



SONDAGEM DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM *WEISSELLA* *PARAMESENTEROIDES* WPK4 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE INF-GAMA NO INTESTINO DE FRANGOS DE CORTE

Raphael Steinberg da Silva ¹

¹ Orientador: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí; raphael.silva@ifmg.edu.br

RESUMO

O Brasil se encontra entre os maiores produtores e é o maior exportador mundial de carne de frango. Devido a pressões do mercado interno e externo, a restrição e proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (APC), que promovem um melhor desempenho produtivo, há uma urgente necessidade de se encontrar alternativas que possam substituir tais promotores, entre as quais pode-se citar os probióticos. Trabalhos prévios demonstram em ensaios in vivo (realizado no campus Bambuí) que a linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4, isolada de animais, apresenta evidências de serem benéficas no desempenho produtivo de frangos e, por isso, com efeito probiótico. Portanto, o presente projeto tem como objetivo comparar a expressão gênica relativa de INF-gama a partir de amostras de intestino de frangos suplementados com em *Weissella paramesenteroides* WpK4 com aquela observada em animais controles que receberam APC ou sem nenhuma suplementação. Serão extraídos RNA total de 54 amostras de intestinos de frango dos vários grupos experimentais, a serem usadas em ensaio de RT-qPCR para dosagem relativa da expressão do mRNA de INF-gama. Entretanto, devido à greve e atraso na liberação dos recursos de custeio previstos no edital 069/23 o projeto se encontra ainda inativo sem indicação de bolsista, por esse motivo o projeto ainda não tem resultados. Com esta pesquisa, espera-se complementar a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos nas respostas de desempenho dos frangos alimentados com este probiótico e publicação de um artigo científico, além de uma orientação PIBIC Jr e um TCC.

PALAVRAS CHAVES:

INTRODUÇÃO:

A avicultura mundial vem a cada ano se destacando na produção de proteína animal, obtendo melhores índices produtivos que colaboram com a redução do custo de produção e maior produtividade para a alimentação da população. Neste sentido, o Brasil vem se tornando o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango, com uma produção de 14.329 milhões de toneladas, das quais 4.610 milhões de toneladas foram comercializadas no mercado externo em 2021 (BRAZILIAN ASSOCIATION OF ANIMAL PROTEIN, 2022). Os fatores que contribuíram para a evolução da avicultura de corte e obtenção de índices produtivos recordes estão relacionados



principalmente com o melhoramento genético dos animais, pesquisas em nutrição para atender as exigências nutricionais destes animais melhorados, melhorias no manejo e ambiência das instalações para as aves e, também à implantação de um programa de biossegurança e práticas que levam a uma melhor sanidade destes animais, garantindo a produção de proteína animal de alta qualidade em ciclos de produção de 42 dias do nascimento ao abate.

A tendência atual é que o setor avícola global continue a crescer à medida que a demanda por carne e ovos seja impulsionada pelo crescimento da população, aumento da renda e intensificação da urbanização. Portanto, atualmente os desafios que o setor está enfrentando estão relacionados à produção de alimentos com segurança e qualidade nutricional, aos desafios sociais (redução da pobreza e equidade), aos impactos sobre a saúde e bem-estar (animal e humana) e aos impactos sobre o meio ambiente (consumo de recursos naturais e geração de mudanças climáticas) (MOTTET & TEMPIO, 2017).

A avicultura de corte gera proteína animal de alto valor nutricional com um ciclo de produção rápido. No Brasil, onde uma granja bem-organizada, com programação correta das atividades, permite ao produtor criar mais de 6 lotes de frangos de corte por galpão em um ano. Este número de lotes criados depende da idade de abate dos frangos e do período de vazio sanitário entre os lotes (MACARI et al., 2014). A densidade de criação (aves/m² de galpão) varia muito de uma granja para outra em função do clima, da época do ano, tipo de instalação e nível tecnológico para melhoria da ambiência, idade e peso das aves ao abate (MACARI et al., 2014). Portanto, para atingir um ciclo eficiente de produção aliado a uma otimização da densidade, a eficiência na conversão alimentar e frangos de alta performance são fatores centrais para uma produção de sucesso. Esta alta densidade de criação se torna um desafio sanitário maior para a obtenção de bons índices zootécnicos e rentabilidade da produção.

Os antibióticos promotores de crescimento (APC) são comumente utilizados na avicultura em doses subterapêuticas na dieta destes animais e ao longo da evolução da avicultura, contribuindo muito com melhoria do ganho de peso e conversão alimentar das aves além de gerar redução na mortalidade (SANTOS et al., 2005). Porém, diante da emergência de linhagens de bactérias multirresistentes à antimicrobianos e, do risco de veiculação deste tipo de microrganismos através de alimentos de origem animal na dieta humana, o uso de APCs na avicultura vem sendo limitado. A União Europeia em 2006 proibiu o uso de APC na criação de animais para alimentação humana e a partir de então outros países em todo o mundo seguiram a mesma tendência de limitar o uso de antibióticos na produção animal.

Por este motivo, hoje há uma grande demanda para a busca e avaliação dos efeitos de novos aditivos alimentares sobre o desempenho produtivo de frangos. Na avaliação de suplementos alimentares em frangos considera-se um bom suplemento aquele que apresenta resultados que sejam iguais ou superiores aos apresentados pelos animais que receberam APC na dieta. Entre as alternativas que vem sendo estudadas, a suplementação nutricional com probióticos vem sendo descrita como produtora de benefícios à saúde dos animais e de melhora na performance de crescimento de frangos em condições de produção (WU et al., 2019). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do



hospedeiro. De forma geral, as Bactérias do ácido lático vem sendo descritas apresentando efeito probiótico em vários modelos animais de investigação.

No ano de 2021, um experimento com frangos de corte foi conduzidos no IFMG - campus Bambuí, e demonstrou a eficiência de uma linhagem potencialmente probiótica de *Weissella paramesenteroides* WpK4 (dados a serem publicados e projeto ainda em andamento aprovado no edital 015/2021 e registro de aprovação na CEUA n.01/2021). No experimento, nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos da suplementação da linhagem probiótica em comparação a grupos de animais que receberam suplementação com APC (bacitracina de zinco) e outro sem nenhum aditivo alimentar. Nossos dados apontam que a suplementação com *Weissella paramesenteroides* WpK4 proporcionou melhor conversão alimentar (kg ração/kg de peso vivo), isto indica um menor consumo de ração com concomitante melhor conversão em peso no dia do abate, em relação as aves que receberam ração com e sem APC. Entretanto, o ganho de peso de animais suplementados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 foi semelhante ao ganho de peso de animais que não receberam nenhuma suplementação em sua dieta. Esse resultado sugere que este probiótico tem efeitos sobre a regulação do apetite das aves e em uma melhor taxa de digestão e absorção de nutrientes no intestino, produzindo melhor conversão alimentar, o que se traduz em maior produtividade e maior eficiência em conversão de nutrientes em peso ao abate. Ao final do experimento, foi coletado uma porção do duodeno do frango que tinha peso vivo no dia do abate mais próximo ao peso médio dos animais da parcela, totalizando a coleta de 18 amostras de intestino em cada tratamento e 54 amostras de intestino no total, que foram armazenadas em RNA later a – 20°C.

Compreender a influência de tratamentos alternativos sobre o estado inflamatório e a saúde do trato gastrointestinal pode explicar a eficácia e os benefícios observados na suplementação de frangos com *Weissella paramesenteroides* WpK4. Além disso, não foi realizado ainda estudo avaliando o efeito da suplementação desta linhagem probiótica sobre a expressão gênica de INF-gama no intestino de frangos criados em condições de produção comercial, que pode ser facilmente avaliado por RT-qPCR com base nas amostras de intestino armazenadas me RNAlater disponíveis. Uma melhor compreensão do papel de *Weissella paramesenteroides* WpK4 na imunidade intestinal permitirá uma evolução na disponibilização aos produtores de novos suplementos para controlar doenças entéricas na avicultura de corte, baseado no conhecimento de como esses tratamentos alternativos usando probióticos diferem dos tratamentos convencionais baseados no uso de APCs. Este projeto compõe uma das ações do Grupo de Pesquisa “Produção, nutrição e alimentação de não ruminantes” do IFMG- campus Bambuí.

METODOLOGIA:

O experimento proposto neste projeto é uma continuação do executado no projeto intitulado “Prospecção dos efeitos benéficos da linhagem probiótica *Weissella paramesenteroides* WpK4 na produção em escala comercial de frangos de corte” aprovado pelo edital 015/21 e concluído em 2023. O experimento com animais foi realizado no galpão experimental para frangos de corte do IFMG – campus Bambuí. Os procedimentos para sua execução foram aprovados pela CEUA/IFMG sob protocolo de número 01/2021. Foram utilizados 270 pintos de corte de 1 dia, machos, da linhagem ROSS 308 AP, vacinados contra Marek. As aves foram vacinadas aos 21 dias contra Newcastle e



Gumboro, por via oral através da água de bebida. As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos, 90 em cada um. Os tratamentos experimentais aplicados a partir do primeiro dia de idade são descritos abaixo:

Tratamento 1: Dieta controle negativo (sem adição de probiótico e de promotor de crescimento a base de antibiótico);

Tratamento 2: Dieta controle positivo (com adição de Bacitracina de Zinco como promotor de crescimento, de acordo com informações do fabricante);

Tratamento 3: Dieta com suplementação de *W. paramesenteroides* WpK4 (com adição de *W. paramesenteroides* WpK4 liofilizado em uma concentração de 10^6 UFC/g de ração farelada);

As rações foram formuladas a base de fubá de milho e farelo de soja para atender à exigência do animal, de acordo com as recomendações nutricionais de Rostagno et al., (2017). Foi selecionada 18 aves por tratamento aos 42 dias de idade, totalizando 54 aves, as quais foram pesadas e abatidas.. Após depenadas, as aves foram evisceradas manualmente seguindo os procedimentos padrão do abatedouro. As aves foram abertas e o intestino delgado removido e limpo assepticamente. Uma porção de 500 µg do duodeno foi coletada e armazenada em microtubos contendo 500 µL de RNA later e armazenadas em freezer -80 °C no Laboratório de Pesquisa Multiusuário até o momento da extração de RNA total.

As 54 amostras de intestinos para a realização desta pesquisa foram provenientes do projeto de pesquisas aprovado no Edital 15/2021 e registrados no IFMG, sendo ele: “Prospecção dos efeitos benéficos da linhagem probiótica *Weissella paramesenteroides* WpK4 na produção em escala comercial de frangos de corte” sob coordenação do professor Raphael Steinberg da Silva e co-orientação do professor Adriano Geraldo. O projeto foi aprovado na CEUA – IFMG no protocolo 01/2021 e contemplava as coletas de tecidos intestinais e para futuras análises, caso fosse obtidos recursos para sua realização.

Aproximadamente 500 µg de duodeno foi coletada no abate dos frangos e foi armazenado em RNA later (LGC) e estocado em freezer -80°C até o momento da extração de RNA. O RNA total será extraído usando o reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total extraído de todas as amostras de intestino será quantificado em Nanodrop 2000 espectrofotometro (Thermo Fisher), além de ter seu grau de qualidade avaliado pelas relações A260/A280 e A260/A230, que avaliam o grau de contaminação com proteína e sais e solventes orgânicos, respectivamente. A integridade de cada amostra de RNA total será avaliada através de sua eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. Serão utilizadas amostras que apresentarem quantificação acima de 200 µg/mL de RNA, relação de A260/A280 entre 1,7-2,1 e uma relação geral de 2x de intensidade da banda do rRNA 28s em relação a banda do rRNA 18s sem arraste nos géis de eletroforese.

Um total de 10 µg de RNA total obtido de amostra de duodeno será submetido à remoção de DNA genômico usando o kit Turbo DNase I (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total tratado será usado em reações de *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) para produção de cDNA usando o kit High Capacity (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Será utilizado 1µg



de RNA para cada reação de RT-PCR. O RNA total e o cDNA serão armazenados a -20°C até o momento de sua utilização

Para as reações de quantificação em tempo real por RT-qPCR do gene alvo INF-gama e dos genes normalizadores GAPDH β -actina serão usados programas de ciclagem universal contendo um passo inicial de 50° C por 2'; 95° C por 10' seguido por 40 ciclos, cada um contendo um passo de 95° C por 15'' e outro de 60° C por 1'. Após a reação de amplificação a curva de dissociação será obtida através das etapas de aquecimento, resfriamento e aquecimento sucessivas (95° C por 15'', 60° C por 15'' e 95° C por 15''). Para as reações de qPCR será utilizado Master Mix SYBR Green (ThermoFisher), placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate fechadas com selante MicroAmp® Optical Adhesive Film (Life Technologies). Como iniciadores serão usados os seguintes oligonucleotídeos: para INF-gama Forward 5'AGC TGA CGG TGG ACC TAT TAT T 3' e Reverse 5' GGC TTT GCG CTG GAT TC 3', para GAPDH Forward 5'GAG GGT AGT GAA GGC TGC TG3' e Reverse 5'CAT CAA AGG TGG AGG AAT GG3', e para β -actina Forward 5'ATG TGG ATC AGC AAG CAG GAG TA3' e Reverse 5'TTT ATG CGC ATT TAT GGG TTT TGT3'.

Para quantificação relativa da expressão gênica da citocina INF-gama em amostras de cDNA oriundas de RNA total obtido de tecido intestinal será realizada amplificação do cDNA por RT-qPCR. Serão utilizadas as condições de reação padronizadas com eficiência entre 90-110%. Para normalização dos dados de expressão, serão usados os resultados das amplificações do cDNA codificado pelos genes GAPDH e β -actin. Para obtenção dos dados de nível relativo de expressão (NRE), será empregado o método derivado do RQ (relative quantification) = $2^{\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), descrito por Hellemans et al., (2007) usando a equação (1):

$$NRE_x = \frac{[E_x]^{\Delta Cq_x(Cq_x \text{ calibrador} - Cq_x \text{ amostra teste})}}{\sqrt[n]{\prod [E_{ref}]^{\Delta Cq_{ref}(Cq_{ref} \text{ calibrador} - Cq_{ref} \text{ amostra teste})}}} \quad (\text{Equação 1})$$

Será usado como calibrador os dados de expressão do grupo controle sem nenhuma suplementação. Os resultados serão expressos graficamente usando média e desvio-padrão dos valores do nível relativo de mRNA de INF-gama/ normalizado pelo fator de normalização, este último dado pela média geométrica das quantidades relativas de mRNA de GAPDH e β -actin, para cada grupo experimental. Para a produção dos gráficos e análise estatística dos dados obtidos será utilizado o software GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software Inc.). Os valores obtidos serão avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade das distribuições. Serão obtidos as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação para cada conjunto de dados. Em seguida, será realizado o teste one-way ANOVA para cada conjunto de dados, para verificar se existirão diferença entre as variâncias, e o pós-teste de Tukey, de múltiplas comparações, para verificar quais médias serão significativamente diferentes ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:



Diante da ocorrência da greve de servidores federais em educação em 2024 o início da execução do projeto foi comprometido, uma vez que a execução necessita do trabalho presencial do coordenador e técnica de laboratório, bem como presença de alunos bolsistas e voluntários, que devido à suspensão do calendário acadêmico em 29 de abril de 2024 até 08 de julho de 2024 não estavam indo ao campus. Somado a este fato, atrasos na liberação dos recursos de custeio, essenciais para a execução do processamento das amostras de intestino, produção do cDNA e execução das reações de RT-qPCR propostas, impediram até o momento que os insumos necessários chegassem até as instalações do Laboratório de Pesquisa Multiusuário do IFMG-campus Bambuí, impedindo, até o presente momento, que o projeto pudesse ser reativado e executado. Por esse motivo, inclusive, ainda não houve indicação de aluno bolsista para executar a proposta. Portanto, não foram gerados resultados neste trabalho.

CONCLUSÕES:

Com a retomada do projeto nos próximos meses, uma vez que os recursos para aquisição de material de consumo foram finalmente liberados e a modalidade de compra pelo cartão BB Pesquisa consolidada, esperamos comprar os reagentes necessários para a execução de todas as etapas do projeto. Além dos resultados da dosagem do INF-gama entre os 3 grupos experimentais, que podem esclarecer os possíveis efeitos do tratamento com *Weissella paramesenteroides* WpK4 sobre os índices zootécnicos previamente avaliados em campo, esperamos contribuir para a formação de recursos humanos capacitados nas metodologias envolvidas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS:

BRAZILIAN ASSOCIATION OF ANIMAL PROTEIN (2022) Annual report of the Brazilian Association of Animal Protein. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-1.pdf>>. Acessado em 23 Maio 2022

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. D.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, v. 8, R19, p. 1-14, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.

MACARI, M.; MENDES, A. A.; MENTEN, J. F. M.; NÄÄS, I. A. Produção de Frangos de Corte. *FACTA*, 2ª Ed., 565 p., 2014.



MOTTET, A. & TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science Journal*, v. 73:2, p. 245-256, 2017.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M I.; et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos. ED. ROSTAGNO, H.S. Viçosa: UFV, 252p., 2017.

SANTOS, E. C.; TEIXEIRA, A. S.; FREITAS, R. T. F.; RODRIGUES, P. B.; DIAS, E. S.; MURGAS, D. S. Uso de aditivos promotores de crescimento sobre o desempenho, características de carcaça e bactérias totais do intestino de frangos de corte. *Ciência e Agrotecnologia*, v.29(1), p.223-231, 2005.

WU Y, WANG B, ZENG Z, LIU R, TANG L, GONG L et al. Effects of probiotics *Lactobacillus plantarum* 16 and *Paenibacillus polymyxa* 10 on intestinal barrier function, antioxidative capacity, apoptosis, immune response, and biochemical parameters in broilers. *Poult Sci* 98:5028–5039. <https://doi.org/10.3382/ps/pez2266>. Amerah AM, R. 2019