

## Investigação do efeito da suplementação com *Weissella paramesenteroides* WpK4 sobre a expressão gênica de IL8 no intestino de frangos de corte

Lucas Santos Oliveira<sup>(1)</sup>, Adriano Geraldo<sup>(2)</sup>, Raphael Steinberg da Silva<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Aluno de Iniciação Científica Junior do curso técnico integrado ao Ensino Médio em Biotecnologia

- Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG) - Campus Bambuí

<sup>(2)</sup> Professor colaborador – IFMG – Campus Bambuí

<sup>(3)</sup> Professor orientador - IFMG - Campus Bambuí

### 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), há uma urgente necessidade de se encontrar alternativas que possam substituir tais promotores. Trabalhos prévios demonstram em frangos que a linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4, isolada de animais, apresenta evidência de ser benéfica no desempenho produtivo de frangos e, por isso, com efeito probiótico. Portanto, o presente trabalho tinha como objetivo comparar a expressão gênica relativa de IL8, a partir de amostras de intestino de frangos suplementados com *W. paramesenteroides* WpK4 com aquela observada em animais controles que receberam APC ou nenhuma suplementação. Foram extraídos RNA total de 54 amostras de intestinos, a serem usadas em ensaio de RT-qPCR para dosagem da expressão de IL8. Devido à problemas de padronização, não foi possível amplificar por RT-qPCR o mRNA do gene IL8. Por esse motivo, dosamos outros marcadores relacionados à resposta imune intestinal (AVBD9), controle de apetite (Colecistoquinina) e permeabilidade intestinal (Zonulina). Animais que receberam APC apresentaram maior expressão gênica ( $p < 0,05$ ) de Zonulina e AVBD9, em comparação aos que foram suplementados com WpK4 e aqueles que não receberam suplementação. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão de Colecistoquinina entre os grupos experimentais, mesmo que uma tendência de redução da expressão deste marcador tenha sido observada no grupo suplementado com WpK4. Esses dados contribuem para elucidar os possíveis mecanismos moleculares que explicam os efeitos probióticos atribuídos à suplementação com WpK4 em frangos.

**Palavras-chave:** Probióticos. AVBD9. Zonulina. *Weissella*.



## 1 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). A avicultura de corte gera proteína animal de alto valor nutricional com um ciclo de produção rápido. 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. 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 conduzido no IFMG - *campus* Bambuí, e demonstrou a eficiência da linhagem potencialmente probiótica *Weissella paramesenteroides* WpK4 (dados a serem publicados de projeto concluído aprovado no edital 015/2021 e com 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 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 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. Ao final do experimento, foi coletado uma porção do duodeno de 18 frangos submetidos a cada tratamento experimental, totalizando 54 amostras de intestino, 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 WpK4. Além disso, não foi realizado ainda estudo avaliando o efeito da suplementação desta linhagem probiótica sobre a expressão gênica de IL8 e outros marcadores moleculares no intestino de frangos criados em condições de produção comercial, que pode ser facilmente avaliada por RT-qPCR com base nas amostras de intestino armazenadas me RNA *later* disponíveis. Portanto, o objetivo inicial deste trabalho era de avaliar e comparar a expressão gênica de IL8 entre os diferentes grupos experimentais que receberam suplementação com WpK4 ou APC ou nenhuma suplementação. Uma melhor compreensão do papel de 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.

## 2 DESENVOLVIMENTO

O experimento descrito neste trabalho 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.

### 2.1 Origem, obtenção, propagação e liofilização da linhagem de *W. paramesenteroides* WpK4

A linhagem potencialmente probiótica que foi utilizada na pesquisa faz parte da coleção taxonômica do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) sob curadoria da Profa. Dra. Elisabeth Neumann. A linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 foi isolada e identificada a partir de amostras de fezes de leitões que não haviam recebido suplementação com antibióticos nos últimos 30 dias pré-coleta (ALVIM et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020).

Em avaliações prévias, foi observado que para *W. paramesenteroides* WpK4 foi obtido um rendimento de  $10^{10}$  UFC/g de liofilizado. As amostras liofilizadas do probiótico foram divididas e armazenadas sob refrigeração a 5 °C por 60 dias para seu uso na suplementação de frangos de corte. O processo de liofilização foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM – ICB – UFMG).

A viabilidade do liofilizado foi avaliada em intervalos de 4 dias ao longo do experimento de suplementação nutricional através da sua ressuspensão e diluição seriada em salina esterilizada 0,85%, seguida do plaqueamento de diluições em placas de ágar MRS pela técnica de *spread plate*. As placas foram incubadas a 37°C por 48h em aerobiose e o crescimento bacteriano expresso em UFC/g de liofilizado. Ao longo de todo o experimento de suplementação foi verificada a manutenção da viabilidade da linhagem probiótica nas condições de armazenamento e oferecimento de ração do aviário experimental.

### 2.2 Desenho experimental da suplementação com *W. paramesenteroides* WpK4 de frangos de corte

O experimento 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.

O galpão experimental é composto por 48 boxes divididos em duas linhas laterais com 24 boxes em cada linha, com área individual por parcela de 2,2 m<sup>2</sup>. Este galpão é equipado com sistema de cortinas externas nas laterais com acionamento mecânico tipo catracas, ventiladores e sistema de nebulização para controle de temperatura e umidade interna; sistema de aquecimento em lâmpadas de infravermelho de 250 W de potência, instaladas individualmente em cada boxe experimental e sistema de iluminação central com acendimento automático através de um *timer*. O fornecimento de água para as aves nos boxes foi via bebedouro pendular e a ração farelada fornecida em comedouros tubulares. Antes do início do experimento, o galpão e os equipamentos foram lavados e higienizados. A cama a ser utilizada em cada box foi composta de casca de arroz triturada tratada, sendo a mesma reutilizada na criação de dois lotes anteriores de frango, para aumentar o desafio experimental. Antes de reutilizar a cama, a mesma passou por um processo de fermentação para a redução da carga microbiológica. Durante todo o período experimental as aves receberam ração a vontade, de acordo com cada grupo experimental.

Os tratamentos experimentais aplicados a partir do primeiro dia de idade são descritos abaixo:

Tratamento 1 *n*=90 frangos (CONTROLE): Dieta controle negativo (sem adição de probiótico e de promotor de crescimento a base de antibiótico);

Tratamento 2 *n*=90 frangos (ANTIBIÓTICO): Dieta controle positivo (com adição de Bacitracina de Zinco como promotor de crescimento, de acordo com informações do fabricante);

Tratamento 3 *n*=90 frangos (WpK4): Dieta com suplementação de *W. paramesenteroides* WpK4 (com adição de WpK4 liofilizado em uma concentração de 10<sup>6</sup> 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). O promotor de crescimento controle positivo a ser utilizado foi a Bacitracina de Zinco (300g/tonelada de ração) e não foi utilizado anticoccidianos nas rações experimentais. O núcleo usado nas rações foi isento de antibióticos promotores de crescimento e anticoccidianos. As rações foram preparadas em misturador vertical. O experimento foi finalizado após 42 dias de idade dos frangos com o sacrifício e coleta de amostras. Foram selecionadas 18 aves por tratamento com o peso médio próximo a média do tratamento aos 42 dias de idade, totalizando 54 aves, as quais foram pesadas e abatidas após período de 8 horas de jejum no 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.

### **2.3 Extração de RNA total de amostras de intestino**

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 foi extraído usando o reagente TRIzol (Ludwig) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total extraído de todas as amostras de intestino foi 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 foi avaliada através de sua eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

### **2.4 Produção de cDNA usando reação de RT-PCR**

Um total de 5 µg de RNA total foi submetido à remoção de DNA genômico usando o kit DNase I RNase free (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Um total de 5µg de RNA tratado foi usado em reações de *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) para produção de cDNA usando o kit

cDNA Synthesis Kit with RNase (Cellco Biotec do Brasil, São Carlos, SP - Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

## 2.5 Padronização das reações de qPCR para os genes IL8, AVBD9, Zonulina, Colecistoquinina e $\beta$ -actina

Para padronização das reações de amplificação dos genes IL8, AVBD9, Zonulina, Colecistoquinina e  $\beta$ -actina foram feitas curvas de diluição seriada de cDNA utilizando pontos contendo 50 ng; 5 ng; 0,5 ng, 0,05 ng e 0,005 ng de cDNA. Nas reações de padronização foi utilizada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total do duodeno dos diferentes grupos experimentais adicionadas em igual proporção. Essas curvas de diluição foram feitas para cada um dos genes. Os padrões para avaliação da qualidade das reações foram a eficiência de amplificação e o perfil da curva de dissociação. A especificidade das reações será avaliada através da curva de dissociação. Foram padronizadas condições, para cada um dos genes analisados, com eficiência entre 90-110% e com um único pico nas curvas de dissociação. Em todas as reações de amplificação foram 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 foi 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 foi utilizado QPCR SYBRMASTER -I- ROX (Cellco Biotec do Brasi), placas PCR MULTIPLY 96 poços fechadas com selante Selo de vedação para microplacas (Sarstedt, Nümbrecht, Renânia, Alemanha). Como iniciadores que foram usados tem suas sequências descritas na TABELA 1.

TABELA 1 – Sequência dos iniciadores usados nas reações de qPCR

| Gene             | Primer F (5'-3')        | Primer R (5'-3')         |
|------------------|-------------------------|--------------------------|
| $\beta$ -actina  | ATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA | TTTATGCGCATTTATGGGTTTTGT |
| Colecistoquinina | CAGCAGAGCCTGACAGAACC    | AGAGAACCTCCCAGTGGAACC    |
| Zonulina         | CTTCAGGTGTTTCTCTCCTCCTC | CTGTGGTTTCATGGCTGGATC    |
| IL8              | CACGTTTCAGCGATTGAACTC   | GACTTCCACATTCTTGCAGTG    |
| AVBD9            | CAAAGGCTATTCCACAGCAG    | GCATTTTCAGCTTCCCACCAC    |

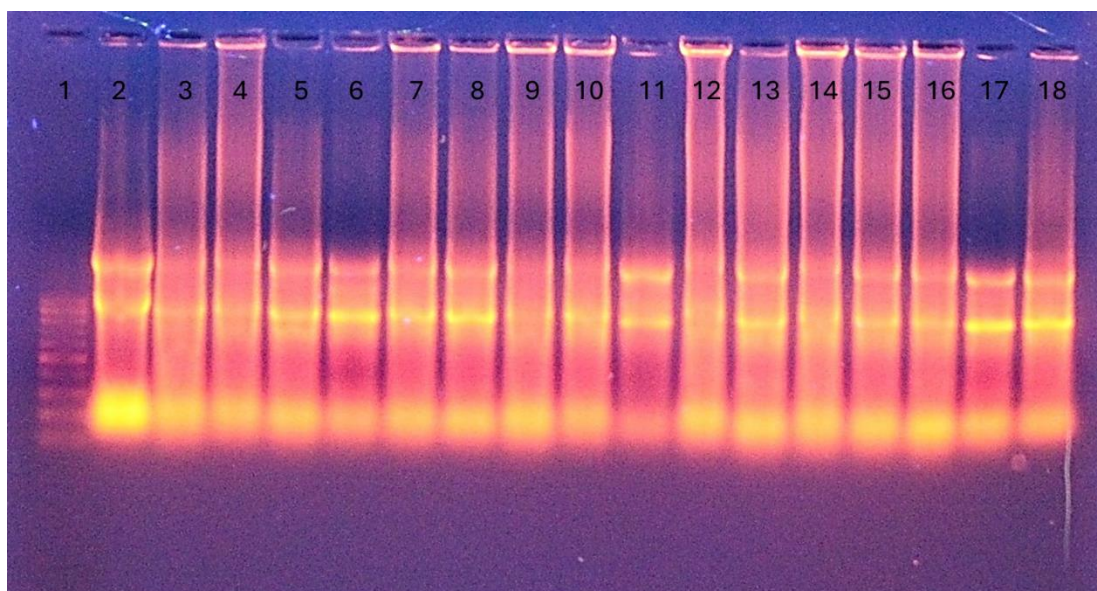
## 2.6 Quantificação relativa de IL8, AVBD9, Zonulina e Colecistoquinina em amostras de intestino de frango de corte

Para quantificação relativa da expressão gênica dos marcadores IL8, AVBD9, Zonulina e Colecistoquinina em amostras de cDNA oriundas de RNA total obtido de tecido intestinal foi realizada amplificação do cDNA por RT-qPCR. Para normalização dos dados de expressão foi usado o resultado da amplificação do cDNA codificado pelo gene  $\beta$ -actin. Para obtenção dos dados de nível relativo de expressão gênica foi empregado o método de RQ (*relative quantification*) =  $2^{\Delta\Delta Cq}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Foi usado como calibrador os dados de expressão do grupo controle sem nenhuma suplementação. Os resultados foram expressos graficamente usando média e desvio-padrão dos valores do nível relativo de expressão gênica de cada marcador para cada grupo experimental. Para a produção dos gráficos e análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o software GraphPad Prism® 10 (GraphPad Software Inc.). Os valores obtidos foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade das distribuições. Foram obtidos as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação para cada conjunto de dados. Em seguida, foi realizado o teste one-way ANOVA para cada conjunto de dados, para verificar se existiram diferença entre as variâncias, e o pós-teste de Tukey, de múltiplas comparações, para verificar quais médias foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 2.7 Resultados e Discussão

Como primeira etapa deste trabalho, foi realizada a extração de RNA total das amostras de duodeno coletadas nos 57 frangos, submetidos aos 3 tratamentos experimentais aqui avaliados. De forma geral, o rendimento do RNA extraído foi satisfatório, com uma média de rendimento de  $2231,0 \pm 782,5$  ng/ $\mu$ L e valores médios de A260/A280 e A260/A280 de  $2,1 \pm 0,05$  e  $2,0 \pm 0,10$ , respectivamente. Com relação à integridade, os RNAs extraídos se apresentaram relativamente íntegros, conforme pode ser visualizado pelo perfil de eletroforese de algumas das amostras extraídas ilustrado na FIGURA 1. Os dados de quantificação e análise de qualidade das 54 amostras estão apresentados na TABELA 2. Portanto, as amostras de RNAs extraídas apresentaram padrões de qualidade suficientes para seu emprego nas reações de RT-qPCR.

FIGURA 1 – Gel de eletroforese em agarose para análise da integridade de amostras de RNA total extraídas a partir de intestinos de frango de corte



Legenda: Perfis de integridade de amostras de RNA total obtidos a partir da resolução de RNA em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e documentado em transluminador com luz UV Gel Doc XR (Bio-rad, Hercules, CA, EUA). Na canaleta 1 foi aplicado marcador de pelo molecular de 1 kb DNA ladder (Kasvi), nas canaletas demais canaletas foram aplicadas diferentes amostras de RNA total, onde é possível perceber 3 bandas bem visíveis que representam os rRNAs ribossomais 28S, 18S e 5S.

TABELA 1 – Dados de quantificação das amostras de RNA total extraídas a partir de intestino de frangos de corte

| Grupo Experimental | Identificação do RNA | ng/ $\mu$ L | A260/280 | A260/230 |
|--------------------|----------------------|-------------|----------|----------|
| CONTROLE           | 13                   | 4249,2      | 2,06     | 2,12     |
| CONTROLE           | 14                   | 4132,4      | 2,03     | 2,09     |
| CONTROLE           | 15                   | 3157,9      | 1,95     | 1,69     |
| CONTROLE           | 49                   | 1953        | 2,13     | 2,05     |
| CONTROLE           | 50                   | 469,9       | 2,08     | 1,82     |
| CONTROLE           | 51                   | 2147,5      | 2,13     | 1,92     |
| CONTROLE           | 22                   | 1878        | 2,1      | 1,92     |
| CONTROLE           | 23                   | 1862,5      | 2,09     | 1,9      |
| CONTROLE           | 24                   | 1316,5      | 2,22     | 1,96     |
| CONTROLE           | 25                   | 1252,5      | 2,07     | 2,02     |
| CONTROLE           | 26                   | 1458,3      | 2,12     | 1,97     |



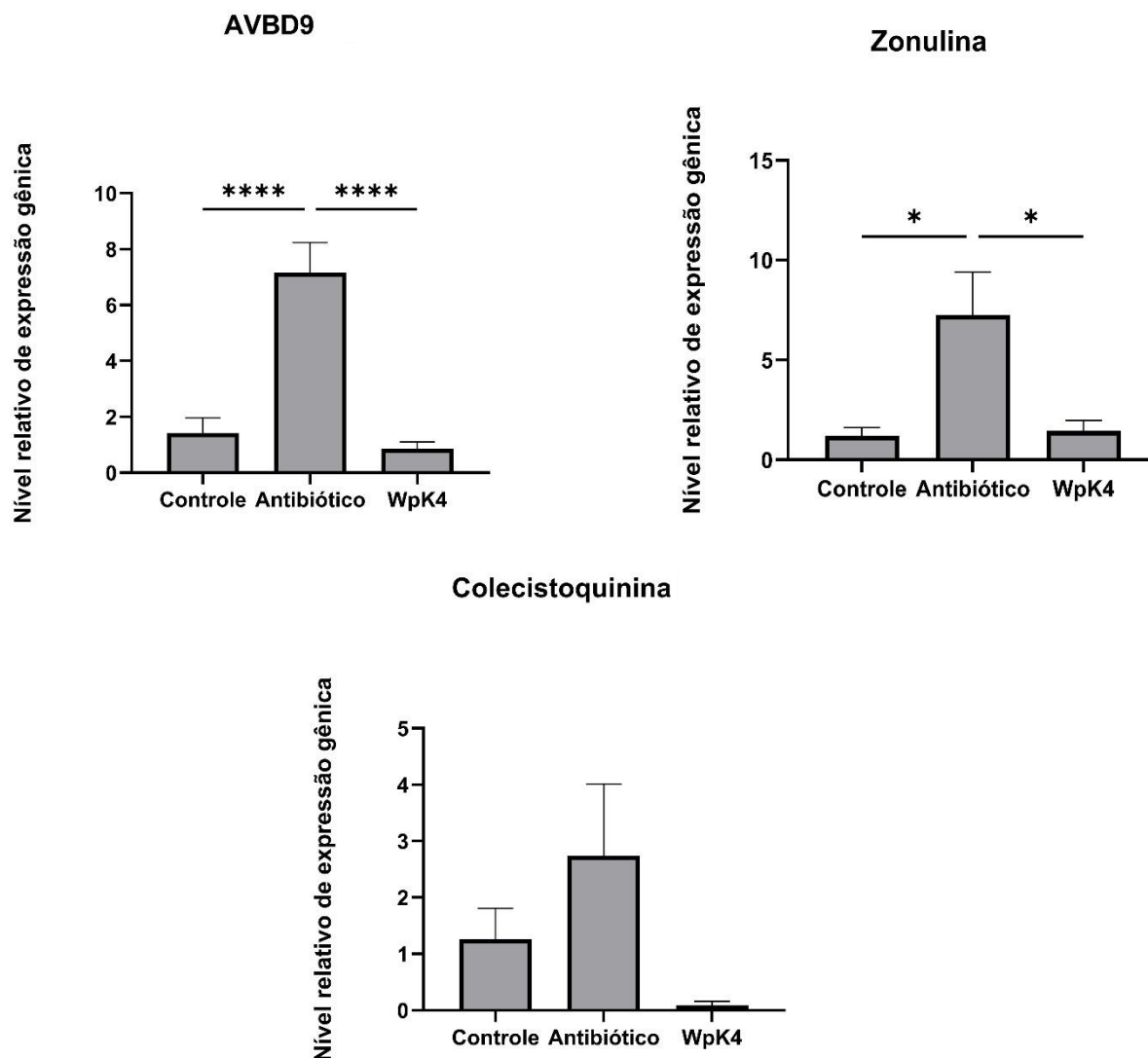
|             |     |        |      |      |
|-------------|-----|--------|------|------|
| CONTROLE    | 27  | 1180,9 | 2,07 | 1,96 |
| CONTROLE    | 34. | 888,6  | 2,07 | 1,97 |
| CONTROLE    | 35  | 2171,2 | 2,1  | 2,04 |
| CONTROLE    | 36  | 1538,4 | 2,11 | 2,1  |
| CONTROLE    | 37. | 1455   | 2,1  | 2,04 |
| CONTROLE    | 38. | 1608,4 | 2,12 | 2,08 |
| CONTROLE    | 39. | 1993,3 | 2,12 | 2,09 |
| <hr/>       |     |        |      |      |
| ANTIBIÓTICO | 4   | 4559   | 1,99 | 1,76 |
| ANTIBIÓTICO | 5   | 3273,4 | 2,05 | 2,12 |
| ANTIBIÓTICO | 6   | 3208,7 | 1,97 | 1,76 |
| ANTIBIÓTICO | 19  | 2554,4 | 1,96 | 1,44 |
| ANTIBIÓTICO | 20  | 2454   | 1,98 | 1,53 |
| ANTIBIÓTICO | 58  | 518,1  | 2,04 | 2,05 |
| ANTIBIÓTICO | 59  | 1942,2 | 2,12 | 2,08 |
| ANTIBIÓTICO | 60  | 2299,9 | 2,12 | 2    |
| ANTIBIÓTICO | 21  | 2035,5 | 2,12 | 1,92 |
| ANTIBIÓTICO | 31  | 1452,8 | 2,1  | 2,1  |
| ANTIBIÓTICO | 32  | 1950,2 | 2,11 | 2,04 |
| ANTIBIÓTICO | 33. | 1353,3 | 2,1  | 2,03 |
| ANTIBIÓTICO | 61  | 570,2  | 2,14 | 2,09 |
| ANTIBIÓTICO | 62  | 2237,7 | 2,1  | 1,9  |
| ANTIBIÓTICO | 63  | 1674,1 | 2,1  | 2,02 |
| ANTIBIÓTICO | 67  | 2093,8 | 2,07 | 2    |
| ANTIBIÓTICO | 68  | 2252,4 | 2,12 | 1,99 |
| ANTIBIÓTICO | 69  | 4454,7 | 2,11 | 2,16 |
| <hr/>       |     |        |      |      |
| WpK4        | 1   | 3118,5 | 2,04 | 2,12 |
| WpK4        | 2   | 3538,4 | 1,99 | 1,86 |
| WpK4        | 3   | 3251,3 | 1,96 | 1,59 |
| WpK4        | 7   | 3427,3 | 2,04 | 2,07 |
| WpK4        | 8   | 1205,3 | 2,08 | 2,06 |
| WpK4        | 9   | 2468,3 | 2,08 | 2,1  |
| WpK4        | 16  | 3297   | 1,98 | 1,99 |
| WpK4        | 17  | 3436,4 | 1,98 | 2,07 |
| WpK4        | 18  | 1344,7 | 2,04 | 1,86 |
| WpK4        | 41  | 1642,7 | 2,11 | 1,97 |
| WpK4        | 42  | 969,5  | 2,17 | 1,97 |
| WpK4        | 52  | 2043,4 | 2,13 | 2,06 |
| WpK4        | 53  | 2535,2 | 2,14 | 1,98 |
| WpK4        | 54  | 2000,6 | 2,12 | 2,07 |
| WpK4        | 40  | 1827,1 | 2,11 | 2,11 |
| WpK4        | 64  | 4455,5 | 1,95 | 1,94 |

|      |    |        |      |      |
|------|----|--------|------|------|
| WpK4 | 65 | 2403,8 | 2,13 | 2,05 |
| WpK4 | 66 | 2092,8 | 2,1  | 1,95 |

Durante a etapa de padronização das reações de qPCR para amplificação dos genes IL8, AVBD9, Zonulina, Colecistoquinina e  $\beta$ -actina conseguimos reações com eficiência de amplificação entre 90-110% para todos os genes, mesmo IL8. Muito provavelmente a expressão de IL8 no intestino de frangos de corte no momento do abate aos 42 dias de idade é baixa, e por isso, a quantidade de mRNA deste gene em amostras de RNA total extraída não foi suficiente para gerar sinal de amplificação detectável em nosso sistema experimental de amplificação. Devido à dificuldade de aquisição de novos reagentes, como por exemplo, um novo kit de produção de cDNA, um outro tipo MasterMix de QPCR mais sensível de outro fabricante ou a fabricação de um novo par de iniciadores para uma nova tentativa de amplificação do marcador IL8, não foram possíveis realizar novos testes para tentar gerar os resultados de expressão gênica deste marcador. Por esse motivo, não foi possível realizar a análise da expressão gênica de IL8 entre os diferentes grupos experimentais avaliados neste trabalho. É relatado na literatura um baixo nível de expressão gênica de IL8 no intestino de frangos (WANG et al., 2020), o que pode explicar a dificuldade encontrada para amplificação deste marcador por RT-qPCR

Para os demais marcadores, foi possível realizar a amplificação por RT-qPCR de todas as 54 amostras de cDNA produzido a partir das amostras de RNA total. Os resultados da análise de quantificação relativa da expressão gênica de AVBD9, Zonulina e Colecistoquinina em amostras de intestino de frango de corte estão sumarizados na FIGURA 2. Em todos os resultados de análise de expressão gênica relativa, o grupo controle sem suplementação foi usado como calibrador, e seu nível relativo de expressão gênica médio é considerado de 1. A partir da expressão dos animais do grupo controle, a expressão dos demais grupos experimentais é obtida.

FIGURA 2 - Expressão relativa de AVBD9, Zonulina e Colecistoquinina em intestino de frangos de corte



Legenda: A expressão gênica de AVBD9, Zonulina e Colecistoquinina em intestino de frangos de corte foi representada pelo nível relativo de expressão gênica. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Livak & Schmittgen (2001) usando como calibrador a média dos dados de expressão dos animais sem suplementação (Controle). O resultado de cada tratamento é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas usando one-way ANOVA seguida do pós-teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) entre os tratamentos experimentais foram identificadas nos gráficos com (\*, \*\* e \*\*\*\* respectivamente) sobre traços.

A suplementação com antibiótico produziu aumento significativo ( $p < 0,001$ ) na expressão gênica de AVBD9 no intestino de frangos em comparação ao grupo controle sem suplementação e ao grupo suplementado com WpK4. AVBD9 é uma  $\beta$ -defensina, que compõem um conjunto de pequenos peptídeos secretadas constitutivamente por mucosas relacionados com a imunidade inata. O aumento da expressão de AVBD9 produzido pela suplementação com antibióticos indica que esse tratamento aumenta a resposta imune inata intestinal, o que está de acordo com seu efeito como promotor de crescimento. Aumentos na expressão gênica de AVBD9 podem estar relacionados a uma melhora na resistência de animais suplementados com antibióticos a contaminação por bactérias gram-positivas ou negativas, o que pode explicar os melhores índices zootécnicos encontrados em animais que receberam esse tratamento quando comparados com os animais que não receberam suplementação ou que receberam suplementação com WpK4 (ZHANG et al., 2016). Os animais que receberam suplementação com antibióticos apresentaram aos 42 dias maior ganho de peso (1-42 dias) e peso final ao abate ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais que receberam suplementação com WpK4 (dados não publicados). A ausência de diferenças na expressão de AVBD9 entre o grupo suplementado com WpK4 e o controle sem suplementação indica que o probiótico provavelmente não é capaz de interferir na modulação da resposta imune em nível de mucosa intestinal.

O grupo que recebeu suplementação com antibióticos apresentou maiores níveis de expressão gênica de Zonulina ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os grupos que não receberam suplementação ou foram suplementados com WpK4. A Zonulina é uma proteína que regula a permeabilidade intestinal, considerada em mucosas como uma proteína reguladora de junções estreitas. O aumento da expressão de Zonulina em mucosas são parte da manutenção autóloga da homeostase intestinal, incluindo regulação específica da resposta imune e aumento da permeabilidade intestinal (ZHANG et al., 2024). Portanto, os níveis aumentados de Zonulina nos animais suplementados com antibióticos podem estar associados a uma maior absorção de nutrientes pela mucosa intestinal, o que pode explicar os melhores índices zootécnicos alcançados por esses animais, com relação ao ganho de peso e peso ao abate, quando comparado com os índices de animais suplementados com WpK4 (dados não publicados). A ausência de diferenças na expressão de Zonulina entre o grupo sem suplementação e o grupo suplementado

com WpK4 indica que a linhagem probiótica não tem efeitos danosos sobre a permeabilidade intestinal, sendo provavelmente considerada inócua para frangos.

Por fim, não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica de Colecistoquinina entre os diferentes grupos experimentais aqui avaliados. Mesmo que as diferenças encontradas não tenham sido significativas, existe uma tendência nos dados de redução da expressão gênica de Colecistoquinina no grupo suplementado com WpK4 em comparação com o grupo suplementado com antibiótico e com o grupo que não recebeu suplementação ( $p=0,1365$ ). A colecistoquinina é um hormônio secretado pela mucosa intestinal que tem vários efeitos relacionados à regulação do apetite e da saciedade, bem como com o controle do fluxo de conteúdo estomacal em direção ao intestino. A redução da produção deste marcador em animais suplementados com WpK4, mesmo que não significativa está de acordo com alguns dos dados zootécnicos levantados no experimento em campo, uma vez que estes animais apresentaram significativamente ( $p<0,05$ ) menor consumo de ração e melhor conversão alimentar (dados não publicados) em comparação aos outros grupos. Em frangos, tanto proteínas quanto aminoácidos dietéticos presentes na mucosa intestinal são potentes estimuladores da liberação de Colecistoquinina (LIU et al., 2012). No presente trabalho parece que a redução da expressão de Colecistoquinina nos animais suplementados com WpK4 pode ser resultado da quantidade reduzida de ração ingerida por esses animais, quando comparado com os demais grupos experimentais.

### 3 CONCLUSÃO

Devido a problemas experimentais o principal objetivo deste trabalho que era avaliar as alterações de expressão gênica de IL8 no intestino de frangos submetidos à suplementação nutricional com *W. paramesenteroides* WpK4 não foi alcançado. Porém, outros marcadores foram dosados nas amostras de intestino de frangos submetidos ao experimento de suplementação em campo. Apesar de não esclarecerem todos os efeitos observados na variação dos índices zootécnicos entre os tratamentos experimentais, os dados de expressão gênica de AVBD9, Zonulina e Colecistoquinina aqui apresentados apresentam relações importantes com alguns dos resultados observados no experimento em campo. Novos estudos em campo e



moleculares precisam ser realizados para elucidar com mais clareza possíveis efeitos benéficos da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 na suplementação nutricional de frangos de corte.

### REFERÊNCIAS

ALVIM, L. B.; SANDES, S. H. C.; SILVA, B. C.; STEINBERG, R. S.; CAMPOS, M. H. A.; ACURCIO, L. B.; NUNES, A. C. Weissella paramesenteroides WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. *Beneficial Microbes*, v. 7(1), p. 61–73, 2016.

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.

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.

LIU, L.; SONG, Z.; SHEIKHAHMADI, A.; JIAO, H.; LIN, H. Effect of Corticosterone on Gene Expression of Feed Intake Regulatory Peptides in Laying Hens, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 162 (4), 2012.

OLIVEIRA, S. R.; COSTA, K.; UETANABARO, A. P. T.; NEUMANN, E.; LARA, J. C.; SOUZA, M. R. & NICOLI, J. R. In Vitro Selection and In Vivo Trial of Lactobacillus Strains for Use a Potential Probiotics for Laying Hens. *International Journal of Veterinary Science & Technology*, v. 4(1), p.34-42, 2020.

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.



ZHANG, L.; LU. L.; LI, S.; ZHANG, G.; OUYANG, L.; ROBINSON, K.; et al. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Induces Avian  $\beta$ -Defensin Gene Expression in Chickens. PLoS ONE 11(5): e0154546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154546>, 2016.

ZHANG, J.; REN, X.; WANG. S.; LIU, R.; SHI, B.; DONG, H.; WU, Q. Microbial interventions in yak colibacillosis: Lactobacillus-mediated regulation of intestinal barrier. Front. Cell. Infect. Microbiol. 14:1337439. doi: 10.3389/fcimb.2024.1337439, 2024.

WANG, C.; Yu, H.; Wang, X.; Zou, W.; Mi, C.; Hu, T.; Dai, G. Effect of IL-8, IL-2 and IL-15 Gene Expression in Different Tissues of Jinghai Yellow Chicken Infected by Eimeria Tenella. J. Phys.: Conf. Ser. 1629- 012022, 2020.

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.