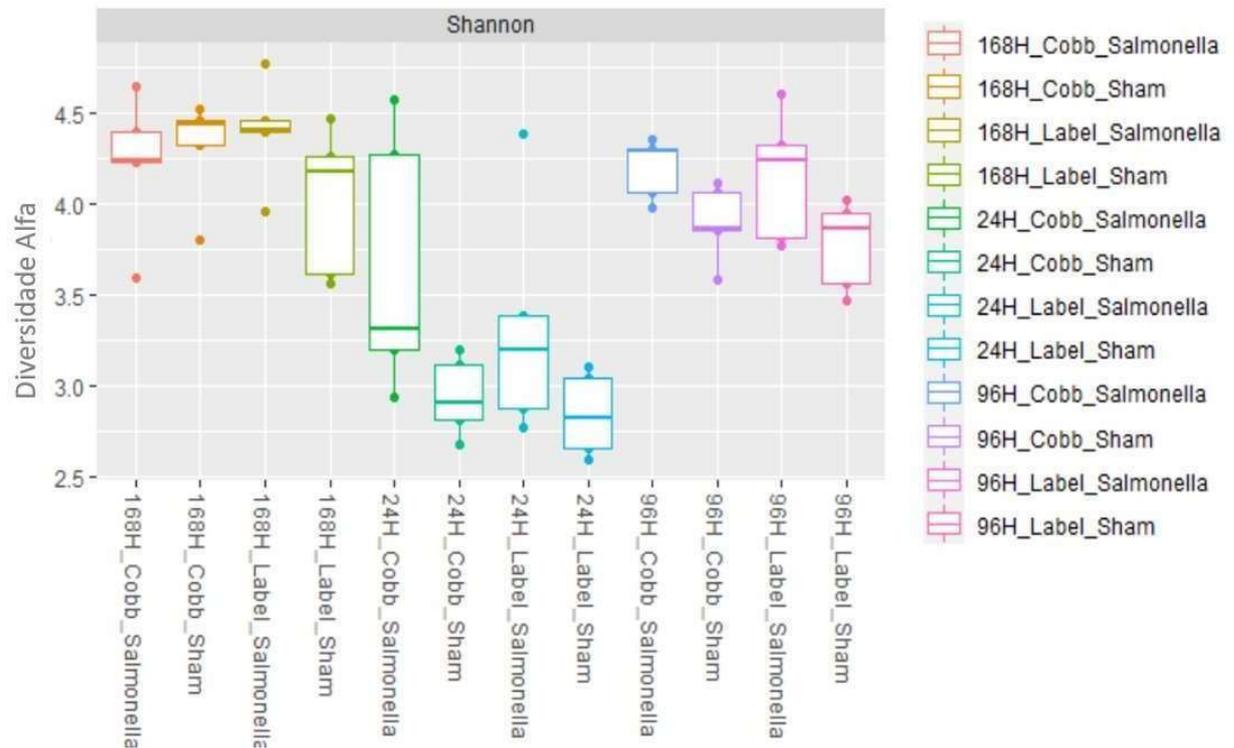


Figura 3. Alfa diversidade pelo índice de Shannon para 24, 96 e 168 horas pós inoculação (hpi) em aves de diferentes linhagens inoculadas ou não com Salmonella aos 2 dias de idade. Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela), Cobb_Sham (Cobb controle), Label_Salmonella (Label com Salmonella) e Label_Sham (Label controle).

3.4. Beta diversidade

Usamos a análise multivariada permutacional de variância usando matrizes de distância realizada com base no índice de Bray-Curtis e representada pela Análise de coordenadas principais (PCoA) para determinar se as amostras foram agrupadas em clusters distintos devido à diversidade beta (Figuras 4, 5 e 6). A análise de agrupamento por PCoA mostrou que há diferença estatística ($p=0.001$) entre os tratamentos (Figura 4), há diferenças estatísticas ($p=0,001$) quando comparados os diferentes tempos após a inoculação (Figura 5) e há diferenças estatísticas ($p=0,003$) quando comparadas as diferentes linhagens de frango (Figura 6). Não houve diferenças estatísticas para o fator desafio (animais inoculados ou não com Salmonella).

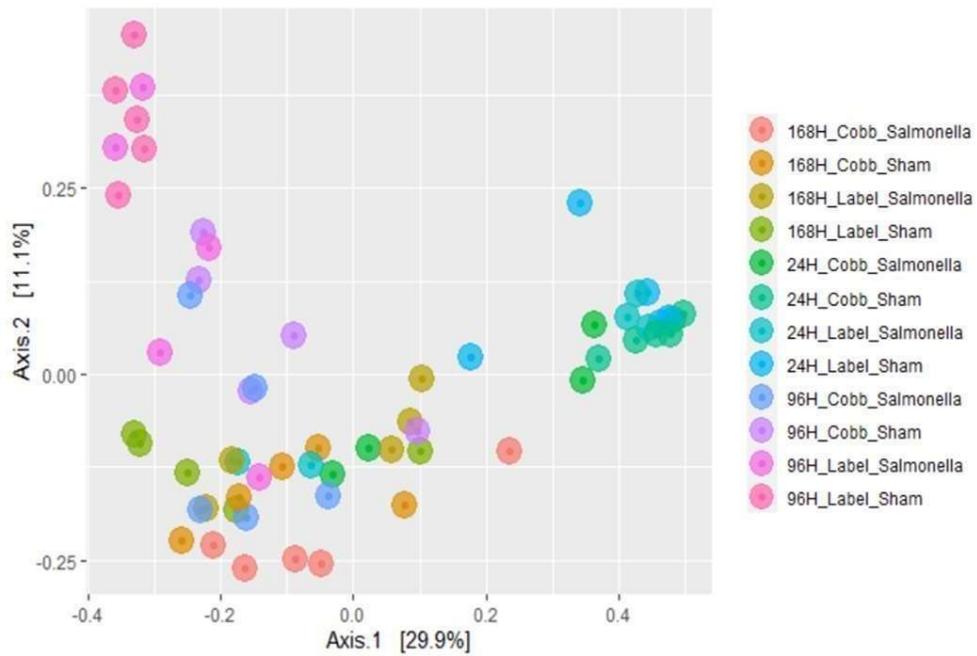


Figura 4. Análise de Beta diversidade comparando todos os fatores (linhagens, desafio e período em horas). Análise Multivariada Permutacional de Variância usando matrizes de distância realizada com base no índice de Bray-Curtis. Legenda: 168H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 168 horas pós-inoculação/hpi), 168H_Cobb_Shram (Cobb controle às 168 hpi), 168_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 168 hpi), 168_Label_Shram (Label controle às hpi), 96H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 96 hpi), 96H_Cobb_Shram (Cobb controle às 96 hpi), 96_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 96 hpi) e 96_Label_Shram (Label controle às 96 hpi); 24H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 24 horas pós-inoculação/hpi), 24H_Cobb_Shram (Cobb controle às 24 hpi), 24_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 24 hpi) e 24_Label_Shram (Label controle às 24 hpi).

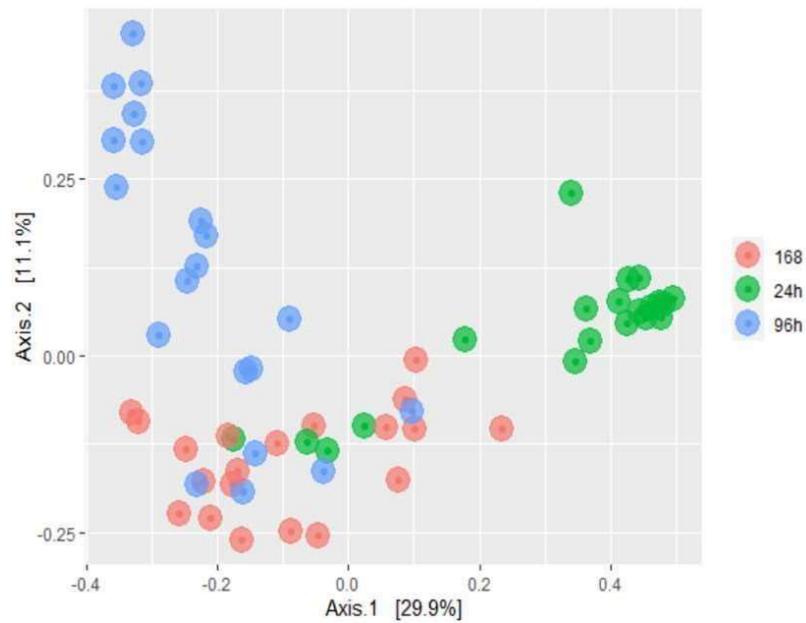


Figura 5. Análise de Beta diversidade comparando os diferentes tempos após a inoculação. Análise Multivariada Permutacional de Variância usando matrizes de distância realizada com base no índice de Bray-Curtis. Legenda: 168 (168 horas pós-inoculação), 24 (24 hpi) e 96 (96 hpi).

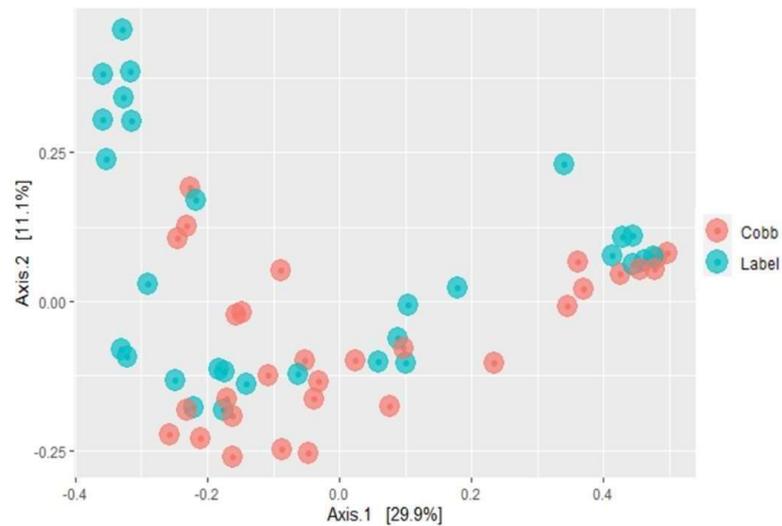


Figura 6. Análise de Beta diversidade comparando os diferentes genótipos de frangos (Cobb e Label Rouge). Análise Multivariada Permutacional de Variância usando matrizes de distância realizada com base no índice de Bray-Curtis.

As diferenças de composição dos filos mais abundantes podem ser visualizadas na figura 7. Os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* foram mais dominantes em 24, 96 e 168 hpi. Em 24 hpi há maior abundância de *Proteobacteria* em relação a *Firmicutes*, o inverso ocorre para 96 e 168 hpi (Figura 7). A abundância relativa a nível de gênero está representada na figura 8; através desse gráfico de barras podemos determinar maior abundância do gênero *Dickeya* às 24 hpi (Figura 8).

Os dados de abundância relativa trazem apenas inferências sobre as comunidades bacterianas, portanto, foi realizada a análise diferencial de múltiplos grupos pelo programa STAMP. A análise diferencial de múltiplos grupos mostrou abundância significativamente diferente de 8 gêneros entre os tratamentos, a saber, *Lactobacillus*, *Dickeya*, *DTU089*, *UCG-009*, *Candidatus_Soleaferrea*, *Clostridia_vandinBB60_group*, *Intestinomas* e *Anaerostignum*. Além disso, é possível observar a formação de dois cluster principais (Figura 9).

Quando comparamos as amostras levando em consideração os tempos após a inoculação, podemos observar novamente que há a formação de dois clusters principais (Figura 10). Um dos cluster apresenta a maior parte das amostras pertencentes aos tratamentos com 24h após a inoculação e o outro cluster agrupa amostras pertencentes aos tratamentos com 96h e 168h após a inoculação. Os gêneros *Dickeya*, *Clostridium_sensu_stricto_1* e *Epulopiscium* apresentaram maior abundância nos tratamentos com 24h após a inoculação. Os gêneros *Lactobacillus*, *Tepidibacter* e *Anaerostignum* apresentaram maior abundância nos tratamentos com 96h após a inoculação. O gênero *Tyzzarella* apresentou maior abundância nos tratamentos com 168h após a inoculação.

Também foi realizada a análise diferencial para comparar as aves desafiadas ou não com *Salmonella* (Figura 12). Não houve uma formação definida dos clusters, porém 6 gêneros (*Ruminococcaceae_Incertae_Sedis*, *Oscillibacter*, *Intestinomas*, *GCA-900066575*, *Clostridia_vandinBB60_group*, *Candidatus_Arthromitus* e *Negativibacillus*) apresentaram abundância significativamente maior nos tratamentos que receberam o desafio com *Salmonella*.

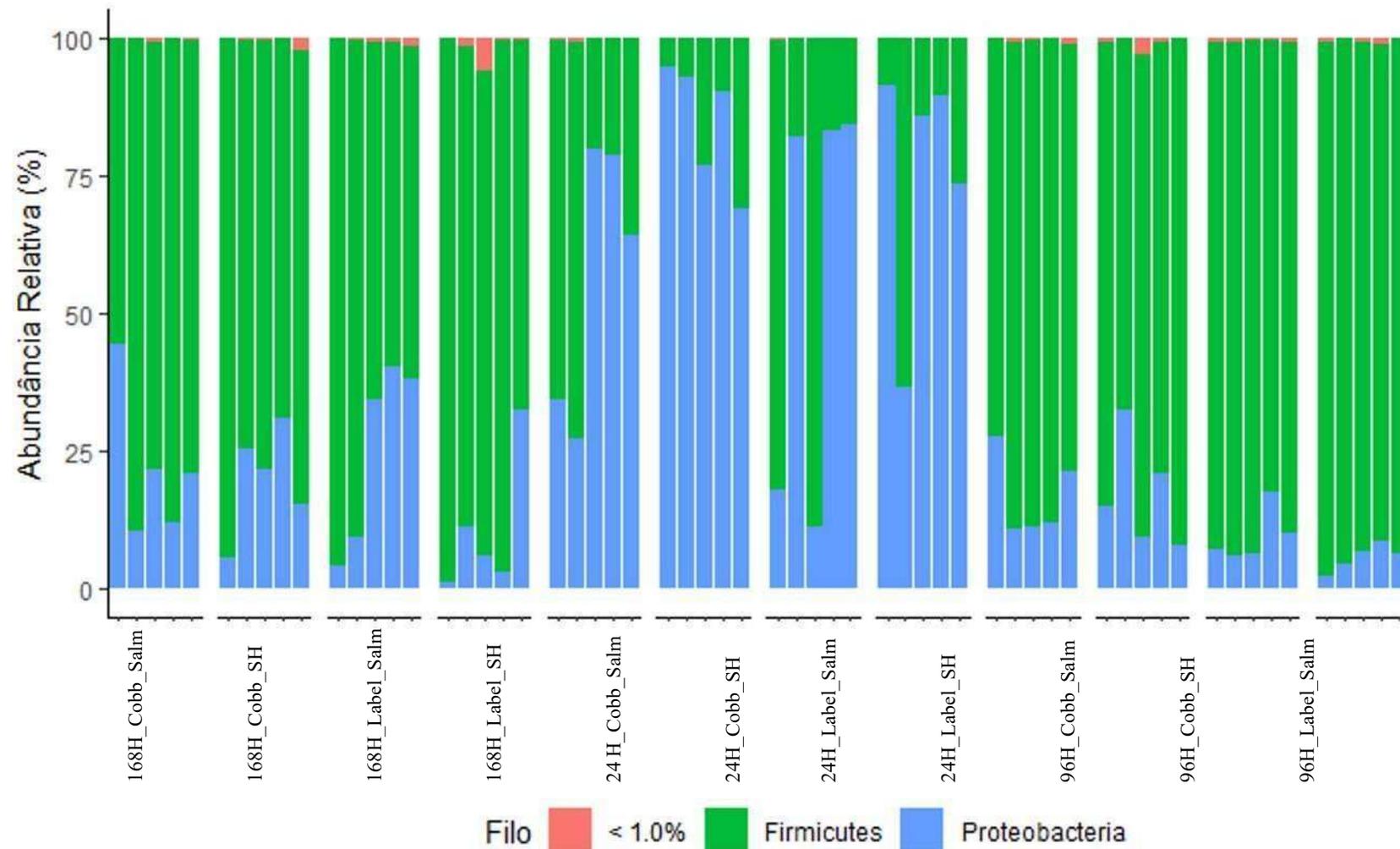


Figura 7. Abundância relativa de comunidades microbianas cecais em nível de filo comparando duas linhagens (Cobb e Label), horas pós inoculação (24, 96 e 168 hpi) e aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (Salm) ou caldo estéril (Sham). 168H_Cobb_Salm (Cobb com salmonela às 168 horas pós-inoculação/hpi), 168H_Cobb_SH (Cobb controle às 168 hpi), 168_Label_Salmonella (Label com Salmonella às 168 hpi), 168_Label_SH (Label controle às hpi), 96H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 96 hpi), 96H_Cobb_SH (Cobb controle às 96 hpi), 96_Label_Salmonella (Label com Salmonella às 96 hpi) e 96_Label_SH (Label controle às 96 hpi); 24H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 24 horas pós-inoculação/hpi), 24H_Cobb_SH (Cobb controle às 24 hpi), 24_Label_Salmonella (Label com Salmonella às 24 hpi) e 24_Label_SH (24_Label controle às hpi).

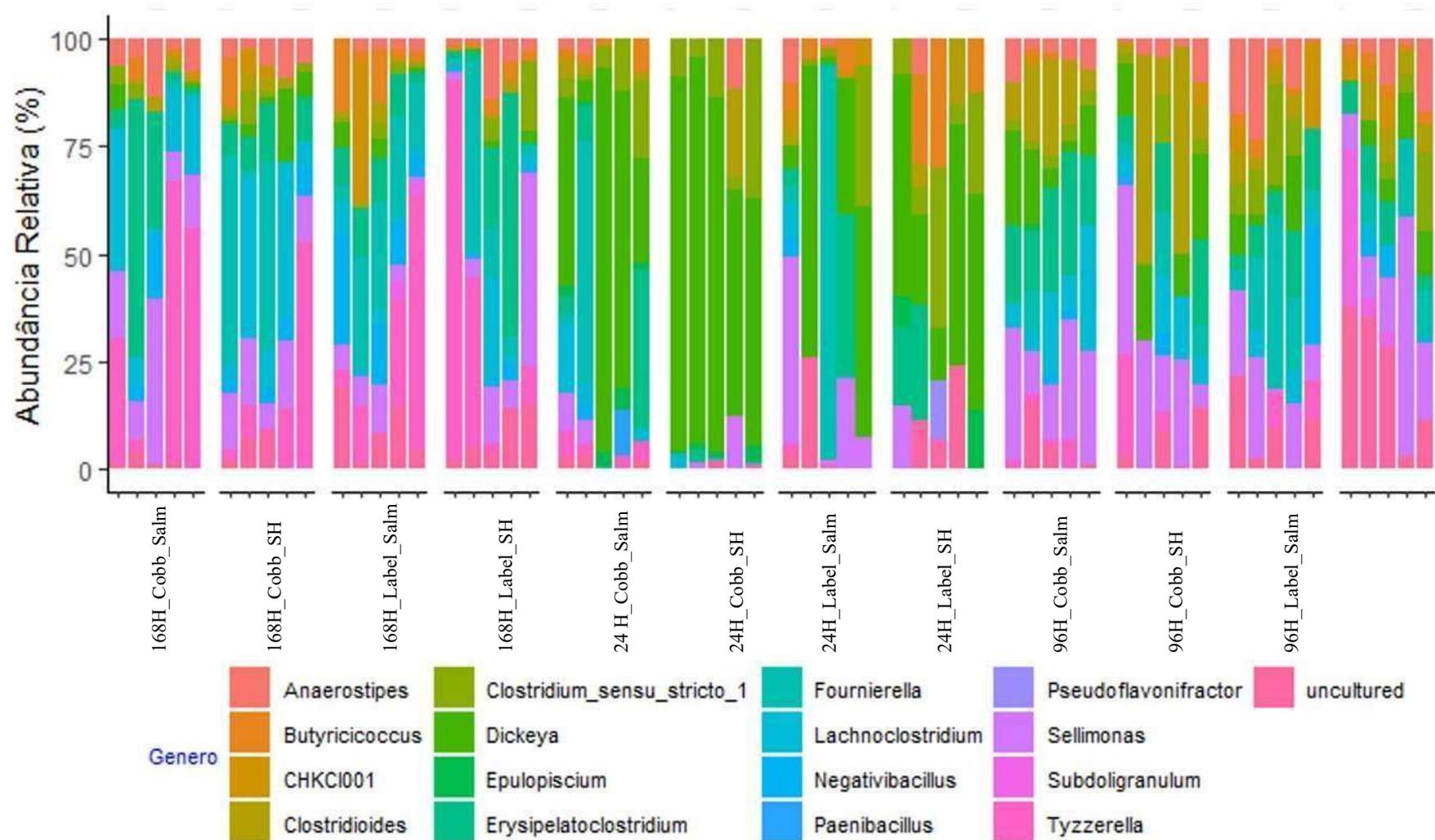


Figura 8. Abundância relativa de comunidades microbianas cecais em nível de gênero comparando duas linhagens (Cobb e Label), horas pós inoculação (24, 96 e 168 hpi) e aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (Salm) ou caldo estéril (Sham). 168H_Cobb_Salm (Cobb com salmonela às 168 horas pós-inoculação/hpi), 168H_Cobb_Sham (Cobb controle às 168 hpi), 168_Label_Salmonella (Label com Salmonella às 168 hpi), 168_Label_Sham (Label controle às hpi), 96H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 96 hpi), 96H_Cobb_Sham (Cobb controle às 96 hpi), 96_Label_Salmonella (Label com Salmonella às 96 hpi) e 96_Label_Sham (Label controle às 96 hpi); 24H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 24 horas pós-inoculação/hpi), 24H_Cobb_Sham (Cobb controle às 24 hpi), 24_Label_Salmonella (Label com Salmonella às 24 hpi) e 24_Label_Sham (24_Label controle às hpi).

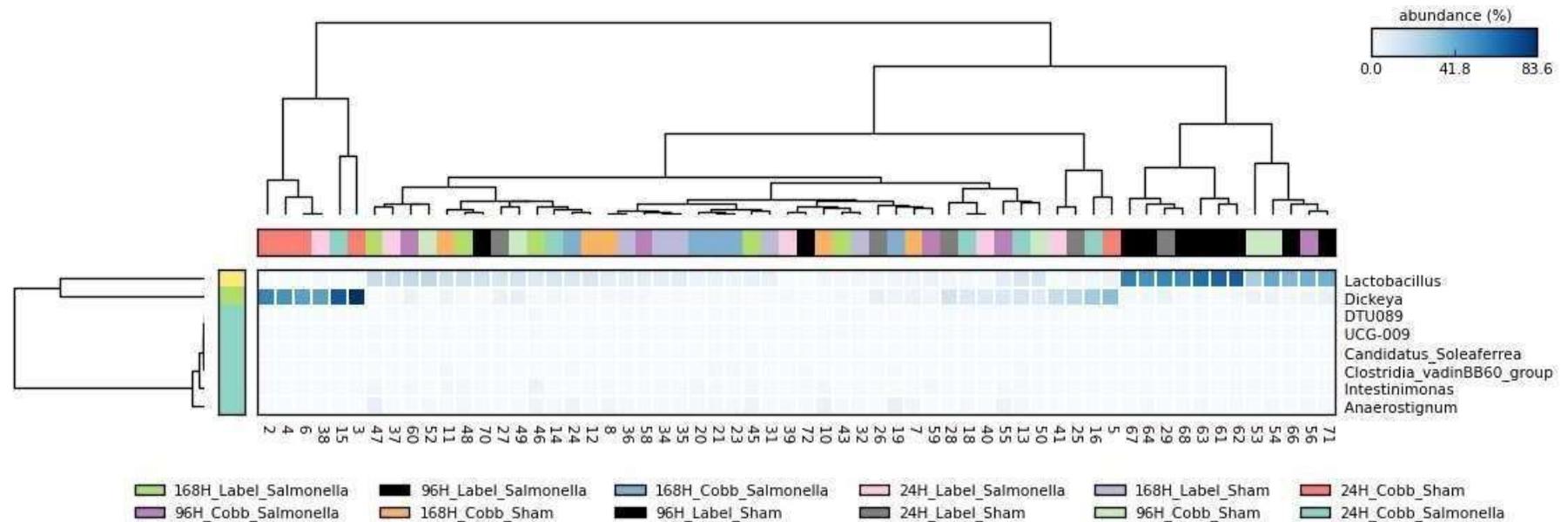


Figura 9. Análise de múltiplos grupos. Comparação entre as abundâncias dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente ($p < 0.05$) nos diferentes tratamentos por meio do gráfico Heatmap, utilizando análise de cluster. 168H_Cobb_Salm (Cobb com salmonela às 168 horas pós-inoculação/hpi), 168H_Cobb_Sham (Cobb controle às 168 hpi), 168_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 168 hpi), 168_Label_Sham (Label controle às hpi), 96H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 96 hpi), 96H_Cobb_Sham (Cobb controle às 96 hpi), 96_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 96 hpi) e 96_Label_Sham (Label controle às 96 hpi); 24H_Cobb_Salmonella (Cobb com salmonela às 24 horas pós-inoculação/hpi), 24H_Cobb_Sham (Cobb controle às 24 hpi), 24_Label_Salmonella (Label com Salmonela às 24 hpi) e 24_Label_Sham (24_Label controle às hpi).

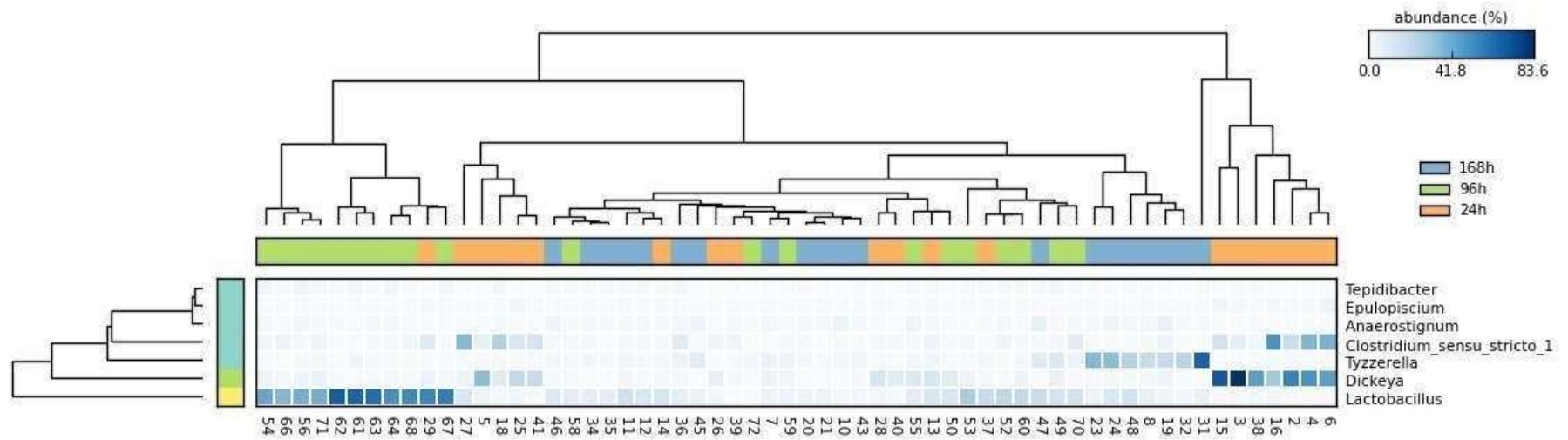


Figura 10. Análise de múltiplos grupos. Comparação entre as abundâncias dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente ($p < 0.05$) por meio do gráfico *Heatmap*, utilizando análise de cluster, analisando os tratamentos de acordo com o tempo após a inoculação.

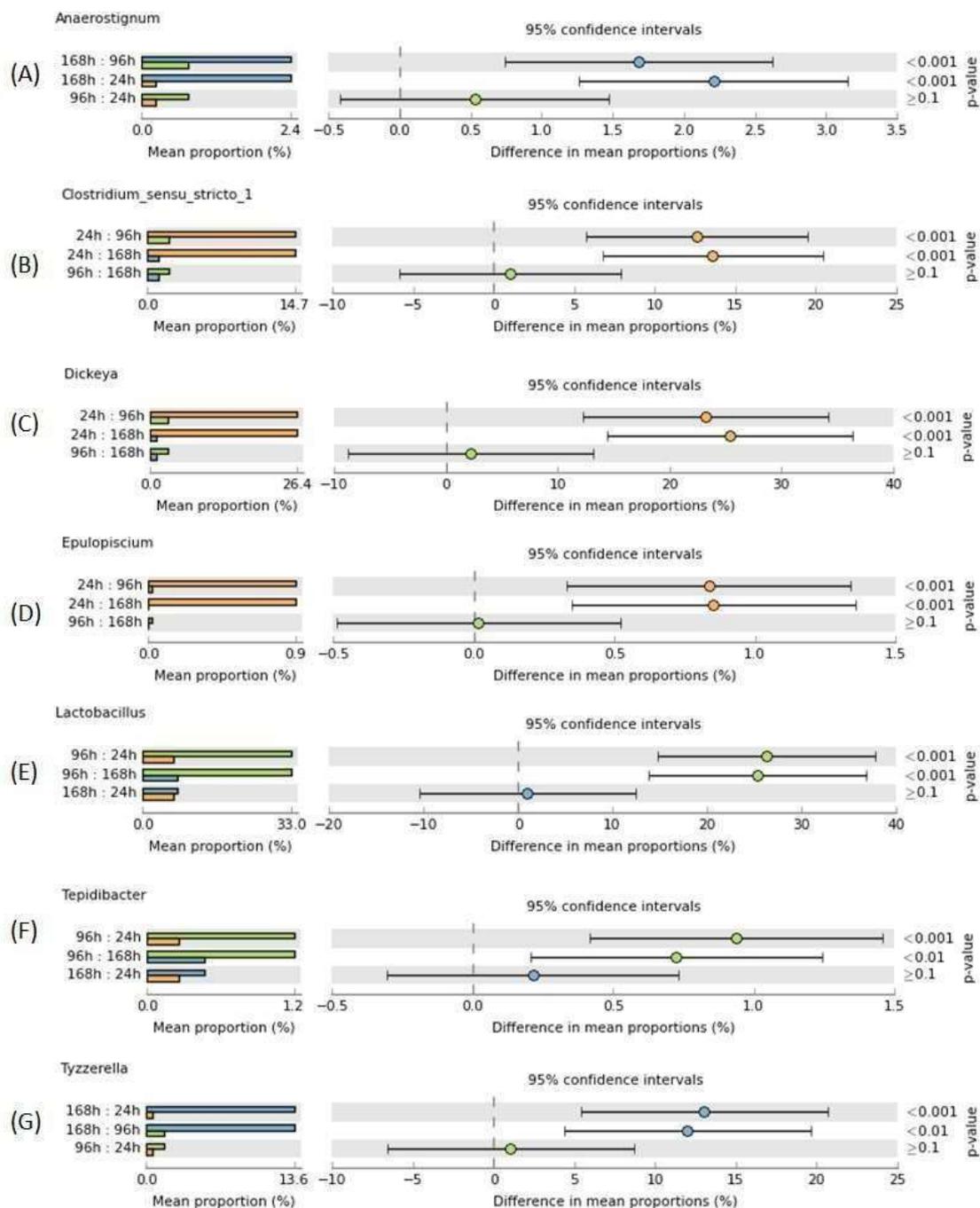


Figura 11. Análise de abundância diferencial. Os gráficos apresentam a comparação da abundância dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente ($p < 0.05$) quando comparamos os diferentes tempos após a inoculação. (a) Abundância diferencial do gênero *Anaerostignum*. (b) Abundância diferencial do gênero *Clostridium_sensu_stricto_1*. (c) Abundância diferencial do gênero *Dickeya*. (d) Abundância diferencial do gênero *Epulopiscium*. (e) Abundância diferencial do gênero *Lactobacillus*. (f) Abundância diferencial do gênero *Tepidibacter*. (g) Abundância diferencial do gênero *Tyzzerella*.

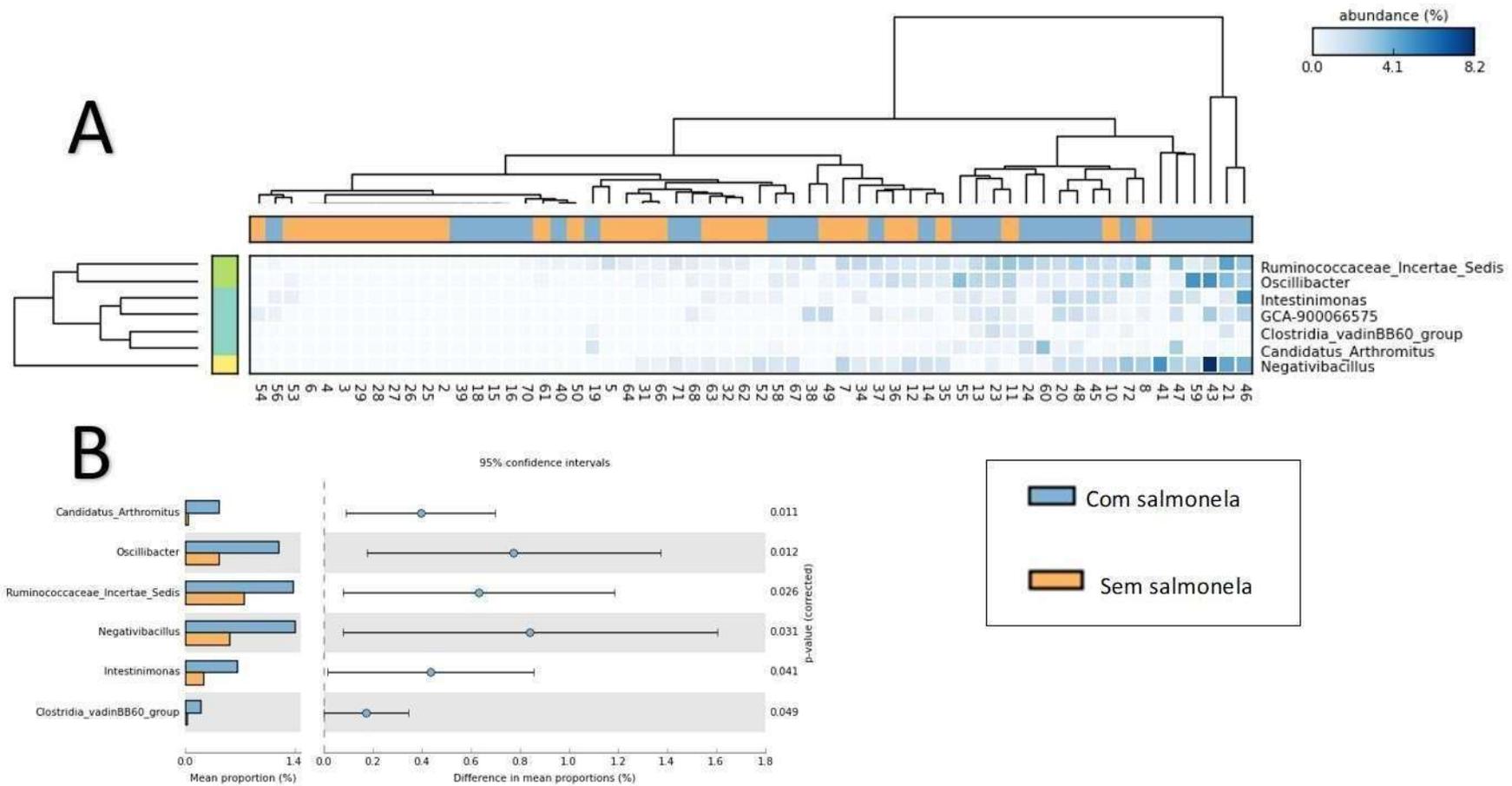


Figura 12 - Análise de múltiplos grupos. A) Comparação entre as abundâncias dos Gêneros que se diferenciaram estatisticamente ($p < 0.05$) por meio do gráfico Heatmap, utilizando análise de cluster, analisando os tratamentos de acordo com a inoculação ou não com Salmonella. B) Os gráficos apresentam a comparação da abundância dos gêneros que se diferenciaram estatisticamente ($p < 0.05$) quando comparamos a inoculação ou não com Salmonella.

4. Discussão

Analisamos o perfil da microbiota cecal em diferentes pontos de tempo após a inoculação com *S. Enteritidis* usando sequenciamento de 16S rRNA para elucidar a composição temporal da microbiota e a interação entre *S. Enteritidis* em diferentes genótipos de aves. Desenvolvimento, genética e inoculação com *S. Enteritidis* contribuíram para a diversidade domicrobioma cecal (Liu et al., 2018). A idade, a seção do trato gastrointestinal e a linhagem podem ter impacto significativo tanto na riqueza quanto na diversidade da microbiota (Shaufi et al., 2015; Han et al., 2016; Pandit et al., 2018; Zeng et al.; 2018; Richards et al. 2019).

No presente estudo, para todos os grupos experimentais, a riqueza da microbiota aumentou de 24 para 96 e 168 hpi a nível de gênero (Figura 2), comprovando os achados em outros trabalhos que indicam a maturação intestinal ao longo da idade das aves (Liu et al., 2018). O índice de Shannon demonstrou diferenças significativas dentro de cada tratamento (considerando todos os fatores). A literatura ainda é escassa quanto aos diferentes genótipos e o desenvolvimento das aves utilizadas pode contribuir para as diferentes descobertas nos pontos de tempo avaliados.

Segundo Yeoman et al. (2012), os filos mais abundantes na microbiota cecal são *Firmicutes*, *Bacteroides* e *Proteobacteria*. Maior abundância relativa do filo *Proteobacteria* em relação a *Firmicutes* foi vista as 24 hpi, tal fato pode ser explicado pelo fato da carga bacteriana da *Salmonella* Enteritidis pertencente a *Enterobacteriaceae* (Proteobactérias) estar em alta concentração no ceco das aves. *Firmicutes* foi mais abundante que *Proteobacteria* às 96 e 168 hpi, o que pode indicar maturação intestinal e maior habilidade para combater a Salmonela, que está incluída nesse filo. Esta hipótese pode estar relacionada a microrganismos pertencentes ao filo *Firmicutes*, que atuam como defesa contra patógenos (Liu et al., 2018).

A diversidade beta é uma medida de heterogeneidade das comunidades bacterianas das amostras. Distintas comunidades foram vistas em cada tratamento (Figura 4); a linhagem Label a 96 hpi (pontos rosas do gráfico) têm a comunidade bacteriana mais diversificada que a linhagem Cobb nos diversos períodos de inoculação. Este fato é comprovado também nas Figuras 5 e 6.

A análise diferencial não demonstrou diferenças significativas entre as linhagens, corroborando resultados anteriores de Richards et al. (2019) que não relataram diferenças significativas da composição da microbiota em aves de diferentes linhagens comerciais e consideraram que a semelhança é esperada pois as aves compartilharam o mesmo ambiente. Entretanto, o gênero *Lactobacillus* tem maior frequência na linhagem Label às 96 hpi,

independente da presença ou não de salmonella (Figura 9), o que pode explicar porque a linhagem Label reduz a contagem bacteriana mais rápido que a linhagem Cobb (Santos et al., 2018), já que *Lactobacillus* são bactérias probióticas importantes na promoção de saúde intestinal (Shaufi et al., 2015).

Matrizes leves e pesadas infectadas com *Salmonella* e *Mycoplasma* podem transmitir verticalmente estas espécies para sua progênie. Assim, a transmissão e a colonização para os embriões ocorrem antes mesmo da formação da casca, quando há o desenvolvimento do intestino dos embriões e em especial quando eles ingerem líquido amniótico, o que sugere que a microbiota benéfica também pode ser transmitida verticalmente para a progênie (Abád-Guaman et al., 2017). Tal proposição pode ser um fundamento para explicar as diferenças em composição microbiana de pintainhos entre as linhagens mesmo quando provenientes de um mesmo incubatório.

A análise diferencial comparando animais desafiados ou não com *Salmonella* revela 6 gêneros mais abundantes em aves desafiadas, dentre eles o *Ruminococcaceae_Incertae_Sedis*. As bactérias pertencentes a família *Ruminococcaceae* são produtoras de butirato (Maxwell et al., 2004), um ácido graxo volátil de cadeia curta responsável pela atenuação da infecção de *Salmonella* no ceco das aves (Van Immerseel et al., 2005), o que pode ser o responsável por conseguir reduzir a infecção nas aves inoculadas com *Salmonella* Enteritidis, já que esta apresenta maior abundância relativa dessa classe logo no primeiro dia após a inoculação.

5. Conclusão

A composição da microbiota do ceco em frangos de duas linhagens infectadas ou não aos 2 dias de idade com *S. Enteritidis* demonstrou diferenças significativa para as linhagens avaliadas, a presença ou não de *Salmonella* e ao longo do tempo após a inoculação com *Salmonella* ou caldo estéril. A diversidade alfa foi menor às 24 hpi. Aves Label Rouge possuem maior diversidade beta em relação a linhagem Cobb. O gênero *Lactobacillus* apresenta maior diversidade nas aves a 96 hpi e *Ruminococcaceae* está relacionada a animais inoculados com *Salmonella*.

Referências

- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poultry Science*, v. 83, n. 7, p. 1093–1098, 1 jul. 2004.
- APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poult Sci J.* (2004) 60:223–32. doi: 10.1079/WPS20040017
- BUCHON, N. et al. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & Development*, v. 23, n. 19, p. 2333–2344, 1 out. 2009.
- CHERBUY, C. et al. Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 299, p. G348-357, 2010.
- EL AIDY, S. et al. Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunology*, v. 5, n. 5, p. 567–579, set. 2012.
- GERRITSEN, J.; SMIDT, H.; RIJKERS, G. T.; DE VOS, W. M. Intestinal Microbiota in Human Health and Disease: The Impact of Probiotics. *Genes & Nutrition*, v. 6, n. 3, p. 209–240, ago. 2011.
- GIELDA, L. M.; DIRITA, V. J. Zinc Competition among the Intestinal Microbiota. *mBio*, v. 3, n. 4, e00171-12, 31 jul. 2012.
- HAN, G. G.; KIM, E. B.; LEE, J.; LEE, J.-Y.; JIN, G.; PARK, J.; HUH, C.-S.; KWON, I.-K.; KIL, D. Y.; CHOI, Y.-J.; KONG, C. Relationship between the Microbiota in Different Sections of the Gastrointestinal Tract, and the Body Weight of Broiler Chickens. *SpringerPlus*, v. 5, n. 1, p. 911, dez. 2016.
- HRDINA, J. et al. The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 20, n. 8, p. 638–648, ago. 2009.
- ICHIHASHI, T. et al. Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats. *Journal of Nutrition*, v.122, p. 506-512, 1992.
- KAU, A. L. et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, v. 474, n. 7351, p. 327–336, jun. 2011.
- LANGILLE, M. G. I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A.; CLEMENTE, J.C; BURKEPILE, D. E.; THURBER, R. L. V.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* v.31, p.814–821, 2013.
- LIU, L.; LIN, L.; ZHENG, L.; TANG, H.; FAN, X.; XUE, N.; LI, M.; LIU, M.; LI, X. Cecal microbiome profile altered by *Salmonella enterica*, serovar Enteritidis inoculation in chicken. *Gut Pahogens.*, v.10, article 34, 2018.
- LOZUPONE, C. e KNIGHT, R. Unifrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* v.71, p.8228-8235, 2005.
- MACARI, M.; LUNEDO, R; PEDROSO, A. A. Microbiota intestinal de aves. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Eds.). *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 2. ed. Jaboticabal: UNESP; FUNEP, 2002. p. 1-23.
- MAXWELL, F. J.; DUNCANB, S. H.; HOLDC, G.; STEWARTBI, C. S. Isolation, growth on prebiotics and probiotic potential of novel bifidobacteria from pigs. *Anaerobe*, 10 (1), pp. 33-39, 2004.

- MON, K. Z.; SAELAO, P.; HALSTEAD, M. M.; CHANTHAVIXAY, G.; CHANG, H.; GARAS, L.; MAGA, E. A.; ZHOU, H. *Salmonella enterica* serovars Enteritidis infection alters the indigenous microbiota diversity in young layer chicks. *Frontiers in veterinary science*, v. 2, p. 61, 2015.
- OAKLEY, B.B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H.; KIM, W.K.; MAURER, J.J.; PEDROSO A, et al. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett.* (2014) 10:100–12. doi: 10.1111/1574-6968.12608.
- PANDIT, R. J.; HINSU, A. T.; PATEL, N. V.; KORINGA, P. G.; JAKHESARA, S. J.; THAKKAR, J. R.; SHAH, T. M.; LIMON, G.; PSIFIDI, A.; GUITIAN, J.; HUME, D. A.; TOMLEY, F. M.; RANK, D. N.; RAMAN, M.; TIRUMURUGAAN, K. G.; BLAKE, D. P.; JOSHI, C. G. Microbial diversity and community composition of caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA amplicon sequencing. *Microbiome*, v.6, p.115, 2018.
- RICHARDS, P.; FOTHERGILL, J.; BERNARDEAU, M.; WIGLEY, P. Development of the caecal microbiota in three broiler breeds. *Frontiers in veterinary Science*, v. 6, p. 201, 2019.
- SALIU EM, VAHJEN W, ZENTEK J. Types and prevalence of extended spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. *Anim Health Res Ver.*, v.18, n.1, p.46-57. 2017. doi: 10.1017/S1466252317000020.
- SANTOS, M. R. B. Dinâmica de expressão de interleucinas no intestino de pintainhos de diferentes linhagens desafiados com *Salmonella* Enteritidis. 39p., 2018. (Dissertação de mestrado). Programa de pós graduação em zootecnia, Universidade Federal da Paraíba.
- SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* v.12, R60, 2011.
- SERGEANT, M. J. et al. Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, e91941, 2014.
- SHAUFI, M. A. M; SIEO, C. C.; CHONG, C. W.; GAN, H. M.; HO, Y. W. Deciphering Chicken gut microbial dynamics based on high- throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathogens*, v.7, article 4, 2015.
- THIBODEAU, A.; FRAVALO, P.; YERGEAU, E.; ARSENAULT, J.; LAHAYE, L.; LETELLIER, A. Chicken caecal microbiome modifications induced by *Campylobacter jejuni* colonization and by a non-antibiotic feed additive. *Plos one*, v.10, n. 7, e0131978, 2015.
- VAN IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; BOHEZ, L.; PASMANS, F. HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry, *Poultry Science*, v. 84, n. 12, p. 1851-1856, 2005.
- YEOMAN, C. J.; CHIA, N.; JERALDO, P, SIPOS, M,; GOLDENFELD, N. D.; WHITE, B. A. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev.* v.13(1), p. 89-99, 2012.
- ZENG, J. et al. Distribution of *Salmonella* Enteritidis in internal organs and variation of cecum microbiota in chicken after oral challenge. *Microbial Pathogenesis*, v. 122, p. 174–179, 2018.

CAPÍTULO II – Artigo II

Expressão gênica de mucina e transportadores intestinais de aves de diferentes linhagens submetidas a desafio oral por *Salmonella* Enteritidis

Expressão gênica de mucina e transportadores intestinais de aves de diferentes linhagens submetidas a desafio oral por *Salmonella* Enteritidis

Resumo

Objetivou-se avaliar a expressão de transportadores intestinais de nutrientes e a expressão da mucina em duas linhagens de frangos submetidos ou não ao desafio com *Salmonella* Enteritidis. Aos dois dias de idade, aves foram inoculadas no papo com caldo nutriente estéril ou cultura de *Salmonella* Enteritidis. Desta forma, determinou-se 4 tratamentos de 25 aves cada: frangos Cobb (grupo A) inoculados com SE, frangos Cobb controle (grupo B) inoculados com caldo nutriente estéril, frangos Label (grupo C) inoculados com SE, e frangos Label controle (grupo D) tratados com caldo nutriente estéril. Amostras de mucosa jejunal foram colhidas para extração de RNA e posteriormente avaliação do gene da mucina (*Muc2*), dos transportadores intestinais de glicose (*Sglt1*, *Glut2* e *Glut5*) e do transportador de aminoácidos (*Asct1*) e transportador de di-tripeptídeos (*PepT1*). Não houve nenhum efeito significativo no período de 24 hpi para os transportadores intestinais, entretanto a expressão foi regulada positivamente para *Muc2* em Label. Além disso houve interação desafio linhagem no período de 168 hpi para *Glut2*. As Linhagens apresentam diferentes mecanismos no transporte intestinal quando desafiadas com *S. Enteritidis*.

Palavras-chaves: aminoácidos, gene, glicose, patógenos, saúde intestinal.

Mucin gene expression and intestinal transporters of birds of different strains submitted to oral challenge by *Salmonella* Enteritidis

Abstract

The objective was to evaluate the expression of intestinal nutrient transporters and the expression of mucin in two strains of broilers submitted or not to the challenge with *Salmonella* Enteritidis. At two days of age, birds were inoculated into the crop with sterile nutrient broth or *Salmonella* Enteritidis culture. Thus, 4 treatments of 25 birds each were determined: Cobb chickens (group A) inoculated with SE, control Cobb chickens (group B) inoculated with sterile nutrient broth, Label chickens (group C) inoculated with SE, and control Label chickens (group D) treated with sterile nutrient broth. Jejunal mucosa samples were collected for RNA extraction and later evaluation of the mucin gene (*Muc2*), the intestinal glucose transporters (*Sglt1*, *Glut2* and *Glut5*) and the amino acid transporter (*Asct1*) and di-tripeptide transporter (*PepT1*). There was no significant effect at 24 hpi for intestinal transporters, however expression was upregulated for *Muc2* in Label. In addition, there was lineage challenge interaction in the period of 168 hpi for *Glut2*. The strains apparently have different mechanisms in intestinal transport when challenged with *S. Enteritidis*.

Keywords: amino acids, gene, glucose, intestinal health, pathogens.

1. Introdução

Bactérias adversas e patogênicas no trato gastrointestinal de galinhas, como *Salmonella* ssp, competem com o hospedeiro por nutrientes e podem danificar o epitélio intestinal, o que afeta adversamente a função de digestão e absorção intestinal (Gunal et al., 2006) e pode afetar o desempenho do hospedeiro. Aves comerciais são submetidas a intensos processos de melhoramento genético (Bayyari et al, 1997) que as tornam mais susceptíveis a doenças como problemas respiratórias e cardiovasculares (Crossley & Altimiras, 2012).

As diferentes linhagens de frangos de corte apresentam características fisiológicas e imunológicas específicas e que ainda não foram totalmente elucidadas. Porém, sabe-se que aves com intenso melhoramento genético perderam características como rusticidade e resistência a doenças, enquanto aves pouco melhoradas e com crescimento lento, como as de criações orgânicas ou alternativas, possuem elementos genéticos que as capacitam para melhor resistência a algumas enfermidades (Wigley, 2004). Aves da linhagem Label Rouge também conhecida como pescoço pelado se enquadram nas linhagens caipiras e que são utilizadas em sistema alternativos, apresentando peso médio de 2,8 kg e sendo abatidas em torno de 90 dias (Globoaves, 2015). Aves de linhagem comerciais, como as da linhagem Cobb500, possuem metabolismo acelerado para atender à maior biossíntese e deposição de carne; em contrapartida, a produção de calor é maior nestas aves (Quinteiro-Filho et al., 2010).

O intestino das aves é o principal local de absorção de nutrientes. A primeira camada da barreira intestinal é a camada de muco extrínseca composta por uma camada externa associada a bactérias e uma camada interna com altas concentrações de IgA secretora e mucina (Chen et al., 2015). Na borda em escova dos enterócitos intestinais, as proteínas são quebradas em di ou tripeptídeos e aminoácidos (Aas) individuais e estes produtos são transportados através dos enterócitos até o sangue por meio de transportadores de aminoácidos (AATs). No caso da digestão de carboidratos, monossacarídeos são transportados pelos enterócitos por meio de transportadores de açúcar específicos. Na membrana basolateral do enterócito, estão presentes vários AATs que podem transportar AAs de dentro do enterócito para o suprimento vascular ou vice-versa. (Miska e Fetterer, 2019). Dentre tantos outros transportadores relacionados a absorção de proteínas há o *PEPT1* (transportador de di- e tripeptídeos) que é dependente de sódio (Na^+) e o *ASCT1* (transportador de alanina, serina, cisteína e treonina), ambos se localizam membrana da borda em escova dos enterócitos (Bröer et al., 2008; Barri et al., 2011).

No processo de absorção de glicose se destacam os transportadores SGLT1 e GLUT2. O transportador de glicose 2 (GLUT2) é responsável pela transferência de frutose e glicose para os capilares do sangue portal, e o SGLT1 é o transportador de glicose dependente de sódio (Gilbert et al., 2007), e o GLUT5 é o transportador de frutose que fica localizado na superfície da borda em escova (Miska e Feterrer, 2019).

Apesar disso, ainda há uma variação nos parâmetros de desempenho, imunológicos, resistência a doenças, parâmetros intestinais, por exemplo, entre linhagens de crescimento lento e rápido ou entre linhagens selecionadas ou não para ganho de peso que necessitam de maior entendimento principalmente em linhagens como as nomeadas de “caipira. O trabalho apresentado teve por objetivo estudar a expressão gênica intestinal de mucina e transportadores de nutrientes em frangos de corte Cobb500 e Label Rouge desafiadas com *Salmonella* Enteritidis.

2. Materiais e métodos

Todas as práticas de manejo, bem como abate e procedimentos de amostragem da presente pesquisa, foram submetidas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (protocolo de nº 186/2015). O experimento foi conduzido no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), na cidade de Areia – PB.

2.1. Incubação dos ovos

Foram utilizados 200 ovos com peso médio semelhante, provenientes de matrizes da linhagem Cobb500® e Label Rouge®. Os ovos foram distribuídos em três incubadoras artificiais (IP130, incubadoras Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) com controle de temperatura e viragem automática. As incubadoras foram mantidas em condições normais de incubação, com temperatura de 37,7°C, umidade relativa de 60% e viragem a cada duas horas. No décimo primeiro dia de incubação (DE11), procedeu-se à ovoscopia com o objetivo de descartar os embriões mortos e ovos claros. Após a eclosão, 100 pintainhos foram utilizados no experimento. Todos foram testados através de swab cloacal e apresentaram cultivo negativo para *Salmonella*. Posteriormente as aves foram divididas em 4 (quatro) tratamentos,

em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), sendo eles: Cobb sem Salmonela, Cobb com Salmonela, Label sem salmonela e Label com salmonela. Cada tratamento era composto por 25 (vinte e cinco) repetições, totalizando cem (100) aves. As aves de cada linhagem foram alojadas separadamente caixas de madeira com acesso livre a água e ração, formulada para atender às exigências nutricionais para a fase inicial.

2.2.Instalações e dieta

Após a eclosão, os pintainhos foram pesados individualmente e o estado negativo de Salmonella Enteritidis foi confirmado por meio de análise microbiológica de swab cloacal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), formando assim quatro tratamentos e 25 repetições por tratamento, considerando cada ave uma repetição. Os tratamentos resultantes foram: linhagem Cobb500® sem desafio de Salmonella pós-eclosão (Cobb-SS); linhagem Cobb500® com desafio com Salmonella pós-eclosão (Cobb-CS); linhagem Label Rouge® sem desafio de Salmonella pós-eclosão (LR-SS); linhagem Label Rouge® com desafio com Salmonella pós-eclosão (LR-CS). Os animais foram alojados em caixas de madeira com tampas de nylon para evitar contaminação cruzada e contaminação do ambiente por meio de vetores, como moscas. As caixas foram equipadas com bebedouro e comedouro recomendados para fase inicial. Termohigrômetros digitais foram instalados no ambiente (Oregon Scientific, Portland, EUA) para aferições de temperatura e umidade relativa. A dieta experimental foi composta principalmente por farelo de milho e farelo de soja para a fase inicial (1-10 dias), seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011). A ração fornecida aos animais foi a mesma para todos os tratamentos, sendo composta de 22,20% de PB, 2.950 kcal/kg de energia metabolizável, 1,31% de lisina digestível, 0,94% de metionina + cistina digestível e 0,852% de treonina digestível.

2.3.Infecção experimental das aves

Aos dois dias de idade, as aves foram inoculadas no papo utilizando-se 0,5mL de caldo nutriente estéril ou cultura de Salmonella Enteritidis (SE, $1,6 \times 10^9$ UFC/mL) oriunda do laboratório e que possui resistência ao ácido nalidíxico. Amostras de mucosa jejunal foram colhidas nos diferentes momentos: 1 e 7 dias pós-inoculação (dpi), que correspondem a 3 e 9 dias de idade das aves, respectivamente. Foram colhidas e imersas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C .

2.4.Extração de RNA e expressão gênica

O RNA total foi extraído utilizando o kit Qiagen RNeasy® Mini (Cat. n.74104, Qiagen, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e pureza do material extraído foram avaliadas em espectrofotômetro de microvolume (Colibri), utilizando as relações de absorvância de 260/280 e 260/230 para atestar a qualidade do RNA extraído. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit cDNA AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. A expressão gênica relativa foi determinada através reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), utilizando o Brilliant III Ultra-fast SYBR QPC Master Mix Low (Agilent Technologies). Os ciclos da RT-PCR foram realizados no termociclador StratageneMx3005P (Agilent Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. As sequências dos genes da mucina, dos transportadores intestinais e dos genes de referência (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/GADPH e hidroximetilbilano sintase/HMBS) estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos primers utilizados na qPCR:

| Gene (Nome) ¹ | Iniciador Direto/ Reverso | Referência |
|--------------------------|---------------------------|----------------|
| <i>GADPH</i> F | GAAGCTTACTGGAATGGCTTTCC | NM_204305.1 |
| <i>GADPH</i> R | CGGCAGGTCAGGTCAACAA | NM_204305.1 |
| <i>HMBS</i> F | TGACCTGGTAGTTCACTCCTT | XM_021375845.1 |
| <i>HMBS</i> R | TTGCAAATAGCACCAATGGTAAAG | XM_021375845.1 |
| <i>GLUT2</i> F | CACACTATGGGCGCATGCT | Z22932 |
| <i>GLUT2</i> R | ATTGTCCCTGGAGGTGTTGGTG | Z22932 |
| <i>GLUT5</i> F | CTTCCTCTTGCGCGCTGGTAAG | XM_009967529 |
| <i>GLUT5</i> R | CATGTATGGGGCTGGAGACT | XM_009967529 |
| <i>SGLT1</i> F | GCCATGGCCAGGGCTTA | XM_415247 |
| <i>SGLT1</i> R | CAATAACCTGATCTGTGCACCAGTA | XM_415247 |
| <i>ASCT1</i> F | TTGGCCGGAAGGAGAAG | XM_001232899 |
| <i>ASCT1</i> R | AGACCATAGTTGCCTCATTGAATG | XM_001232899 |
| <i>PEPT1</i> F | CCGCTGAGGAGGATCACTGTT | KF_366603 |
| <i>PEPT1</i> R | CAAAGAGCAGCAGCAATGA | KF_366603 |
| <i>MUC2</i> F | ATGTTTTTGCATCCCATTGC | AJ487010.1 |
| <i>MUC2</i> R | TGCGGTGGATTGTCAGAATA | AJ487010.1 |

¹F: Direto; R: Reverso; *GADPH*: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *HMBS*: hidroximetilbilano sintase; *GLUT2*: transportador de glicose; *GLUT5*: transportador de frutose; *SGLT1*: transportador de glicose acoplado a sódio; *ASCT1*: transportador de aminoácidos alanina, serina, cisteína e treonina. *PEPT1*: transportador de di-tripeptídeos; *MUC2*: mucina.

2.5. Tratamento de dados e análise estatística

A expressão do mRNA dos genes do estudo foram avaliados em esquema fatorial 2 x 2, sendo 2 linhagens e 2 tipos de desafio (sem ou com *Salmonella*), considerando-se um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, em cada idade de colheita das amostras. A expressão relativa foi calculada com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrito por Pfaffl (2001), utilizando-se o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase como gene de referência. Médias diferentes foram analisadas pelo Teste t a 5%.

3. Resultados

A expressão de *PepT1* (Figura 2A), *Glut5* (Figura 2B), *Glut2* (Figura 3) e *Muc2* (Figura 4) foi alterada em animais não infectados ou em resposta à infecção por *Salmonella* Enteritidis (SE). Não houve interação entre os fatores para os genes de transportadores no período de 24 hpi (Figura 1) e no período de 168 hpi (Figura 2), exceto para *Glut2* (Figura 3), e, portanto, os resultados estão apresentados para os dois fatores principais, linhagem (Figura 2A) e infecção com SE (Figura 2B). Houve interação significativa entre os fatores no período de 168 hpi apenas para *Glut2* (Figura 3) e para o gene de mucina no período de 24 hpi (Figura 4).

A expressão de *Sglt1* e *Asct1* não foi alterada pela linhagem ou pelo desafio com SE em nenhum dos dois períodos (24 e 168 hpi) (Figura 1 e Figura 2). No segundo período de avaliação (168 hpi), a expressão do gene *PepT1* mostrou-se significativamente maior na linhagem Label quando comparada à expressão na linhagem Cobb (Figura 2^a) e a expressão do gene *Glut5* foi menor em animais inoculados com SE quando comparados aos animais controle (Figura 2B).

Para *Glut2* a 168 hpi (Figura 3) a expressão foi semelhante entre linhagens para aves não inoculadas com SE. Porém, quando inoculadas, a expressão de *Glut2* foi menor nas aves Cobb quando comparadas com aves Label. Observando-se a expressão de *Glut2* dentro de cada linhagem, esta diminuiu em aves Cobb após inoculação; ocorreu o oposto em aves Label, isto é, a expressão de *Glut2* aumentou em aves inoculadas quando comparadas com as aves não inoculadas.

Para o gene da mucina a 24 hpi (Figura 4), a expressão é maior em aves Label não inoculadas quando comparadas com as aves Cobb não inoculadas. Após inoculação, a expressão do gene de mucina é igual entre as duas linhagens. Dentro das linhagens, há aumento de

expressão do gene *Muc2* após inoculação em aves Cobb, mas não há diferença na expressão nas aves inoculadas e não inoculadas na linhagem Label. Conforme mencionado anteriormente, a expressão de *Muc2* às 168hpi não foi afetada pela linhagem ou pelo desafio com SE.

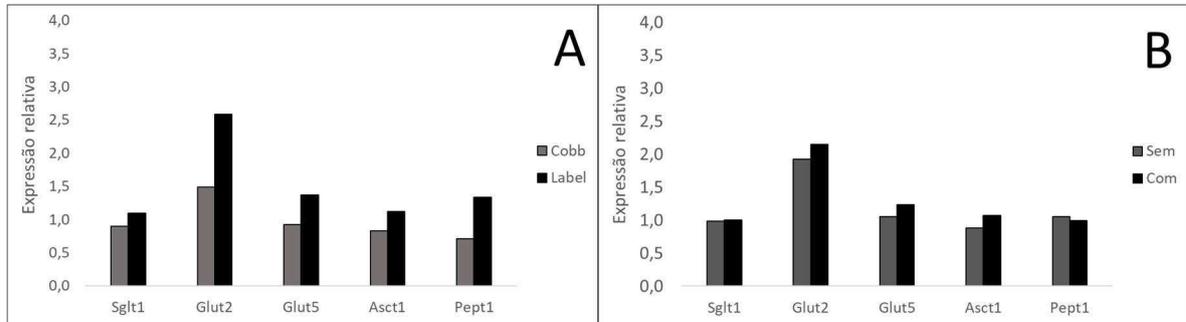


Figura 1. Expressão dos genes transportadores de glicose (*Sglt1* e *Glut2*), frutose (*Glut5*), aminoácidos (*Asct1*) e di e tripeptídeos (*PepT1*) no jejuno de aves 24 horas pós-infecção, considerando-se linhagens (A) e infecção com *Salmonella* Enteritidis (B). Não houve diferenças significativas para esses parâmetros.

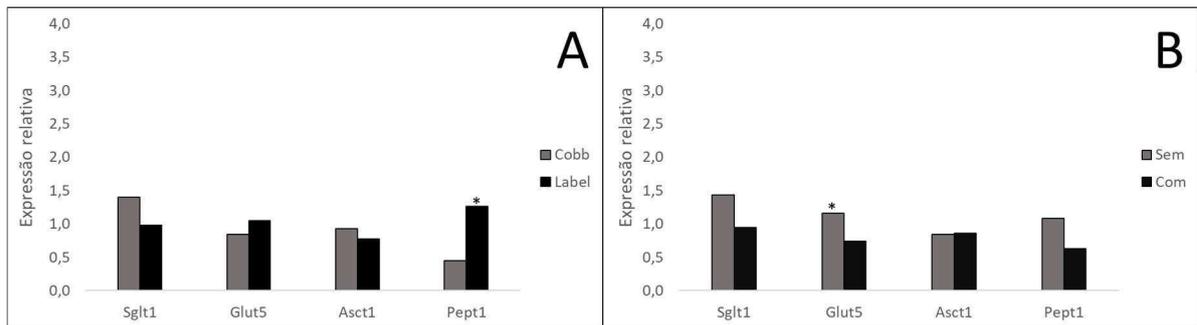


Figura 2. Expressão dos genes transportadores de glicose (*Sglt1*), frutose (*Glut5*), aminoácidos (*Asct1*) e di e tripeptídeos (*PepT1*) no jejuno de aves 168 horas pós-infecção, considerando-se linhagens (A) e infecção com *Salmonella* Enteritidis (B). O asterisco indica diferença estatística entre as duas linhagens (*PepT1*) ou entre infecção ou não com SE (*Glut5*).

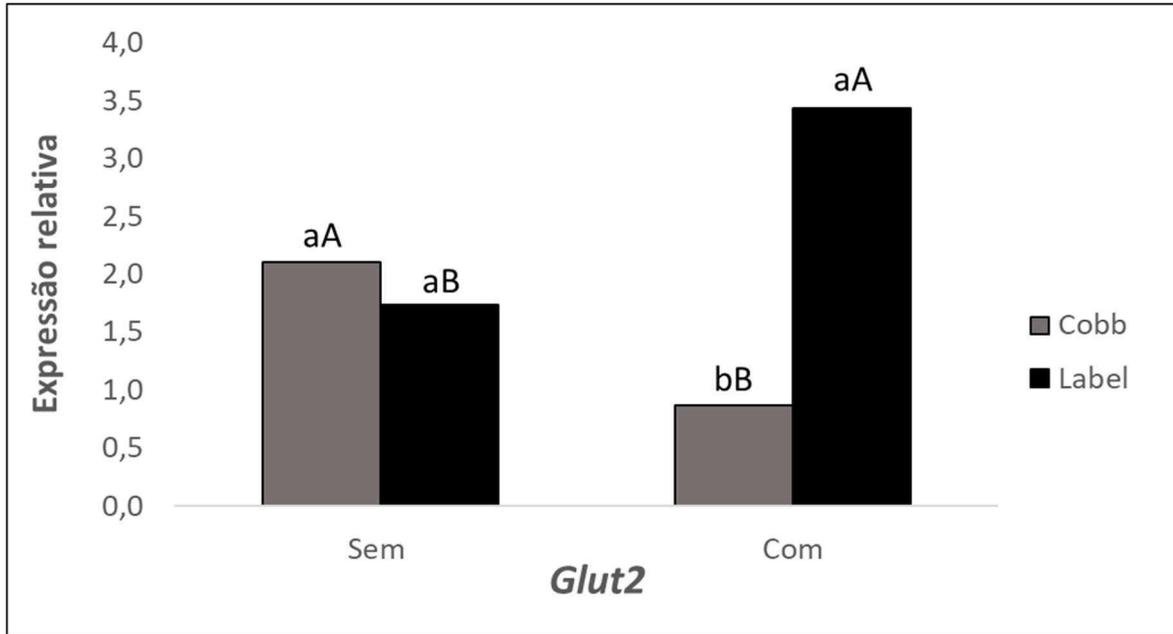


Figura 3. Expressão do gene transportador de glicose (*Glut2*) no jejuno de aves 168 horas pós infecção. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as linhagens Cobb e Label Rouge dentro de cada grupo de desafio; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre não infectadas e infectadas dentro de uma mesma linhagem.

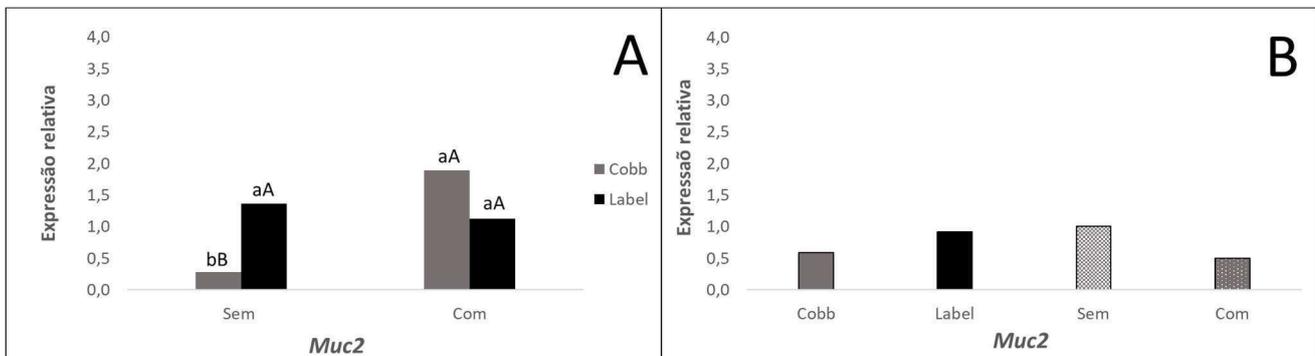


Figura 4. Expressão do gene da mucina (*Muc2*) no jejuno de aves 24 (A) e 168 horas pós infecção (B). Em 24 hpi (A), letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as linhagens Cobb e Label Rouge dentro de cada grupo de desafio; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre não infectadas e infectadas dentro de uma mesma linhagem. Não houve diferenças entre linhagens e infecção no período de 168 hpi (B).

4. Discussão

A mucina é um dos principais componentes da barreira química nas mucosas, desempenhando papel fundamental na prevenção de patógenos; no intestino delgado, também protege contra várias toxinas e atua na lubrificação da mucosa (Chang et al., 2020). O interesse crescente tem sido direcionado para as propriedades protetoras da mucina como barreira contra a fixação epitelial e os mecanismos pelos quais as bactérias podem utilizar essas glicoproteínas mucinas para facilitar a adesão e colonização (Deplancke e Gaskins, 2001; Robbe et al., 2003). Nosso trabalho mostrou que houve expressão significativamente maior do gene *Muc2* em animais Label não inoculados nas primeiras 24 horas pós desafio com *S. Enteritidis* quando comparadas aos animais Cobb, levando a inferir que os animais caipiras possuem elementos genéticos que respondem mais rápido ao desafio por patógenos, enquanto a expressão de Cobb só é aumentada de cerca de 5x pós a infecção (Figura 4). Relatos anteriores demonstraram houve redução da expressão de *Muc2* em aves Cobb 500 desafiadas com *Eimeria spp.* e *Clostridium perfringens* e especulou-se que à medida que a mucosa intestinal se deteriora, a expressão de *Muc2* diminui, evitando o reabastecimento da camada de muco e aumentando a chance de novas infecções (Forder et al., 2012). Essa contraposição de dados pode decorrer das diferentes idades das aves no momento da inoculação (1 dia de idade contra 9 dias de idade) ou o mecanismo de ação das diferentes espécies bacterianas sobre a camada de muco. *C. perfringens/Eimeria spp.* induzem a uma maior gravidade de enterite necrótica, resultando em descamação de células epiteliais e caliciformes, reduzindo a expressão *Muc2* e consequentemente aumentando as chances de novas infecções (Golder et al., 2011; Forder et al., 2012), o que ocorre semelhante com a linhagem Cobb desafiada por *S. Enteritidis* no presente trabalho.

Gilbert et al. (2007) comparou a expressão gênica de transportadores entre duas linhagens selecionadas em diferentes ambientes nutricionais, sendo que alguns são semelhantes genes avaliados no presente trabalho (*Glut2*, *Glut5*, *SglT1* e *PepT1*). Os autores relataram diferenças significativas apenas para o gene *PepT1* na linhagem que foi alimentada com percentual de 15 a 20% maior de aminoácidos, possivelmente correlacionado à possível maior capacidade dessa ave de assimilar aminoácidos na forma de di- e tripeptídeos. A linhagem Label, no presente estudo, apresentou maior expressão de mRNA de *PepT1* em 168 hpi, o que pode indicar, seguindo o raciocínio apresentado por Gilbert et al. (2007), que o genótipo caipira deve ter uma melhor capacidade de absorção de aminoácidos na forma de di-tripeptídeos, já que as rações eram similares para ambas as linhagens.

São escassos os trabalhos sobre expressão gênica de transportadores intestinais que incluam a comparação entre aves tipo caipira (ou especificamente aves Label Rouge) com outras linhagens. Por outro lado, há trabalhos sobre a expressão gênica de transportadores que utilizam aves da linhagem Cobb500 que avaliaram fatores nutricionais como a restrição alimentar em diferentes idades (Duarte et al., 2011), alimentação com excesso de chumbo (Ebrahimi et al., 2015), e a suplementação na dieta com ácidos orgânicos (Ruhnke et al., 2015). Nenhum destes autores relataram diferenças significativas para a expressão do gene do *Glut2*, entretanto encontramos diferenças significativas entre as linhagens e o desafio, sendo que a linhagem Label apresentou uma maior expressão desse gene em comparação a Cobb em animais inoculados, o que pode justificar a hipótese que a linhagem caipira possivelmente utiliza de maneiras diferenciadas no transporte de nutrientes. Em dados de trabalhos anteriores (dados não publicados) verificamos que a contagem de *S. Enteritidis* reduz na linhagem Label mais rapidamente que na linhagem Cobb, correlacionando esses dados com os dados de expressão do gene da mucina verificamos que a linhagem mais rústica utiliza de mecanismos que possivelmente estão interligados e permitem que sua resposta ao combate ao patógeno como pela maior produção da mucina e conseqüentemente uma maior expressão de genes correlacionados ao metabolismo dos nutrientes.

5. Conclusão

Ainda são escassos os trabalhos que comparação linhagens com diferentes desempenhos e que tenha como um segundo fator o desafio com patógenos. Apesar disso, podemos inferir que linhagens mais rústicas apresentam mecanismos que combatem mais rapidamente os patógenos e isso pode ser correlacionado a expressão aumentada de mRNA mucina e transportadores de nutrientes que podem ter correlação direta com as proteínas em questão.

Referências

- BARRI, A. et al. Effect of incubation temperature on nutrient transporters and small intestine morphology of broiler chickens. *Poultry Science*, v. 90, n. 1, p. 118–125, 1 jan. 2011.
- BAYYARI, G. R.; HUFF, W. E.; RATH, N. C.; BALOG, J. M.; NEWBERRY, L. A.; VILLINES, J. D.; SKEELES, J. K.; ANTHONY, N. B.; NESTOR, K. E. Effect of the genetic selection of turkeys for increased body weight and egg production on immune and physiological responses. *Poultry Science*, v. 76, n. 2, p. 289–296, 1997.
- BRÖER, S. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiological Reviews*, v. 88, n. 1, p. 249–286, jan. 2008.
- CHEN, J. et al. Identification of Potential Biomarkers for Gut Barrier Failure in Broiler Chickens. *Frontiers in veterinary science*, v. 2, p. 14, 2015.
- CHANG, C. H. et al. Effects of multi-strain probiotic supplementation on intestinal microbiota, tight junctions, and inflammation in young broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, v. 33, n. 11, p. 1797–1808, nov. 2020.
- CROSSLEY, D. A.; ALTIMIRAS, J. Effect of selection for commercially productive traits on the plasticity of cardiovascular regulation in chicken breeds during embryonic development. *Poultry Science*, v. 91, n. 10, p. 2628–2636, 2012.
- DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, n. 6, p. 1131S-1141S, 1 jun. 2001.
- DUARTE, C. R. A. et al. Messenger ribonucleic acid abundance of intestinal enzymes and transporters in feed-restricted and refeed chickens at different ages. *Poultry Science*, v. 90, n. 4, p. 863–868, 2011.
- EBRAHIMI, R. et al. Effect of Dietary Lead on Intestinal Nutrient Transporters mRNA Expression in Broiler Chickens. *Biomed Research International*, v. 2015, p. 149745, 2015.
- FDA. U.S. Broiler Performance. National chicken Council, 2021. Disponível em: <https://www.nationalchickencouncil.org/about-the-industry/statistics/u-s-broiler-performance/>
- FORDER, R. E. A. et al. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, v. 91, n. 6, p. 1335–1341, jun. 2012.
- GILBERT, E. R. et al. Developmental Regulation of Nutrient Transporter and Enzyme mRNA

- Abundance in the Small Intestine of Broilers. *Poultry Science*, v. 86, n. 8, p. 1739–1753, ago. 2007.
- GOLDER, H. M., M. S. GEIER, R. E. A. FORDER, P. I. HYND, AND R. J. HUGHES. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. *Br. Poult. Sci.* 52:500–506, 2011.
- GUNAL M, YAYLI G, KAYA O, KARAHAN N, SULAK O. The Effects of Antibiotic Growth Promoter, Probiotic or Organic Acid Supplementation on Performance, Intestinal Microflora and Tissue of Broilers. *International Journal of Poultry Science*, v. 5, n. 2, p. 149–155, 15 jan. 2006. doi: 10.3923/ijps.2006.149.155.
- MISKA, K. B.; FETTERER, R. H. Expression of amino acid and sugar transporters, aminopeptidase, and the di- and tri-peptide transporter PepT1; differences between modern fast growing broilers and broilers not selected for rapid growth. *Poultry Science*, v. 98, n. 5, p. 2272–2280, maio 2019.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.
- QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; SA, L. R. M.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. Heat Stress Impairs Performance Parameters, Induces Intestinal Injury, and Decreases Macrophage Activity in Broiler Chickens. *Poultry Science*, v. 89, n. 9, p. 1905–1914, 1 set. 2010.
- ROBBE, C. et al. Evidence of Regio-specific Glycosylation in Human Intestinal Mucins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 47, p. 46337–46348, nov. 2003.
- ROSTAGNO, H.S. ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 252p. 2011.
- RUHNKE, I. et al. Feed supplemented with organic acids does not affect starch digestibility, nor intestinal absorptive or secretory function in broiler chickens. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, v. 99 Suppl S1, p. 29–35, abr. 2015.
- WIGLEY, P. Genetic Resistance to Salmonella infection in domestic animals. *Research in Veterinary Science*, v. 76, n. 3, p. 165–169, jun. 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

A avicultura é uma área da produção animal que evolui constantemente aliado aos avanços em genética, nutrição e as tecnologias industriais. Tais fatos acarretam a necessidade de estudos no intuito de aprimorar e alavancar cada vez mais essa cadeia. É sabido que muito tem se aprofundado sobre a avicultura industrial e as criações intensivas e pouco tem se dado atenção as novas dinâmicas de criações impostas cada vez mais pelos consumidores e pela sociedade em geral que busca adquirir produtos com certificado de cumprimento de bem-estar animal.

Os resultados obtidos nesse estudo comprovam que há diferenças no perfil microbiano e na expressão dos nutrientes, bem como na mucina nas aves de dois genótipos diferentes quando estas são desafiadas ou não por patógenos, mais especificamente a *Salmonella* Enteritidis.

Desta forma, essa pesquisa serve como subsídio para pesquisas futuras avaliarem e buscarem mais informações sobre as diferentes linhagens que possam favorecer os novos modelos de criações de frangos, principalmente no que se diz respeito as condições de bem estar animal que estão sendo impostas pelos países estrangeiros e pela população está mais informada e mais atualizada com o advento da tecnologia. Além disso, auxiliará na compreensão de como em uma mesma espécie há diferenças na microbiota e como essa microbiota pode ser utilizada ou modulada para beneficiar outras linhagens.