

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**“USO DE PROBIÓTICO E ÓLEOS ESSENCIAIS NA
RAÇÃO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL,
ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS E A
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AOS
PROCESSOS DE DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE
NUTRIENTES EM FRANGOS”**

Miguel Frederico Fernandez Alarcon

Médico Veterinário

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**“USO DE PROBIÓTICO E ÓLEOS ESSENCIAIS NA
RAÇÃO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL,
ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS E A
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AOS
PROCESSOS DE DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE
NUTRIENTES EM FRANGOS”**

Miguel Frederico Fernandez Alarcon

Orientador: Prof. Dr. Renato Luis Furlan

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia

2015

Fernandez Alarcon, Miguel Frederico
F363u Uso de probiótico e óleos essenciais na ração sobre a microbiota intestinal, atividade de enzimas digestivas e a expressão de genes relacionados aos processos de digestão e absorção de nutrientes em frangos / Miguel Frederico Fernandez Alarcon. -- Jaboticabal, 2015
xii, 107 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Renato Luis Furlan

Coorientador: Luiz Roberto Furlan

Banca examinadora: João Martins Pizauro Júnior, Marcos Túlio Oliveira, Douglas Emygdio de Faria, Rafael Simone Saia

Bibliografia

1. 16S DNAr 2. Antibiótico promotor de crescimento 3. Enzimas de membrana intestinal 4. Fisiologia intestinal 5. Probiótico Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.5:636.087

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

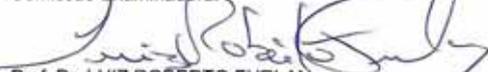
TÍTULO: USO DE PROBIÓTICO E ÓLEOS ESSENCIAIS NA RAÇÃO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL, ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS E A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AOS PROCESSOS DE DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE NUTRIENTES EM FRANGOS

AUTOR: MIGUEL FREDERICO FERNANDEZ ALARCON

ORIENTADOR: Prof. Dr. RENATO LUIS FURLAN

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ ROBERTO FURLAN

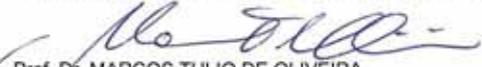
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUIZ ROBERTO FURLAN
Centro de Aquicultura Da Unesp / Jaboticabal/SP



Prof. Dr. JOAO MARTINS PIZAURO JUNIOR
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. DOUGLAS EMYGDIO DE FARIA
Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP



Prof. Dr. RAFAEL SIMONE SAIA
Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 13 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Miguel Frederico Fernandez Alarcon – nascido na cidade de Santo André - SP, aos 18 de setembro de 1984. É médico Veterinário formado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal em dezembro de 2007. Durante a graduação desenvolveu dois projetos de iniciação científica, nas áreas de fisiologia e nutrição aviária. Em março de 2008, iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na mesma universidade, com ênfase em fisiologia intestinal e imunologia de matrizes pesadas, obtendo o título de mestre em 04 de agosto de 2010. Em março de 2011, iniciou o curso de Doutorado pelo mesmo programa, sendo que de janeiro a outubro de 2014 realizou atividades de pesquisa, referentes ao seu projeto de Doutorado no exterior, no departamento de Zootecnia na Michigan State University.

“Depois de plantada a semente deste incrível arbusto, não se vê nada, por aproximadamente 5 anos, exceto lento desabrochar de um diminuto broto, a partir do bulbo.

Uma maciça e fibrosa estrutura de raiz, que se estende vertical e horizontalmente pela terra está sendo construída.

Então, no final do 5º Ano, o bambu chinês, cresce até atingir a altura de 25 metros.”

Provérbio chinês

Muitas coisas na vida pessoal e profissional são iguais ao bambu chinês.

Você trabalha, investe tempo, esforço, faz tudo o que pode para nutrir seu crescimento, e, às vezes não vê nada por semanas, meses, ou anos.

Mas se tiver paciência para continuar trabalhando, persistindo e nutrindo, o seu 5º ano chegará, e, com ele, virão um crescimento e mudanças que você jamais esperava ...

O bambu chinês nos ensina que não devemos facilmente desistir de nossos projetos, e de nossos sonhos...

Em nosso trabalho, especialmente, que é um projeto fabuloso, que envolve mudanças... de comportamento, de pensamento, de cultura e de sensibilização, devemos sempre lembrar do bambu chinês, para não desistirmos facilmente diante das dificuldades que surgirão.

Procure cultivar sempre dois bons hábitos em sua vida: a Persistência e Paciência, pois você merece alcançar todos os seus sonhos!!!

É preciso muita fibra para chegar às alturas e, ao mesmo tempo, muita flexibilidade para se curvar ao chão.

Stephen R. Covey

DEDICATÓRIAS

Aos meus grandes doutores, **Andres Fernandez Alarcon e Olga Fernandez Sulis**, minha eterna gratidão por compreenderem minha ausência em momentos que gostaria de estar junto, pelo amor, exemplo de dignidade e humildade, esforço, incentivo constantes.

A minha amada esposa **Caroline Della Nina Pistoni** por todo amor, compreensão, incentivo, luta, paciência e por tornar minha vida mais feliz, sempre.

As minhas irmãs **Rosa Carina Fernandez Sulis e Vera Fernandez Sulis** pelo amor, exemplos de vida e apoio.

Aos meus amados sobrinhos Luisa Carina Fernandez Flurschütz, **Marina Isabel Mateos Fernandez**, Mirela Mateos Fernandez e **Valentin Frederico Fernandez Flurschütz** que, ainda que distantes, são grande fonte de inspiração.

Aos meus segundos pais, **Denise Costa Della Nina Pistoni e Domingos Pistoni Junior** pelo amor, apoio, exemplos e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão ao professor Luiz Roberto Furlan (Cedral) pela amizade e pelo envolvimento ímpar neste trabalho e em minha formação profissional, através de discussões científicas, conselhos, apoio, exemplos de honra e conduta como professor e pesquisador. Fica aqui registrado meu respeito e admiração.

Ao Professor Renato Luis Furlan, pela valiosa amizade, incentivo e ensinamentos durante todos os anos de convivência, bem como pela liberdade concedida durante meu doutorado, que possibilitaram o desenvolvimento de habilidades profissionais e pessoais que não seriam possíveis em um cenário distinto.

Ao professor Marcos Macari pelo exemplo profissional e por ter me dado a oportunidade de trabalhar em alguns projetos sob sua supervisão, que muito contribuíram para a minha formação.

Aos professores Angelo Berchieri Júnior, Douglas Emygdio de Faria, Euclides Braga Malheiros, Janete Desidério Sena, João Martins Pizauro Júnior, Marcos Túlio Oliveira, Rafael Simone Saia pelas correções e contribuições, quer seja na elaboração do projeto, ou nas bancas de qualificação ou defesa de doutorado.

Aos demais professores que fizeram parte do meu processo de aprendizado e que colaboraram com a minha formação acadêmica.

Aos meus amigos Felipe Jorge da Silva e Juliana Della Nina Pistoni minha eterna gratidão pela amizade, apoio e bondade demonstrados nas horas mais difíceis do meu Doutorado, especialmente nos meses que estive ausente e que nossa família passou por um momento muito delicado.

Aos amigos pessoais e de UNESP “parceiros de estrada”, que em muitos casos se misturam, Adriano Marques Gonçalves, André Marcos Santana, Caroline Carla Santana, Daniel Mendes Borges Campos, Fabrício Hirota Hada, Fernando Augusto de Souza, Flávia Maria de Souza Carvalho, Gabriela Gomes de Freitas, Gabriella Cavazzini Pavarina, Guilherme Baldissera, Gustavo Henrique Squassoni, Ligia Subitoni Antonio, Luiz Flavio José dos Santos, Miryelle Freire Sarcinelli, Oliveira Caetano de Freitas, Paulo Roberto de Oliveira Carneiro, Rafael Antonio Casarin Penha Filho, Raquel Lunedo, Wedson Carlos

Lima Nogueira, e os demais que não citei (me perdoem), agradeço por toda a ajuda, seja ela profissional ou afetiva, sou honrado por ter conhecido e interagido com todos, certamente um pouco de vocês faz parte da minha pessoa..

Aos professores Juan Pedro Steibel e Nathalie Trottier pela oportunidade e ensinamentos durante os 9 meses que estive na Michigan State University, os quais serão levados para toda minha vida.

Aos companheiros e amigos, feitos durante minha permanência no exterior, Andi Busch, Carolina Ferreira, Guilherme Fazan Rossi, João Paulo, Laura Bibiana Gualdrón Duarte, Lei Zhou, Lilian Oliveira, Marília Kumi, Rodrigo Motta, Vinicius Martins, Yeni Bernal Rubio, entre outros que peço desculpas por não citar, minha gratidão pelos momentos vividos, que agora também fazem parte de mim.

Aos funcionários, simbolicamente citados aqui como Andressa de Souza (Depto. de Preventiva) e Robson (aviário), pelo auxílio e por ter viabilizado a realização deste projeto.

.A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela Bolsa de Estudos e Auxílio à Pesquisa concedidos (processos nºs 2011/17378-0 e 2012/03927-5).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Antibióticos promotores de crescimento	2
2.1.1. Mecanismos de ação	2
2.1.2. Hipóteses para a ação dos APCs na promoção do crescimento animal.....	2
2.1.3. Resistência bac'teriana a antibióticos	3
2.1.4. Consequências da proibição da comercialização dos APCs em países europeus	4
2.2. Alternativas aos APCs	5
2.2.1. Probióticos	6
2.2.1.1. Definição e características dos probióticos.....	6
2.2.1.2. Efeitos dos probióticos	7
2.2.2. Óleos essenciais.....	8
2.2.2.1. Definição e características dos OEs	8
2.2.2.2. Efeitos dos OEs.....	9
2.3. A microbiota intestinal.....	10
2.3.1. O estudo da microbiota intestinal.....	11
2.3.2. A composição da microbiota de frangos em situações normais e em algumas situações específicas.....	14
2.4. Alterações na mucosa intestinal.....	15
III. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	18
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2 – ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS INTESTINAIS EM FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM <i>Bacillus subtilis</i> E/OU ÓLEOS ESSENCIAIS: EXPRESSÃO GÊNICA, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ABSORÇÃO DE GLICOSE 27	
RESUMO.....	27
ABSTRACT	28

I	INTRODUÇÃO.....	29
II	MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1.	Local.....	31
2.2.	Animais, dieta e manejo	31
2.3.	Desempenho	33
2.4.	Coleta de amostras	33
2.5.	Avaliação da expressão dos genes relacionados à digestão (APN, SI e MGA) e absorção dos nutrientes (<i>SLC15A1</i> , <i>SLC2A2</i> , <i>SLC5A1</i> e <i>ATP1A1</i>) pela técnica de PCR em tempo real (qPCR)	34
2.5.1.	Extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNA total	34
2.5.2.	Gene normalizador para PCR em tempo real.....	34
2.5.3.	Reação de transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real	37
2.6.	Atividade de enzimas de membrana (fosfatase alcalina, aminopeptidase e maltase).....	40
2.7.	Ensaio de Absorção de glicose <i>in vitro</i>	40
2.8.	Análise estatística.....	41
III	RESULTADOS	42
3.1.	Desempenho zootécnico	42
3.2.	Expressão Gênica	44
3.3.	Atividade enzimática	49
3.5.	Ensaio de absorção.....	54
IV	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	54
4.1.	Desempenho Zootécnico.....	54
4.2.	Expressão Gênica e atividade enzimática.....	55
4.2.1.	Influência da dieta.....	55
4.2.2.	Influência da idade	59
V	CONCLUSÕES.....	63
VI	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 3 – MORFOMETRIA E MICROBIOTA DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM AVILAMICINA, <i>Bacillus subtilis</i> E ÓLEOS ESSENCIAIS	68
	RESUMO.....	68
	ABSTRACT	69
I	INTRODUÇÃO.....	70

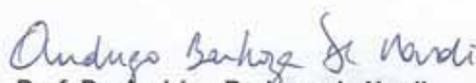
II	MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1.	Local, animais e dieta	72
2.2.	Coleta de amostras	72
2.3.	Morfometria da mucosa do intestino delgado	73
2.4.	Análise da microbiota intestinal	74
2.4.1.	Preparo do “pellet” bacteriano	74
2.4.2.	Extração de DNA das amostras de microbiota intestinal	74
2.4.3.	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados e cobertura de estirpes	75
2.4.4.	Amplificação das amostras de DNA genômico	77
2.4.5.	Clonagem em vetor plasmídeo TOPOTA®	77
2.4.6.	Cultivo de clones bacterianos e extração de DNA plasmidial	78
2.4.7.	Sequenciamento dos clones e comprovação da especificidade dos “primers” 79	
2.4.8.	Purificação e linearização dos plasmídeos para a construção das curvas- padrão	79
2.4.9.	Construção da curva padrão e quantificação absoluta	80
2.4.10.	Reações de PCR em tempo real	81
2.4.11.	Análise de “threshold” e eficiência das curvas-padrão.....	81
2.5.	Análise estatística.....	82
III	RESULTADOS	83
3.1.	Morfometria intestinal.....	83
3.2.	Microbiota presente na mucosa intestinal	85
IV	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	90
4.1.	Morfometria intestinal.....	90
4.2.	Microbiota presente na mucosa intestinal	92
V	CONCLUSÕES.....	98
VI	REFERÊNCIAS	98
	CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	105

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 008179/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Atividade de LPS-desfosforilase da fosfatase alcalina presente em intestino de frangos de corte**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 10 de Maio de 2013.

Jaboticabal, 10 de Maio de 2013.


Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi
Coordenador - CEUA

USO DE PROBIÓTICO E ÓLEOS ESSENCIAIS NA RAÇÃO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL, ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS E A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AOS PROCESSOS DE DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE NUTRIENTES EM FRANGOS

RESUMO – A hipótese do trabalho se baseou em que a adição de avilamicina (antibiótico promotor de crescimento), *Bacillus subtilis* (probiótico) e óleos essenciais (carvacrol, cinamaldeído, cineol e extrato de pimenta), elevam o desempenho zootécnico de frangos a partir de benefícios na mucosa intestinal e na microbiota a ela associada. No Capítulo 1 apresentamos uma revisão bibliográfica sobre o assunto, a qual nos permitiu desenhar a referida hipótese. Os objetivos específicos do presente estudo foram avaliar o efeito destes aditivos alimentares aos 7, 21 e 42 dias de vida sobre: 1) o desempenho zootécnico; 2) os níveis de RNAm dos genes *SLC15A1*, *SLC5A1*, *SLC2A2*, *ATP1A1*, (respectivamente codificadores de PepT1, SGLT1, GLUT2 e Na-K-ATPase) na mucosa do jejuno; 3) atividades de fosfatase alcalina, maltase e aminopeptidase nas membranas da borda em escova no jejuno; 4) absorção de glicose intestinal “*in-vitro*”. 5) número de cópias do 16S DNAr de grupos bacterianos de maior predominância na mucosa do íleo; 6) morfometria das vilosidades intestinais; Todos os dados foram avaliados em função do tempo, exceto os dados de desempenho. Para tanto, 1320 frangos foram divididos entre cinco tratamentos de acordo com a suplementação [dieta basal como controle (CON); *Bacillus subtilis* (BS); *Bacillus-subtilis* + óleo essencial (BS + OEs); óleos essenciais (OEs); avilamicina como controle positivo (AVI)]. Os resultados do Capítulo 2 demonstraram que a suplementação de AVI e OEs na ração de frangos de 1 a 42 dias de idade promove maior atividade de fosfatase alcalina intestinal e aminopeptidase, enquanto a adição de *Bacillus subtilis* promove maior quantidade de RNAm do gene codificador do transportador de peptídeos 1 (*SLC15A1*). No Capítulo 3 evidenciou-se que a suplementação com BS ou OEs promove alterações momentâneas na morfometria intestinal dos frangos. Os *Lactobacillus* predominam na mucosa do íleo, e sua maior prevalência ocorre no dia 7, seguida pelo dia 42. A utilização de AVI ou OEs altera o padrão de sucessão dos *Enterococcus*, enquanto a dieta BS + OEs reduz os *Lactobacillus*. Conclui-se que as alterações encontradas não favoreceram o desempenho zootécnico dos frangos e que, durante o seu desenvolvimento, o intestino do frango sofre alterações específicas que podem ser levadas em conta para a formulação de dietas que se adequem melhor ao perfil de enzimas e transportadores de nutrientes expressados no intestino ao longo do tempo.

Palavras-chave: 16S DNAr, antibiótico promotor de crescimento, enzimas de membrana intestinal, fisiologia intestinal, probiótico, transporte intestinal de nutrientes

6.

USE OF PROBIOTICS AND ESSENTIAL OILS IN THE DIET ON THE INTESTINAL MICROBIOTA, DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES AND EXPRESSION OF GENES RELATED TO DIGESTION AND ABSORPTION OF NUTRIENTS IN BROILERS

ABSTRACT – It was hypothesized that, when added to the feed, avilamycin (antibiotic growth promoter), *Bacillus subtilis* (probiotic) and essential oils (carvacrol, cinnamaldehyde, cineol and pepper extract) increase growth performance of broilers through benefits on intestinal mucosa and its microbiota. In Chapter 1 we present a literature review on the subject, which allowed us to draw such hypothesis. The specific objectives of this study were to evaluate the effect of these feed additives at 7, 21 and 42 days of life on: 1) the growth performance; 2) *SLC15A1*, *SLC5A1*, *SLC2A2*, *ATP1A1* mRNA levels (respectively encoding PepT1, SGLT1, GLUT2 and Na-K-ATPase) in the jejunum; 3) activities of alkaline phosphatase, maltase and aminopeptidase from the brush border membranes of the jejunum; 4) intestinal glucose absorption of *in vitro*; 5) 16S rDNA copy numbers of the major bacterial groups in association with the ileum mucosa. 6) morphology of the intestinal villi; All data were also evaluated over the time course, except for the performance data. Therefore, 1320 broiler chickens were divided among five treatments, according to supplementation [basal diet as control (CON); *Bacillus subtilis* (BS); *Bacillus subtilis* + essential oils (BS + EOs); essential oils (EOs); avilamycin as positive control (AVI)]. The results of Chapter 2 demonstrated that supplementation of BS promoted greater expression of *SLC15A1*, while EOs and AVI increased the activities of both IAP and APN. Analysis over time revealed an increase in the amount of mRNA *MGAM*, *SLC2A2*, *SLC15A1*, *SLC5A1* and *SI* from seven to 42 days. IAP was reduced after seven days, while MALT increased with age. Addition of *Bacillus subtilis* or essential oils in the diet induces changes in the expression of genes and activities of enzymes related to sugars and peptides utilization, but did not improve growth performance. In Chapter 3 it was shown that supplementation with BS or EOs supplementation promotes momentary changes in intestinal morphology of broilers. *Lactobacilli* predominate in the mucosa of the ileum, and their higher prevalence occur at day 7 and then at day 42. The use of AVI or EOs changes the pattern of succession of *Enterococcus*, while BS diet + EOs reduces *Lactobacillus*. We conclude that the changes found did not favor the growth performance of broilers and that, during its development, the chicken intestine undergoes specific changes that can be taken into account in the formulation of diets that best fits the profile of enzymes and nutrient transporters expressed in the intestine over time.

Keywords: 16S rDNA, antibiotic growth promoter, brush border enzymes, intestinal physiology, intestinal transport, probiotic

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB: gene codificador da β -actina citoplasmática

AGP: “antibiotic growth promoters”

ANPEP: gene codificador da aminopeptidase N

APCs: antibióticos promotores de crescimento

APN: aminopeptidase-N

ATP1A1: gene codificador do transportador ATPase, Na⁺/K⁺

ATPase: adenosina 5' trifosfatase

AVI: tratamento suplementado com avilamicina no presente estudo

BS + OEs: tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais no presente estudo

BS: tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* no presente estudo

CA: conversão alimentar

cDNA: DNA complementar

CON: tratamento controle no presente estudo

CR: consumo de ração

Ct: ciclo de “threshold”

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNase: desoxirribonuclease

RIN: índice de integridade do RNA

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EOs: “essential oils”

EPM: erro padrão da média

FAI: fosfatase alcalina intestinal

GAPDH: gene codificador da gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GLUT 2: transportador de glicose galactose e frutose independente de Na⁺

GP: ganho de peso

HPRT1: gene codificador da hipoxantina fosforibosiltransferase 1

IAP: “intestinal alkaline phosphatase”

LPS: lipopolissacarídeos

MALT: maltase

MGAM: gene codificador da maltase-glicoamilase

OE: óleos essenciais ou tratamento suplementado com óleos essenciais no presente estudo

PAS: método de coloração pelo ácido periódico-Schiff (PAS)

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PepT1: transportador de peptídeos 1

qPCR: PCR quantitativo em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: RNA mensageiro

Rnase: ribonuclease

RNase-free: livre de ribonuclease

RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real envolvendo a transcrição reversa

SGLT1: transportador de glicose e galactose dependente de Na⁺

SI: gene codificador da sacarase-isomaltase

SLC15A1: gene codificador do transportador de oligopeptídeos 1

SLC2A2: gene codificador do transportador de glicose galactose e frutose independente de Na⁺

SLC5A1: gene codificador do transportador de glicose e galactose dependente de Na⁺

SPF: “specific pathogen free”

TE: solução 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8,0

UFC: unidades formadoras de colônia

VMBE: vesículas de membrana da borda em escova

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Tabela 1. Composição das dietas inicial e final.....	44
Tabela 2. Resultados da análise com modelo linear misto com os componentes de variância para cada gene aos 7, 21 e 42 dias de idade.....	48
Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de RTq-PCR com os respectivos números de acesso no “Genbank” e descrição.....	51
Tabela 4. Médias observadas e resultados da análise de variância para consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g) e conversão alimentar (CA, g/g) de frangos de corte (N=6) nos períodos de 1 a 7, 8 a 21, 1 a 21, 22 a 42 e 1 a 42 dias de idade.....	55
Tabela 5. Resultados da análise de variância da expressão dos genes estudados através de um modelo linear misto.....	56
Tabela 6. Resultados da análise com o modelo linear misto mostrando fatores que influenciam a atividade das enzimas de membrana intestinal estudadas.....	62
Tabela 7. Área abaixo da curva (média \pm desvio padrão) para o decaimento de glicose intraluminal <i>in vitro</i>	66
 CAPÍTULO 3	
Tabela 1. “Primers” utilizados nas reações de qPCR.....	88
Tabela 2. Equações das curvas-padrão e valores de “slope”, r^2 e eficiência dos grupos bacterianos estudados.....	94
Tabela 3. Resultados da análise de variância das variáveis morfométricas estudadas através de um modelo linear misto.....	95
Tabela 4. Morfometria da mucosa do jejuno de frangos de corte (N=6) aos 7, 21 e 42 dias de idade.....	96
Tabela 5. Resultados da análise de variância do número de cópias do gene 16S para os grupos bacterianos estudados através de um modelo linear misto.....	98
Tabela 6. Número de cópias ¹ bacterianas da família <i>Enterobacteriaceae</i> , do Gênero <i>Enterococcus</i> spp. e do Grupo <i>Lactobacillus</i> e relação	

<i>Enterobacteriaceae /Lactobacillus</i> na mucosa do íleo de frangos de corte (N=4) aos 7, 21 e 42 dias de idade.....	99
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Estabilidade dos 3 genes candidatos a gene normalizador segundo o programa Genorm considerando todo o período experimental....	47
Figura 2. Estabilidade dos 3 genes candidatos a gene normalizador segundo o programa Norfinder considerando todo o período experimental..	47
Figura 3. Expressão do gene <i>SLC15A1</i> nos diferentes tratamentos em relação ao controle (CON) durante todo período experimental.....	57
Figura 4. Expressão dos genes <i>ATP1A1</i> e <i>MGAM</i> nos diferentes tratamentos em relação ao controle (CON) aos 7, 21 e 42 dias de idade.....	58
Figura 5. Comparação dos níveis de expressão gênica entre idades para: A – <i>ATP1A1</i> nos tratamentos BS e CON; B - <i>MGAM</i> em todos tratamentos; C - <i>SLC2A2</i> , <i>SLC15A1</i> , <i>SLC5A1</i> e <i>SI</i> considerando a média de todos tratamentos.....	60
Figura 6. Atividade enzimática de FAI (A), APN (B) e MALT (C) nos diferentes tratamentos em relação ao tratamento controle (CON) durante todo período experimental.....	63
Figura 7. Comparação da atividade enzimática de FAI (A), APN (B) e MALT (C) entre idades de coleta, considerando a média de todos os tratamentos.....	65
 CAPÍTULO 3	
Figura 1. Valor total de cópias do gene 16 S rDNA genômico de cada um dos grupos estudados na mucosa do íleo de frangos de corte aos 7, 21 e 42 dias de idade.....	100
Figura 2. Valor total de cópias do gene 16 S rDNA genômico de cada um dos grupos estudados na mucosa do íleo de frangos de corte de acordo com os tratamentos, aos 7, 21 e 42 dias de idade.....	101

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

I. INTRODUÇÃO

A introdução de aditivos na dieta, reconhecidamente, foi um dos fatores que contribuiu para o sucesso da avicultura moderna. O termo aditivo inclui as substâncias que, quando adicionadas à ração, trazem melhorias ao desempenho de aves saudáveis ou influenciam positivamente o meio ambiente. Os antibióticos promotores de crescimento (APCs) são os principais representantes desta classe de substâncias, sendo que seu uso na dieta de animais de produção trouxe melhorias de ganho de peso e eficiência alimentar, bem como queda nas taxas de mortalidade.

Os benefícios dos APCs são atribuídos à sua ação inibitória sobre microorganismos indesejáveis do trato gastrintestinal, bem como sobre seus metabólitos (IMMERSEEL et al., 2004). Tais funções permitem que os nutrientes da dieta sejam aproveitados para o desenvolvimento muscular ao invés de serem utilizados para a formação da resposta imune (DE ARAUJO et al., 2007). A avilamicina destaca-se como um dos antibióticos mais empregados na nutrição animal, tendo sua utilização permitida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Por outro lado, o uso dos APCs encontra-se sob severa investigação científica, porque tais substâncias têm sido associadas à emergência de cepas resistentes a antibióticos, o que representa ameaça para a saúde humana (SMITH et al., 2003), para animais silvestres e de companhia. Neste sentido, em 1997, a União Européia proibiu o emprego da avoparcina como promotor de crescimento e, em janeiro de 2006, baniu o uso dos APCs na nutrição animal (BURCH, 2006).

Probióticos e mais recentemente óleos essenciais (OEs) têm sido considerados aditivos potencialmente alternativos aos APCs, no entanto a ação destas substâncias na mucosa intestinal e na microbiota das aves não é completamente esclarecida. De fato, resultados conflitantes no desempenho, mucosa intestinal e microbiota, em resposta a utilização destes aditivos foram reportados na literatura.

Em virtude da falta de conhecimento sobre o efeito do *Bacillus subtilis* e dos OEs na microbiota intestinal e na expressão e atividade de enzimas e transportadores de membrana intestinal e considerando que tais informações poderiam ser úteis para

a compreensão do mecanismo de ação destes aditivos, elaborou-se o presente trabalho.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Antibióticos promotores de crescimento

Os APCs são antibióticos que quando adicionados na ração em baixa concentração, ou seja em quantidade subterapêutica, são capazes de melhorar o desempenho do animal (NIEWOLD, 2007). O efeito benéfico dos APCs no crescimento foi descoberto na década de 40 do século passado, quando foi verificado que animais alimentados com *Streptomyces aureofaciens* desidratado contendo resíduo de clortetraciclina apresentaram desempenho superior (CASTANON, 2007). Desde então, diversos trabalhos relatam melhoria na eficiência produtiva com o uso dos APCs em animais destinados à alimentação (GASKINS et al., 2002; NIEWOLD, 2006; PAGE, 2006; NIEWOLD, 2007).

Estima-se que a utilização de APCs na dieta de animais de produção, através de mecanismos inespecíficos e não completamente compreendidos, contribui para aumento de 5-6% no peso vivo e melhora de 3-4% na eficiência alimentar, com efeito mais pronunciado em animais jovens (BUTAYE et al., 2003).

2.1.1. Mecanismos de ação

O antibiótico pode ter efeito bactericida, quando destrói a bactéria, ou bacteriostático, quando inibe a sua proliferação. O bactericida pode atuar de três formas: i. Alterando a permeabilidade da membrana celular; ii. inibindo a síntese da parede celular; iii. inibindo a síntese de ácido nucléico. O antimicrobiano bacteriostático pode exercer sua função bloqueando vias metabólicas importantes ou através da inibição da síntese protéica (AMATO NETO et al., 2000).

2.1.2. Hipóteses para a ação dos APCs na promoção do crescimento animal

Pelo menos cinco mecanismos foram propostos para explicar o aumento no ganho de peso em resposta à suplementação com APCs (GASKINS et al., 2002; NIEWOLD, 2006; PAGE, 2006; NIEWOLD, 2007): i. inibição da infecção subclínica endêmica, reduzindo os custos metabólicos da resposta imune inata; ii. redução dos

metabólitos depressores do crescimento (como amônia e produtos de degradação da bile) produzidos por microrganismos Gram-positivos; iii. redução da utilização microbiana de nutrientes; iv. elevação da absorção e da utilização de nutrientes, porque a parede intestinal em animais alimentados com APC é mais fina; v. inibição da produção e da excreção de mediadores do catabolismo por células inflamatórias presentes no intestino, resultando em economia de energia para o crescimento.

As quatro primeiras hipóteses compartilham a pressuposição de que a microbiota intestinal reduz o crescimento do animal, tanto diretamente, como indiretamente, e que o mecanismo de ação do APC é baseado na sua propriedade antimicrobiana. Enquanto isso, a quinta hipótese considera que as alterações na microbiota com o uso dos APCs são secundárias à redução da inflamação, ou seja os autores sugerem que os APCs agem essencialmente na mucosa controlando a inflamação. A base para esta quinta hipótese reside no fato dos APCs serem utilizados em doses abaixo da dose inibitória mínima, de forma que sua ação direta na microbiota seria pouco provável (NIEWOLD, 2007).

2.1.3. Resistência bacteriana a antibióticos

A resistência aos antibióticos pode ocorrer em bactérias patogênicas e comensais, tanto *in vivo*, como no meio ambiente, podendo ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características fenotípicas naturais do micro-organismo e por isso é transmitida verticalmente. A resistência microbiana adquirida ocorre através de mutações espontâneas ou, mais comumente por aquisição de genes (transmissão horizontal).

Acredita-se que os mecanismos de transformação e conjugação sejam responsáveis pela distribuição rápida dos genes de resistência a antibióticos nas bactérias (CHEN et al., 2005). Além disso, a transferência horizontal de elementos genéticos móveis também contribui para a evolução dos patógenos emergentes através da disseminação de genes de resistência. Variados tipos de material genético, como os plasmídeos, transposons e integrons podem participar desta evolução (CARATTOLI, 2013). Outra forma de transferência de genes entre espécies bacterianas de táxons distintos é a transdução (transferência gênica mediada por bacteriófago) (MUNIESA et al., 2013).

A utilização de agentes antimicrobianos pode alterar a comunidade bacteriana em determinado local por eliminar cepas susceptíveis e permitir a multiplicação de

bactérias resistentes (O'BRIEN, 2002). Desta maneira, a utilização de APC na dieta pode alterar a microbiota intestinal e criar um ambiente favorável para o estabelecimento de bactérias resistentes e patogênicas. De fato, diversos estudos demonstraram a presença bactérias resistentes a antibióticos em frangos (*E. coli*, *Salmonella* serovars; *Enterococcus* spp, *C perfringens*) (DIARRA et al., 2007; DIARRASSOUBA et al., 2007; AGUNOS et al., 2012; ST. AMAND et al., 2013). Vários genes de resistência a antibiótico presentes nestas bactérias foram identificados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, permitindo sua disseminação entre bactérias tanto no intestino das aves, como no meio ambiente.

A utilização disseminada de antibióticos na medicina humana, na veterinária e em atividades agrícolas tem sido responsabilizada pela propagação dos mecanismos de resistência a antibióticos, sendo associada ainda à redução nas opções de tratamento e queda na eficácia terapêutica em pacientes humanos (DIARRA e MALOUIN, 2014).

Embora não se possa afirmar qual a parcela de responsabilidade do uso de APCs na difusão da resistência bacteriana, observa-se uma pressão social contrária a sua utilização. Na União Europeia, por exemplo, a comercialização e o uso de APCs foi banida oficialmente em 2007 (DIARRA e MALOUIN, 2014). Esta decisão política foi tomada com base no princípio da precaução: “Quando existe ameaça de sensível redução ou perda de diversidade biológica, a falta de plena certeza científica não deve ser usada como razão para postergar medidas para evitar ou minimizar esta ameaça” (Princípio 15 da declaração do rio de 1992), disponível no endereço eletrônico: <http://www.unep.org/Documents.Multilingual/Default.asp?DocumentID=78andArticleID=1163>. Além disso, em outros países como os EUA existe uma forte pressão da opinião pública para a criação de animais livres de APCs (DIBNER e RICHARDS., 2005; CASTANON, 2007).

2.1.4. Consequências da proibição da comercialização dos APCs em países europeus

A proibição da comercialização dos APCs na Europa promoveu redução na presença de genes de resistência em cepas de *Enterococcus* coletadas de fezes de animais de produção (VAN DEN BOGAARD et al., 2000; HAMMERUM et al., 2007). Contudo, segundo alguns autores, essa diminuição ocorreu ao custo da deterioração do bem estar dos animais (CASEWELL et al., 2003). Queda na produtividade também

pode ser verificada após o fim do uso dos APCs. Na Suécia, por exemplo, 16 anos após a retirada dos APCs, a perda em produtividade em suínos ainda não havia sido recuperada (WIERUP, 2001).

A Dinamarca foi um dos primeiros países a proibir o uso dos APCs, onde a medida foi acompanhada de piora da conversão alimentar na criação de frangos, evidenciada pelo aumento de 0,016 kg/kg na relação quantidade de ração utilizada até o abate / pelo peso vivo ao abate, entre 1995 a 1999 (EMBORG et al., 2002). Consequências ainda mais severas foram verificadas na indústria suína Dinamarquesa, onde houve queda no ganho de peso diário de 422 g em 1995 para 415 g por dia em 2001 e aumento de 2,7 para 3,5% na mortalidade no mesmo período (CALLESEN, 2003).

O aumento da incidência de infecções na criação animal, com a queda dos APCs, levou a um aumento substancial da utilização de antibióticos com a finalidade terapêutica (MUIRHEAD, 2002), que são idênticos aos utilizados na medicina humana, constituindo risco para o homem. A grande preocupação é a possibilidade da veiculação de agentes patogênicos contendo genes de resistência ao homem, como *Salmonella*, *Campylobacter* e cepas de *E. coli* causadoras de zoonose. Por outro lado, Wierup (2001) reportou que na Suécia, como resultado da retirada dos APCs, foco na prevenção de doenças e uso correto de antimicrobianos, o uso geral de antibióticos em animais reduziu 55% entre 1986 e 1999, bem como a prevalência de resistência a antibióticos foi relativamente baixa.

Castanon (2007) sugeriu que a retirada dos APCs demanda melhora nas condições de higiene das fazendas, visto que foi demonstrado que sob condições adequadas de criação é possível obter bons índices de produção de frangos, sem a necessidade da administração contínua de antibiótico na ração (WIERUP, 2001; ENGSTER et al., 2002). Além disso, segundo os mesmos autores (Castanon, 2007), atualmente dispomos de aditivos alternativos aos APCs que atuam na microbiota e são considerados seguros, como enzimas, prebióticos, probióticos e acidificantes e que poderiam contribuir na obtenção de resultados produtivos semelhantes aos dos APCs.

2.2. Alternativas aos APCs

Além de boas práticas de manejo visando a criação dos animais em condições de higiene adequada, a utilização de aditivos alternativos aos APCs pode contribuir

para a redução dos impactos advindos de sua descontinuidade (HUYGHEBAERT et al., 2011). Assim, ao longo das últimas décadas, a comunidade científica vem se mobilizando na busca por alternativas que possam assegurar os mesmos índices de desempenho e mortalidade da era dos APCs.

Diversas estratégias alternativas aos APCs estão sob investigação na produção animal, como ácidos orgânicos com atividade antimicrobiana, bacteriófagos, enzimas exógenas, ervas, pimentas e extratos de plantas, peptídeos antimicrobianos, prebióticos, probióticos, vacinação e imuno-estimulação através de peptídeos catiônicos, citocinas e bacteriocinas, entre outros (HUYGHEBAERT *et al.*, 2011; DIARRA e MALOUIN, 2014); No entanto, nenhuma destas novas abordagens foi sistematicamente implementada até o presente momento e o que mais se observa em criações comerciais é a utilização empírica das alternativas existentes. Na prática, a capacidade de melhorar o desempenho tem determinado a predileção dos produtores (HUYGHEBAERT et al., 2011), ainda que os mecanismos de ação destas substâncias não sejam totalmente compreendidos e que seus resultados careçam de reprodutibilidade.

Dentre os potenciais substitutos aos APCs, probióticos e OEs atuam por meio da modulação da microbiota intestinal, sendo associados à melhora da fisiologia intestinal e aumento do ganho de peso de frangos (JANG et al., 2007; BASMACIOĞLU MALAYOĞLU et al., 2010; WANG, Y. e GU, Q., 2010). Contudo, estes aditivos também têm gerado resultados inconsistentes, de forma que a investigação de sua interação com a microbiota e a mucosa intestinal pode auxiliar na compreensão de sua ação biológica no animal, possibilitando sua melhor utilização. Além disso, segundo Brenes e Roura (2010) a associação de OEs com outra classe de aditivo, como ácidos orgânicos, probióticos, entre outros, deve ser encorajada na busca de eventuais efeitos sinérgicos.

2.2.1. Probióticos

2.2.1.1. Definição e características dos probióticos

Probióticos são definidos como culturas individuais ou mistas de microrganismos viáveis usados como aditivos, que trazem benefícios ao hospedeiro por promover a melhoria do equilíbrio intestinal (FULLER, 1989). As espécies bacterianas dos probióticos podem ser classificadas em colonizadoras, como

Lactobacillus e *Enterococcus* spp, e não colonizadoras, como *Bacillus* spp (esporos) e *Saccharomyces cerevisiae*. O princípio de ação dos probióticos baseia-se em dois mecanismos básicos, a exclusão competitiva e a imunomodulação. A exclusão competitiva envolve a competição por substrato, a produção de metabólitos antimicrobianos que inibem patógenos, e a competição por sítios de ligação (YANG et al., 2009). O mecanismo de ação varia de acordo com a cepa de probiótico, podendo ocorrer pela produção de metabólitos específicos (ácidos graxos de cadeia curta, H₂O₂ ou metabólitos com propriedade antimicrobiana), interação com receptores, estimulação do sistema imune, e outros (MADSEN et al., 2001; SHERMAN et al., 2009).

2.2.1.2. Efeitos dos probióticos

Alguns trabalhos relatam melhoria do desempenho e da saúde de frangos de corte alimentados com probiótico (KALAVATHY et al., 2008; AWAD et al., 2009). Estes resultados têm sido atribuídos à manipulação da microbiota intestinal, que inclusive pode levar a inibição de patógenos intestinais (ROLFE, 2000). De fato, aumento e manutenção da microbiota benéfica do intestino foi verificada com a utilização de *Lactobacillus* spp., *Pediococcus penttosaceus* e *Bacillus* spp como probiótico em frangos (TEO E TAN, 2005). No mesmo estudo, as cepas demonstraram atividade antimicrobiana contra *C. perfringens* (TEO e TAN, 2005). Estudos seguintes comprovaram a capacidade do *Bacillus subtilis* PB6, isolado do intestino de aves normais, controlar a enterite necrótica induzida experimentalmente, associada com melhora da saúde intestinal (DE SMET e VERLEYEN, 2010).

Probióticos também podem atuar sobre o epitélio intestinal. Aumento na altura das vilosidades foi verificado no íleo de galos reprodutores pesados após a alimentação com dieta contendo *Bacillus subtilis* var. *natto* (SAMANYA e YAMAUCHI, 2002). Melhora na função digestiva de frangos alimentados com dieta contendo probióticos também foi reportada (WANG e GU, 2010). No estudo em questão, houve melhora na atividade de protease e de amilase presentes no conteúdo intestinal de frangos de corte alimentados com dieta contendo *Bacillus coagulans* (WANG e GU, 2010). Por outro lado, a suplementação com *Enterococcus faecium* não alterou a expressão e a atividade de enzimas digestivas da borda em escova de leitões (MARTIN et al., 2012).

Apesar de investigações do transporte epitelial em resposta a suplementação com probióticos em frangos não serem de nosso conhecimento, existem relatos de que a absorção de glicose no intestino pode ser favorecida com o uso de probióticos em mamíferos. O tratamento oral de ratos com *Saccharomyces boulardii* promoveu acentuada estimulação da absorção de D-glicose na membrana borda em escova de enterócitos, com aumento associado no co-transportador de Na⁺ D-glicose (SGLT-1), medido por triagem radiográfica da proteína (BUTS e BERNASCONI, 2005). Além disso, a administração de *B. thetaiotaomicron* em camundongos aumentou a expressão de algumas proteínas importantes para a absorção de nutrientes, incluindo o co-transportador Na⁺/glicose e a proteína de ligação de ácidos graxos (HOOPER e GORDON, 2001).

2.2.2. Óleos essenciais

2.2.2.1. Definição e características dos OEs

Óleos essenciais (OEs) são substâncias extraídas de ervas e especiarias, que formam uma mistura complexa de vários compostos fitoquímicos, como carvacrol, timol, cinnamaldeído, entre outros, com propriedade seletiva sobre a microbiota (LEE et al., 2003) e com capacidade de melhorar o desempenho animal em sistemas intensivos de produção (WILLIAMS e LOSA, 2001). Os compostos ativos dos OEs são obtidos de partes de plantas por destilação por arraste de vapor d'água e ou por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (FERREIRA, 2010), sendo que sua nomenclatura é determinada pela planta que o originou.

Os OEs são denominados como óleo devido a sua característica lipofílica, no entanto eles não possuem composição glicerídica como os verdadeiros óleos e gorduras (SIANI et al., 2000).

Os compostos biologicamente ativos das plantas são na maioria metabólitos secundários, lipofílicos, líquidos ou voláteis, que pertencem aos grupos químicos dos terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos, esteróides, etc), fenóis (taninos), glicosídeos e alcalóides (álcoois, aldeídos cetonas, ésteres, éteres, lactonas, etc.). A composição pode variar devido a fatores biológicos (espécie de planta, local de plantio e condições de colheita), de produção (extração, destilação e estabilidade) e também pelas condições de armazenamento (luz, temperatura, tensão de oxigênio e tempo de estocagem) (HUYGHEBAERT et al., 2011). Assim, o grande desafio em se trabalhar

com esta classe de aditivos consiste na padronização, uma vez que muitos fatores podem interferir em sua composição e conseqüentemente na função do produto no organismo do animal.

2.2.2.2. Efeitos dos OEs

Óleos essenciais podem ter mais de uma ação, incluindo aumento do consumo de ração e da palatabilidade, estimulação da secreção de enzimas digestivas, aumento das motilidades gástrica e intestinal, estimulação endócrina, atividade antibacteriana, atividade antiviral, atividade anti-helmíntica, atividade coccidiostática, estimulação da resposta imune, atividade antiinflamatória e antioxidante e ação pigmentante (BASMACIOĞLU MALAYOĞLU et al., 2010).

Devido a um possível sinergismo entre os constituintes dos óleos essenciais, e por se tratar de uma classe de aditivos relativamente nova, muito ainda precisa ser estudado para se compreender o papel de cada constituinte no organismo dos animais. Ainda não se sabe com certeza, por exemplo, qual constituinte estimula as enzimas endógenas, atua como oxidante, é agente antimicrobiano, ou imunomodulador (HUYGHEBAERT et al., 2011).

Acredita-se que os óleos essenciais melhoram o desempenho zootécnico dos frangos de corte (LEE et al., 2003; CIFTCI et al., 2005; ISABEL e SANTOS, 2009) atuando na microbiota intestinal. Timol e carvacrol, componentes principais dos óleos essenciais derivados do tomilho e do orégano, demonstraram propriedades antimicrobiana, antioxidante e anti-séptica *in vitro* (LEE e AHN, 1998). Efeitos similares foram demonstrados *in vivo* (JANG et al., 2007). Ademais, dados da literatura sobre a dose inibitória mínima dos OEs sugerem que sua ação antimicrobiana varia de acordo com a planta de origem (PENALVER et al., 2005; FU et al., 2007; BARBOSA et al., 2009). Adams (1999) classificou a atividade antimicrobiana de OEs extraídos de diversas plantas como fraca (gengibre e pimenta), média [cominho (p-cimeno), coentro (linalol), orégano (carvacrol), alecrim (cineol), sálvia (cineol) e tomilho (timol)] e forte [cravo (eugenol), mostarda (alil-isotiocianato), canela (cinamaldeído) e alho (alicina)].

Além de influenciarem a microbiota intestinal óleos essenciais podem atuar sobre o epitélio intestinal. Melhora da morfometria intestinal com o uso de óleos essenciais foi relatada em aves (DEMIR et al., 2003). Estudos também relataram melhora na função digestiva de frangos alimentados com dieta contendo óleos

essenciais (LEE et al., 2003; JANG et al., 2007; BASMACIOĞLU MALAYOĞLU et al., 2010). A suplementação com uma mistura comercial de óleo essencial (50 mg OE/kg da dieta) aumentou a atividade de amilase pancreática e de maltase intestinal em relação à dieta basal (JANG et al., 2007). A inclusão de um produto comercial de óleo essencial, em dois níveis (250 mg OE/ kg e 500 mg OE/kg), elevou a atividade intestinal de quimiotripsina e a digestibilidade protéica (BASMACHIOĞLU MALAYOĞLU et al., 2010).

Resultados conflitantes do efeito de óleos essenciais no transporte de nutrientes na mucosa intestinal foram obtidos em modelos com infusão dos nutrientes *in vitro*. Kreydiyyeh et al. (2003) demonstraram, por modelo de perfusão intestinal *in vitro* com glicose marcada (^{14}C), que a adição de 0,05% de óleo essencial de anis aumentou significativamente a absorção jejunal de glicose em ratos, o que coincidiu com a estimulação da atividade da ATPase $\text{Na}^+ \text{K}^+$. Por outro lado, observou-se por técnica eletrofisiológica *in vitro*, que timol e cinnamaldeído (1 mmol/L) reduziram a corrente de curto-circuito basal (ISC) em soluções contendo glicose ou L-alanina, indicando menor absorção destes nutrientes, o que foi atribuído à inibição da atividade da ATPase $\text{Na}^+ \text{K}^+$ (MICHIELS et al., 2010).

2.3. A microbiota intestinal

A vida do homem e dos animais está estritamente relacionada com os microrganismos, sendo que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na sua saúde e bem-estar, bem como na produtividade dos animais (CALLAWAY et al., 2008). Na produção animal, a busca por aditivos alternativos aos APCs tem focado naqueles com capacidade de alterar favoravelmente a microbiota intestinal. Tais estudos baseiam-se no papel fundamental exercido pela microbiota intestinal nas funções fisiológica, imunológica do hospedeiro que impactam diretamente em seu desempenho (VISPO e KARASOV, 1997)

A colonização do trato gastrointestinal por bactérias comensais traz uma série de benefícios ao animal. Animais detentores de microbiota comensal possuem maior atividade de enzimas digestivas, geração de nutrientes (por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos e vitaminas), bem como menor colonização por bactérias indesejáveis do que os SPF (“specific pathogen free”) (WILLING e VAN KESSEL, 2009). Além disso, a microbiota pode afetar a morfometria da parede

intestinal e induzir as reações imunes adaptativa e inata, que podem afetar o gasto energético do animal (HUMPHREY e KLASING, 2004; TEIRLYNCK et al., 2009).

Ácidos graxos de cadeia curta (lactato, proprionato e butirato) são produzidos por bactérias no intestino, a partir de carboidratos não digeridos ou fibra, podendo ser utilizados como fonte de energia. Essa produção é afetada pela dieta do animal (KARAKI et al., 2006). De maneira semelhante, a microbiota em associação com a dieta, afeta a produção de aminas bioativas no intestino (WILLING e VAN KESSEL, 2009). Estas substâncias, que são produzidas na luz intestinal por microorganismos a partir da descarboxilação de aminoácidos, podem ter ação mitogênica (ALLISON e MACFARLANE, 1989).

Algumas bactérias da microbiota normal também podem exercer um efeito deletério no desempenho dos animais, principalmente pela competição de nutrientes com o hospedeiro e pela produção de enzimas que afetam a integridade da mucosa intestinal (OVIEDO-RONDÓN, 2009). Contudo tais efeitos deletérios podem ser compensados pelo controle que eles exercem na colonização de microorganismos patogênicos (ITO et al., 2004). De fato, a microbiota microbiana normal impede a colonização de patógenos através da competição por sítios de ligação na mucosa e pela produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas (OVIEDO-RONDÓN, 2009).

2.3.1. O estudo da microbiota intestinal

Tradicionalmente, a análise da microbiota intestinal foi realizada pela cultura de microorganismos *in vitro*. Apesar destes métodos terem contribuído para a maior parte do conhecimento da microbiota intestinal até aqui, apresentam limitações importantes. A principal delas é que a grande maioria das bactérias intestinais não pode ser cultivada em laboratório devido à falta de conhecimento dos métodos bioquímicos necessários para sua multiplicação *in vitro*. Além disso, as bactérias pertencentes a uma comunidade estão relacionadas entre si e com seu meio, de maneira que o cultivo dos microorganismos em meio artificial não reproduz seu habitat natural (APAJALAHTI et al., 2004). Portanto, a real diversidade da microbiota não pode ser estudada com acurácia com estes métodos tradicionais, uma vez que apenas 1% de toda a microbiota é capaz de crescer em meios bioquímicos (HUGENHOLTZ et al., 1998).

As técnicas moleculares permitiram um conhecimento muito mais amplo da ecologia microbiana do que as estratégias baseadas no isolamento e multiplicação em meios de cultura (AMANN et al., 1995; APAJALAHTI et al., 2004; BJERRUM et al.,

2006). Estas técnicas baseiam-se na comparação de sequências de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), e permitem a formação de um esquema de classificação (OVIEDO-RONDÓN, 2009). A princípio, sequências iniciadoras de nucleotídeos podem ser desenhadas para hibridizar com uma sequência complementar alvo e gerar uma descrição completa da presença deste alvo no meio, sem a necessidade da multiplicação bacteriana (OVIEDO-RONDÓN, 2009). Assim, para se fazer estudos de identificação ou quantificação da comunidade microbiana em determinado meio, não se faz necessário o sequenciamento do DNA genômico total de uma bactéria, que é um processo demorado e complexo.

Um importante avanço na área de ecologia microbiana foi o uso da subunidade 16S do DNA ribossomal (16S DNAr), que pode ser utilizada por diferentes técnicas moleculares para identificar e quantificar microrganismos (AMANN et al., 1995). O 16S DNAr está entre as moléculas mais conservadas em todos os sistemas vivos, já que não possui transferência entre espécies, e também possui regiões variáveis e tamanho apropriados para análises de filogenia (cerca de 1500 pares de base) (AMANN et al., 1995; PEREIRA, 2003). Atualmente existe um vasto banco de dados de sequências do gene 16S DNAr, de forma que este marcador é o mais utilizado em estudos metagenômicos 16S DNAr (HEILIG et al., 2002; BARTOSCH et al., 2004; RINTTILÄ et al., 2004).

Os métodos moleculares para o estudo da ecologia microbiana podem ser classificados em duas classes gerais: análises baseadas em compilação e análises da comunidade total (HOLBEN et al., 2004). Os métodos baseados em compilação muitas vezes envolvem uma análise aleatória ("shotgun"), onde sequências de genes funcionais ou ribossomais de 100 a 300 indivíduos da população são amplificados por PCR e clonados para gerar perfis filogenéticos ou comparados com os bancos de dados existentes. Estas técnicas provaram ser bastante sensíveis, contudo possuem capacidade limitada para detectar com precisão a variabilidade total da comunidade microbiana, especialmente em sistemas complexos como o solo e o trato gastrointestinal, pois organismos pouco abundantes podem passar despercebidos (HOLBEN et al., 2004).

Análises da comunidade total caracterizam a estrutura da população total através da análise direta do DNA total da população, gerando abundâncias relativas de bases de DNA. Diversos métodos foram desenvolvidos nesta classe, como o monitoramento da cinética de recombinação do DNA, análise de restrição de

fragmentos de PCR da comunidade total como o T-RFLP “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”, eletroforese em gel desnaturante (DGGE) de “amplicons” da comunidade, e fracionamento do DNA total da comunidade com base no teor de G + C (OVIEDO-RONDÓN, 2009). O T-RFLP, por exemplo, baseia-se na fragmentação do DNA de uma comunidade por enzimas de restrição, gerando fragmentos de tamanho característicos para cada espécie presente, resultando na “impressão digital” desta comunidade (GONG et al., 2002). Bandas específicas de interesse que tenham diferido entre tratamentos, podem ser excisadas do gel, clonadas em vetor e sequenciadas para revelar informação do táxon, por exemplo (OVIEDO-RONDÓN, 2009). Embora essas abordagens analisem a comunidade total, incluindo populações minoritárias, elas geralmente não fornecem identificação de boa resolução das populações presentes no meio e também não analisam com exatidão populações pouco presentes (OVIEDO-RONDÓN, 2009).

Até recentemente, todos dados de sequenciamento do 16S DNAr reportados eram obtidos através da tecnologia de sequenciamento Sanger. Devido a restrições de custo, a maioria dos estudos produziam poucas sequências, assim revelavam apenas uma pequena porção da diversidade total do meio estudado (WEI et al., 2013). As tecnologias de sequenciamento em larga escala “next generation sequencing” possibilitaram o sequenciamento de bilhões de bases em tempo reduzido e a custos viáveis, sendo que atualmente genomas múltiplos de bactérias podem ser sequenciados em questão de dias (KWON e RICKE, 2011); A introdução dessa tecnologia tem contribuído muito para a ampliação do conhecimento da diversidade bacteriana em diversos ecossistemas, inclusive da microbiota gastrintestinal de aves (WEI et al., 2013).

Embora as técnicas de sequenciamento em larga escala sejam consideradas as melhores ferramentas para se avaliar a diversidade de comunidades bacterianas complexas atualmente, especialmente no que concerne a táxons raros, elas não são as ideais para a quantificação (KWON e RICKE, 2011). A melhor forma de se quantificar membros específicos da comunidade ao longo do tempo, espaço, ou diferentes condições ambientais (KWON e RICKE, 2011) consiste na técnica de PCR em tempo real (qPCR), a qual fornece valores absolutos, específicos, rápidos e altamente sensíveis do número de cópias do alvo desejado (YU et al., 2005; RITALAHTI et al., 2006). Além disso, atualmente existem nucleotídeos iniciadores universais para o gene 16S DNAr, validados biologicamente para amplificar o DNA de

grupos de bactérias, como *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, entre outros (HEILIG et al., 2002; BARTOSCH et al., 2004; RINTTILÄ et al., 2004).

2.3.2. A composição da microbiota de frangos em situações normais e em algumas situações específicas

O primeiro passo no estudo de um ecossistema consiste na identificação de seus membros, em seguida relaciona-se sua presença com sua atividade, e finalmente traça-se o papel que cada organismo desempenha no estabelecimento e na manutenção do equilíbrio naquele local (OVIEDO-RONDÓN, 2009). Atualmente, pesquisas relacionadas com a criação animal concentram seus esforços na identificação da microbiota intestinal normal e como ela é alterada em circunstâncias específicas.

A microbiota do trato gastrintestinal das aves é extremamente complexa e dinâmica, contendo aproximadamente 10^{11} UFC/g de conteúdo intestinal, de um número desconhecido de espécies bacterianas (ITO et al., 2004). O desenvolvimento da microbiota inicia-se tão logo as aves eclodem. Entre 2 e 4 dias após a eclosão cepas de *Enterobacteria* e *Streptococcus* são predominantes no intestino delgado, perdendo esta condição para os *Lactobacillus* em seguida até a vida adulta. No ceco, microrganismos anaeróbios como *Bacteroides*, *Bifidobacteria* e *Escherichia coli* prevaescem (AMIT-ROMACH et al., 2004). Em animais adultos bactérias Gram-positivas predominam, sendo que 90% da microbiota é constituída de bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido láctico (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus sp.*), e os 10% restantes compostos por bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, como *Blastomyces spp.*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, entre outros (LEE et al., 2002).

A avaliação da microbiota associada à mucosa do intestino delgado de frangos por análise de sequencias do gene 16S DNAr revelou que o gênero *Lactobacillus* ocorre em superioridade, predominando as espécies de *Lactobacillus aviarius* e *Lactobacillus salivarius* (GONG et al., 2007). Dados recentes de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a prevalência do grupo *Enterococcus* diminui em todo intestino delgado dos 7 aos 42 dias, enquanto a do grupo *Lactobacillus* aumenta (LUNEDO et al., 2014). No mesmo trabalho houve aumento do número de cópias de *Enterobacteriaceae* na mucosa do íleo entre 7 e 42 dias em animais alimentados com

milho, porém a contagem manteve-se em níveis mais baixos nas aves alimentadas com sorgo (LUNEDO et al., 2014).

De acordo com Dibner e Richards (2005) muitos produtos são vendidos atualmente (APCs, ácidos orgânicos, probióticos, prebióticos, minerais, óleos essenciais, entre outros) com a finalidade de modular a microbiota para beneficiar a saúde e o desempenho dos animais, contudo a literatura carece de trabalhos de identificação e quantificação da microbiota nestas condições. Estudos moleculares recentes da avaliação microbiota intestinal de aves frente ao uso de aditivos na dieta são focados, em sua maioria, nas alterações induzidas pelos APCs. WISE e SIRAGUSA (2007) comparando animais alimentados com e sem APCs observaram que as populações de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* são as de maior ocorrência no íleo, seguidas por membros do grupo *Enterococcus*, sendo que o número de cópias de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* foi menor com a adição de APC. KIM et al. (2011), trabalhando com avilamicina e os prebióticos FOS e MOS, concluíram que o antibiótico foi mais efetivo na diminuição do número de cópias de *Escherichia coli* e *Clostridium*, mas proporcionou menor diversidade de cepas de *Lactobacillus* em comparação aos prebióticos.

A partir destes resultados, é visível que estratégias nutricionais envolvendo aditivos possuem um grande potencial como modeladores da microbiota intestinal, e que mais estudos são necessários para que se possa otimizar sua utilização na nutrição animal.

2.4. Alterações na mucosa intestinal

Aditivos alimentares como os óleos essenciais e os probióticos têm apresentado resultados favoráveis no epitélio intestinal, inclusive capacidade de promover a integridade da mucosa intestinal em situações de desafio, como a coccidiose (DALLOUL et al., 2003; OVIEDO-RONDON et al., 2006). Contudo, ainda não está estabelecido se tais achados envolve a modulação da microbiota intestinal ou os eventos que atuam na estimulação direta do crescimento dos vilos.

A microbiota intestinal pode alterar diretamente o epitélio intestinal. Por exemplo, nutrientes produzidos pela microbiota intestinal, como ácidos graxos de cadeia curta e aminas biogênicas podem promover o desenvolvimento da mucosa intestinal da ave através da estimulação do processo mitótico que leva ao aumento dos vilos (MAIORKA et al., 2002; LOPES, 2008). Por outro lado, a amônia hidrolisada

por bactérias produtoras de urease a partir de ácido úrico no intestino demonstrou ser tóxica para as vilosidades intestinais, além de reduzir a síntese de DNA na mucosa gástrica (WARZECHA et al., 2000) e a proliferação celular (RABKIN et al., 1993).

Aumento na altura das vilosidades promovem melhorias nas funções de digestão e absorção intestinal, devido a elevações na área de superfície absorptiva e na expressão de enzimas e transportadores de membrana (PLUSKE et al., 1996). Por outro lado, criptas mais profundas indicam elevado “turnover” no epitélio intestinal e alta demanda para formação tecidual, sendo que tal elevação do “turnover” eleva o requerimento nutricional para a manutenção (SAVAGE et al., 1997) e compromete parte da energia líquida de produção.

Acredita-se que a atividade de enzimas de membrana esteja mais relacionada com a área superficial, do que ao aumento da eficiência de células individuais (GILBERT, 2008). A altura das vilosidades é determinada pelo equilíbrio entre dois eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação das células localizadas na cripta e ao longo dos vilos) e perda celular (extrusão que ocorre normalmente no ápice dos vilos). Quando o intestino responde a algum agente que perturbe este “turnover”, ocorre uma modificação na altura dos vilos. Assim, se ocorrer um aumento na taxa de proliferação (mitose) com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, haverá aumento no número de células e, conseqüentemente, aumento na altura dos vilos. Caso o estímulo promova aumento na taxa de extrusão, havendo manutenção ou diminuição da taxa de proliferação, haverá redução na altura dos vilos (UNI et al., 1996).

Além de sofrer influência das alterações inespecíficas, relacionadas com mudanças na área de mucosa intestinal, a fisiologia da digestão e absorção intestinal está sujeita a alterações específicas. As alterações específicas são particularmente importantes no processo absorptivo. FERRARIS e DIAMOND (1989) propuseram a regulação específica da absorção de nutrientes como uma forma de igualar absorção aos requerimentos para o crescimento, sem que haja gasto de energia com outros transportadores. PÁCHA (2000) sugeriu várias explicações para alterações da atividade específica de transportadores com a idade. De acordo com os autores a redução no transporte pode ocorrer por diminuição na densidade de transportadores, alteração da isoforma predominante e alteração na taxa de “turnover”. Os mesmos autores concluíram que a queda de atividade com a idade está relacionada com o aumento de células imaturas e menos ativas ao longo dos vilos.

Ainda é desconhecido se a regulação de enzimas digestivas e transportadores de membrana ocorre pela indução de células imaturas, indiferenciadas, ou se células maduras são reprogramadas, mas aparentemente cada transportador pode ser regulado de forma particular (FERRARIS, 2001). Baseados nos achados de vários estudos, os autores propuseram um modelo para a regulação dos transportadores SGLT1 e GLUT5. Para SGLT1, a transcrição inicia-se nas células da cripta e durante a migração dos enterócitos ao longo do vilão ocorre a produção e migração da proteína para a membrana celular (FERRARIS, 2001). Enquanto isso, para GLUT5, evidências apontam que a célula madura pode ser reprogramada a transcrever RNAm e produzir a respectiva proteína (FERRARIS, 2001). Desta forma, a regulação por substrato para os dois transportadores leva tempos distintos, 4-8 horas para GLUT5 contra 12-24 horas para SGLT1 (FERRARIS, 2001).

Além da regulação com a idade e em resposta ao substrato, a atividade de determinado transportador pode ser estimulada pela sua falta no organismo. Aumento na expressão e na atividade de transportadores de nutrientes por mg de tecido foi correlacionado a menor disponibilidade do substrato no lúmen intestinal (FERRARIS e CAREY, 2000). Os autores sugeriram que provavelmente o aumento do número de transportadores ocorreu pelo aumento na expressão gênica associado ao aumento de enterócitos maduros e mais ativos devido a mudanças na taxa de migração (FERRARIS e CAREY, 2000).

Frente ao exposto, é evidente que os processos de digestão e absorção podem ser influenciados de muitas maneiras. Conforme discutido anteriormente, existem evidências de que os OEs e os probióticos podem afetar a mucosa intestinal e o aproveitamento de nutrientes. Uma alternativa para melhorar o entendimento de sua ação na fisiologia intestinal consiste no estudo da expressão de genes codificadores de enzimas e transportadores intestinais, bem como suas atividades enzimáticas.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de utilização do *Bacillus subtilis* (probiótico) e de uma mistura comercial de óleos essenciais, isoladamente ou em conjunto, como

promotores de crescimento para frangos de corte e investigar a influência desses aditivos na mucosa e na microbiota intestinal.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da avilamicina e do uso isolado ou associado do *Bacillus subtilis* (probiótico) e uma mistura de óleos essenciais sobre:

- O desempenho zootécnico [Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA)] aos 7, 21 e 42 dias de vida;
- A expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na digestão e absorção de nutrientes (*APN*, *SI*, *MGA*, *SLC15A1*, *SLC2A2*, *SLC5A1* e *ATP1A1*) no jejuno aos 7, 21 e 42 dias de vida;
- A atividade de enzimas digestivas da fase de membrana (aminopeptidase e maltase) no jejuno aos 7, 21 e 42 dias de vida;
- A absorção de glicose *in vitro* a partir de segmentos do jejuno coletados aos 7, 21 e 42 dias de vida;
- A prevalência de grupos bacterianos específicos na mucosa do íleo (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*) aos 7, 21 e 42 dias de vida;
- A morfometria intestinal [altura de vilos (AV), profundidade de criptas (PC), relação vilo / cripta (AV/PC)] e contagem de células caliciformes (CCC) aos 7, 21 e 42 dias de vida.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. A. **Nutricines: food components in health and nutrition**. Nottingham University Press, 1999.

AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 12, p. 1289, 2012.

ALLISON, C.; MACFARLANE, G. T. Influence of pH, nutrient availability, and growth rate on amine production by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens*. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 11, p. 2894-2898, 1989.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

AMATO NETO, V. et al. Antibióticos na prática médica. In: (Ed.). **Antibióticos na prática médica**: Roca, 2000.

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, 2004.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 02, p. 223-232, 2004.

AWAD, W. et al. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 1, p. 49-56, 2009.

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 6, p. 725-728, 2009.

BARTOSCH, S. et al. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3575-3581, 2004.

BASMACIOĞLU MALAYOĞLU, H. et al. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat–soybean meal diets. **British Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 67-80, 2010.

BJERRUM, L. et al. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1151-1164, 2006.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1, p. 1-14, 2010.

BURCH, D. **Anticipated effects of the withdrawal of antibiotic growth promoters (AGPs) from pigs in the European Union on 1st January 2006.**

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-+, 2003.

BUTS, J.-P.; BERNASCONI, P. < i> Saccharomyces boulardii</i>: Basic Science and Clinical Applications in Gastroenterology. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 34, n. 3, p. 515-532, 2005.

CALLAWAY, T. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 02, p. 217-225, 2008

CALLESEN, J. Effects of termination of AGP use on pig welfare and productivity. **Beyond Antimicrobial Growth Promoters in Food Animal Production**, p. 43, 2003.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 6-7, p. 298-304, Aug 2013.

CASEWELL, M. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 159-161, 2003.

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, Nov 2007.

CHEN, I.; CHRISTIE, P. J.; DUBNAU, D. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. **Science**, v. 310, n. 5753, p. 1456-60, Dec 2 2005.

CIFTCI, M. et al. The Effect of Anise Oil (*Pimpinella anisum* L.) On Broiler Performance. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 11, p. 851-855, 2005.

DALLOUL, R. et al. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. **Poultry Science**, v. 82, n. 1, p. 62-66, 2003.

DE ARAUJO, J. A. et al. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 3, p. 69-77, 2007.

DE SMET, S.; VERLEYEN, T. Prevent the proliferation of Clostridial enteritis. **World Poult.(Special supplement on Necrotic Enteritis)**, p. 8-9, 2010.

DEMIR, E. et al. The use of natural feed additives as alternatives for an antibiotic growth promoter in broiler diets. **British Poultry Science**, v. 44, n. S1, p. 44-45, 2003.

DIARRA, M. S.; MALOUIN, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. 5, p. 282, 2014.

DIARRA, M. S. et al. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6566-6576, 2007.

DIARRASSOUBA, F. et al. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. **Journal of Food Protection®**, v. 70, n. 6, p. 1316-1327, 2007.

DIBNER, J.; RICHARDS, J. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poult Sci**, v. 84, n. 4, p. 634-43, Apr 2005.

EMBORG, H.-D. et al. Effects of termination of antimicrobial growth promoter use for broiler health and productivity. **Beyond Antimicrobial Growth Promoters in Food Animal Production**, p. 38, 2002.

ENGSTER, H. M.; MARVIL, D.; STEWART-BROWN, B. The effect of withdrawing growth promoting antibiotics from broiler chickens: A long-term commercial industry study. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 431-436, 2002.

FERRARIS, R. P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. **BIOCHEMICAL JOURNAL-LONDON**, v. 360, n. 2, p. 265-276, 2001.

FERRARIS, R. P.; CAREY, H. V. Intestinal transport during fasting and malnutrition. **Annual review of nutrition**, v. 20, n. 1, p. 195-219, 2000.

FERRARIS, R. P.; DIAMOND, J. M. Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. **Annual Review of Physiology**, v. 51, n. 1, p. 125-141, 1989.

FERREIRA, F. G. **Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson em camundongos, por via inalatória.** 2010. 51 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 989-994, 2007.

FULLER, R. Probiotic in man and animals: A rev. **J. Appl. Bacteriol**, v. 90, p. 3453-352, 1989.

GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B. Antibiotics as growth promotants: Mode of action. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 29-42, 2002.

GILBERT, E. R. **Dietary and developmental regulation of nutrient transporter gene expression in the small intestine of two lines of broilers.** 2008. Virginia Polytechnic Institute and State University.

GONG, J. et al. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS microbiology letters**, v. 208, n. 1, p. 1-7, 2002.

GONG, J. et al. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 59, n. 1, p. 147-57, Jan 2007.

HAMMERUM, A. M. et al. Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 11, p. 1633, 2007.

HEILIG, H. G. et al. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 1, p. 114-123, 2002.

HOLBEN, W. E. et al. GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2263-2270, 2004.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1115-1118, 2001.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998.

HUMPHREY, B.; KLASING, K. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 01, p. 90-100, 2004.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. V. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 182-188, 2011.

IMMERSEEL, F. V. et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.

ISABEL, B.; SANTOS, Y. Effects of dietary organic acids and essential oils on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 3, p. 472-476, 2009.

ITO, N. et al. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. **Produção de frangos de corte**, p. 206-260, 2004.

JANG, I.S.; KO, Y.H.; KANG, S.Y.; LEE, C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n. 3, p. 304-315, 2007.

KALAVATHY, R. et al. Effect of *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline on the growth performance and serum lipids of chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 4, p. 385-389, 2008.

KARAKI, S.-I. et al. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. **Cell and tissue research**, v. 324, n. 3, p. 353-360, 2006.

KIM, G.-B. et al. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry science**, v. 90, n. 1, p. 75-82, 2011.

KWON, Y. M.; RICKE, S. C. **High-throughput Next Generation Sequencing**. Springer, 2011.

LEE, H.-S.; AHN, Y.-J. Growth-inhibiting effects of Cinnamomum cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 1, p. 8-12, 1998.

LEE, K. W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H. J.; FREHNER, M.; LOSAB R.; BEYNEN A. C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British poultry science**, v. 44, n. 3, p. 450-457, 2003.

LEE, M. et al. Microbial dynamics of the broiler intestinal tract. The Elanco Global Enteritis Symposium, 2002. p.A3-A8.

LOPES, K. L. D. A. M. **Suplementação de glutamina em dietas iniciais para frangos de corte**. 2008. Universidade Federal de Goiás

LUNEDO, R. et al. Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize-or sorghum-fed broiler chickens using real-time PCR. **British poultry science**, n. just-accepted, 2014.

MADSEN, K. et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v. 121, n. 3, p. 580-591, 2001.

MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Campinas: FACTA, Fundação Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas, p. 113-124, 2002.

MARTIN, L.; PIEPER, R.; KRÖGER, S.; GOODARZI BOROOJENI, S.; VAHJEN, W.; NEUMANN, K.; VAN KESSEL, A.G.; ZENTEK, J. Influence of age and *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 on development of small intestinal digestive physiology in piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 175, n. 1, p. 65-75, 2012.

MICHIELS, J. et al. Thymol and *trans*-cinnamaldehyde reduce active nutrient absorption and chloride secretion in the pig jejunal Ussing chamber model. **Livestock Science**, v. 134, n. 1, p. 27-29, 2010.

MUIRHEAD, S. Therapeutic use of antibiotics on rise in Denmark. **Feedstuffs**, v. 74, p. 1-5, 2002.

MUNIESA, M.; COLOMER-LLUCH, M.; JOFRE, J. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. **Future Microbiol**, v. 8, n. 6, p. 739-51, Jun 2013.

NIEWOLD, T. Intestinal genomics for evaluation of alternatives for AGP, current situation and perspectives. **Antimicrobial Growth Promoters: Where do we go from here**, p. 361-368, 2006.

NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poult Sci**, v. 86, n. 4, p. 605-9, Apr 2007.

O'BRIEN, T. F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. Supplement 3, p. S78-S84, 2002.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SPE, p. 209-225, 2009.

OVIEDO-RONDON, E. O. et al. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. **Poult Sci**, v. 85, n. 5, p. 854-60, May 2006.

PÁCHA, J. Development of intestinal transport function in mammals. **Physiological reviews**, v. 80, n. 4, p. 1633-1667, 2000.

PAGE, S. Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: the benefits 19. 2006.

PENALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. **Apmis**, v. 113, n. 1, p. 1-6, 2005.

PEREIRA, R. M. Diversidade bacteriana de um Latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica. **Diversidade bacteriana de um Latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**, 2003.

PLUSKE, J. R. et al. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. **Br J Nutr**, v. 76, n. 3, p. 409-22, Sep 1996.

RABKIN, R.; PALATHUMPAT, M.; TSAO, T. Ammonium chloride alters renal tubular cell growth and protein turnover. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 68, n. 4, p. 427-438, 1993.

RINTTILÄ, T. et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1166-1177, 2004.

RITALAHTI, K. M. et al. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2765-2774, 2006.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 396S-402S, 2000.

SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K.-E. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 95-104, 2002.

SAVAGE, T.; ZAKRZEWSKA, E.; ANDREASEN, J. R. The effects of feeding mannan oligosaccharide supplemented diets to poults on performance and the morphology of the small intestine. **Poult Sci**, v. 76, n. Suppl 1, p. 139, 1997.

SHERMAN, P. M.; OSSA, J. C.; JOHNSON-HENRY, K. Unraveling mechanisms of action of probiotics. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 24, n. 1, p. 10-14, 2009.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SMITH, D. et al. Assessing risks for a pre-emergent pathogen: virginiamycin use and the emergence of streptogramin resistance in *Enterococcus faecium*. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 4, p. 241-249, 2003.

ST. AMAND, J. A. et al. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from poultry in Alberta. **Avian Pathology**, v. 42, n. 4, p. 379-386, 2013. ISSN 0307-9457.

TEIRLYNCK, E. et al. The cereal type in feed influences gut wall morphology and intestinal immune cell infiltration in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 10, p. 1453-1461, 2009. ISSN 1475-2662.

TEO, A. Y.-L.; TAN, H.-M. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4185-4190, 2005.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Development of the small intestine in heavy and light strain chicks before and after hatching. **British Poultry Science**, v. 37, n. 1, p. 63-71, 1996.

VAN DEN BOGAARD, A.; BRUINSMA, N.; STOBBERINGH, E. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 146-148, 2000.

VISPO, C.; KARASOV, W. H. The interaction of avian gut microbes and their host: an elusive symbiosis. In: (Ed.). **Gastrointestinal microbiology**: Springer, 1997. p.116-155.

WANG, Y.; GU, Q. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. **Research in veterinary science**, v. 89, n. 2, p. 163-167, 2010.

WARZECHA, Z. et al. Gastroprotective effect of histamine and acid secretion on ammonia-induced gastric lesions in rats. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 35, n. 9, p. 916-924, 2000.

WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. **Poultry science**, v. 92, n. 3, p. 671-683, 2013.

WIERUP, M. The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 2, p. 183-190, 2001.

WILLIAMS, P.; LOSA, R. The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. **World Poult**, v. 17, n. 4, p. 14-15, 2001.

WILLING, B.; VAN KESSEL, A. Intestinal microbiota differentially affect brush border enzyme activity and gene expression in the neonatal gnotobiotic pig. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 93, n. 5, p. 586-595, 2009.

WISE, M. G.; SIRAGUSA, G. R. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. **J Appl Microbiol**, v. 102, n. 4, p. 1138-49, Apr 2007.

YANG, Y.; IJI, P.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poultry Science Journal**, v. 65, n. 01, p. 97-114, 2009.

YU, Y. et al. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 670-679, 2005..

CAPÍTULO 2 – ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS INTESTINAIS EM FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM *Bacillus subtilis* E/OU ÓLEOS ESSENCIAIS: EXPRESSÃO GÊNICA, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ABSORÇÃO DE GLICOSE

RESUMO – *Bacillus subtilis* e óleos essenciais (OEs) têm sido investigados como substitutos à antibióticos promotores de crescimento (APC), demonstrando capacidade de melhorar o desempenho zootécnico de frangos. Ambos têm apresentado efeitos favoráveis sobre: digestibilidade de nutrientes, integridade das vilosidades, atividade de enzimas digestivas e absorção de nutrientes. No entanto, o assunto ainda carece de estudos, visto que os resultados descritos na literatura carecem de reprodutibilidade. O presente estudo investigou os efeitos da avilamicina ou da adição isolada ou combinada de *Bacillus subtilis* e de uma mistura de OEs (carvacrol, cinamaldeído, cineol e extrato de pimenta) no desempenho, bem como sobre aspectos celulares e moleculares no intestino ao longo do ciclo produtivo de frangos de corte criados em boas condições sanitárias. A expressão de genes e enzimas estudados e os dados do ensaio de absorção *in vitro* de glicose também foram avaliados em função do tempo. Para tanto, 1320 frangos foram distribuídos em cinco tratamentos, de acordo com a suplementação [dieta basal como controle (CON); *Bacillus subtilis* (BS); *Bacillus-subtilis* + óleos essenciais (BS + OEs); óleos essenciais (OEs); avilamicina como controle positivo (AVI)]. O desempenho foi avaliado no período de um a 42 dias, enquanto a quantidade de RNAm, as atividades enzimáticas e a absorção *in vitro* foram analisados aos 7, 21 e 42 dias. A quantidade de RNAm(s) de *ANPEP*, *MGAM*, *SI*, *SLC15A1*, *SLC5A1*, *SLC2A2*, *ATP1A1* foi avaliada por RT-qPCR e as atividades de aminopeptidase-N (APN), maltase (MALT) e fosfatase alcalina intestinal (FAI) determinadas em termos específicos. O ensaio de absorção *in vitro* consistiu-se da análise da área abaixo da curva de concentração de glicose de amostras colhidas do interior do segmento em intervalos específicos a partir da injeção de uma solução de glicose 5 %. Os tratamentos não influenciaram o desempenho zootécnico das aves. BS promoveu maior expressão do gene *SLC15A1*, enquanto OEs e AVI aumentaram as atividades de FAI e APN. A análise ao longo do tempo revelou aumento na quantidade de RNAm de *MGAM*, *SLC2A2*, *SLC15A1*, *SLC5A1* e *SI* de 7 para 42 dias. FAI sofreu redução após 7 dias, enquanto MALT aumentou com a idade. A adição de *Bacillus subtilis* ou óleos essenciais na ração induz alterações na expressão de genes e atividade de enzimas relacionados ao aproveitamento de açúcares e peptídeos, porém não promove melhora no desempenho zootécnico. Durante o desenvolvimento, o intestino do frango sofre alterações específicas que podem ser levadas em conta para a formulação de dietas que melhor se adequem ao perfil de enzimas e transportadores de nutrientes expressados no intestino ao longo do tempo.

Palavras-chave: aditivos alimentares, digestão, enzimas de membrana intestinal, fisiologia intestinal, nutrição, transporte intestinal de nutrientes

CHAPTER 2 – INTESTINAL PHYSIOLOGICAL CHANGES IN BROILERS FED *Bacillus subtilis* AND/OR ESSENTIAL OIL THROUGHOUT THE PRODUCTION CYCLE: MORPHOMETRY, GENE EXPRESSION AND ENZYME ACTIVITY

ABSTRACT – *Bacillus subtilis* and essential oils (EOs) have been investigated as replacements for antibiotic growth promoters (AGPs) by improving the performance of chickens. Both feed additives have demonstrated favorable effects on nutrient digestibility, villus integrity, activity of digestive enzymes and absorption of nutrients. However, studies still required, since results described in the literature have scarce reproducibility. This research investigated the effects of avilamycin, or *Bacillus subtilis* DFM and an EO blend (carvacrol, cinnamaldehyde, cineol and pepper extract) alone or together on performance, as well as cellular and molecular changes in the small intestine over the time course of growing-finishing of broilers raised in good sanitary conditions. The data of gene expression, enzyme activity and *in vitro* glucose uptake were also evaluated over the time course. Therefore, 1320 broiler chickens were divided among five treatments, according to supplementation [basal diet as control (CON); *Bacillus subtilis* (BS); *Bacillus subtilis* + essential oils (BS + EOs); essential oils (EOs); avilamycin as positive control (AVI)]. Performance was evaluated between 1-42 days, while mRNA quantities, enzyme activities and *in vitro* glucose uptake assay were analyzed at 7, 21 and 42 days. Abundance of *ANPEP*, *MGAM*, *SI*, *SLC15A1*, *SLC5A1*, *SLC2A2*, *ATP1A1* mRNA was assayed by RT-qPCR and aminopeptidase-N (APN), maltase (MALT) and intestinal alkaline phosphatase (IAP) determined in specific terms. The *in vitro* uptake assay consisted on the analysis of the area under the curve of glucose concentration from samples taken over the segment at specific intervals after an original injection of glucose 5% solution. Performance was not influenced by treatments. BS promoted greater expression of *SLC15A1*, while EOs and AVI increased the activities of both IAP and APN. Analysis over time revealed an increase in the amount of mRNA *MGAM*, *SLC2A2*, *SLC15A1*, *SLC5A1* and *SI* from seven to 42 days. IAP was reduced after seven days, while MALT increased with age. Addition of *Bacillus subtilis* or essential oils in the diet induces changes in the expression of genes and activities of enzymes related to sugars and peptides utilization, but did not improve growth performance. During development, the chicken intestine undergoes specific changes that can be taken into account in the formulation of diets that best fits the profile of enzymes and nutrient transporters expressed in the intestine over time.

Keywords: brush border enzymes, digestion, feed additives, intestinal transport, intestinal physiology, nutrition

I INTRODUÇÃO

Antibióticos promotores de crescimento (APCs) foram amplamente usados na indústria avícola para melhorar a saúde intestinal das aves (DIBNER e RICHARDS, 2005), e conseqüentemente o seu desempenho zootécnico. No entanto, devido a preocupações com a saúde pública, segurança alimentar e com o meio ambiente (DIARRA e MALOUIN, 2014), há uma tendência global para a criação de frangos de corte com base em dietas livre de APCs. Dentre as alternativas, probióticos e óleos essenciais (OEs) têm sido investigados como potenciais substitutos aos APCs, devido a melhora da fisiologia intestinal e aumento do ganho de peso de frangos (JANG et al., 2007; BASMACIOĞLU MALAYOĞLU et al., 2010; WANG e GU, 2010). *Bacillus subtilis* é uma bactéria anaeróbia facultativa que não pertence a microbiota intestinal normal de galinhas, mas que é capaz de se multiplicar no intestino (CLEMENTS et al., 2002). OEs são extraídos de ervas e especiarias, sendo formados por uma mistura de compostos fitoquímicos como carvacrol, timol e cinamaldeído.

O modo de ação dos APCs, *Bacillus subtilis* e OEs ainda não é totalmente compreendido, mas há um consenso de que todos têm propriedades seletivas sobre a microbiota, conferindo proteção contra patógenos intestinais (LEE et al., 2003; BRENES e ROURA, 2010; VILÀ et al., 2010). Considera-se que o mecanismo de ação dos probióticos seja através de um processo conhecido como exclusão competitiva, onde as bactérias benéficas previnem a colonização do intestino de bactérias potencialmente prejudiciais, resultando em equilíbrio da microbiota intestinal e melhora no desempenho dos animais (VILÀ et al., 2010). A ação dos OEs nos animais parece estar relacionada, principalmente, às suas propriedades antimicrobianas, embora funções antioxidante e anti-inflamatória também foram descritas (BRENES e ROURA, 2010).

Efeitos adicionais de probióticos e OEs na digestibilidade de nutrientes, integridade das vilosidades, atividade de enzimas digestivas e absorção nutrientes também foram relatados (KIEN et al., 2007; WINDISCH et al., 2008; MURUGESAN; GABLER e PERSIA, 2014; MURUGESAN; ROMERO e PERSIA, 2014). Por outro lado, outros dados não têm suportado qualquer benefício destes aditivos no desempenho (LEE et al., 2003; MARTIN et al., 2012), na morfometria intestinal (WINDISCH et al., 2008;

MARTIN et al., 2012) e na utilização de nutrientes (LEE et al., 2003; MARTIN et al., 2012).

Tem sido proposto que a contribuição dos probióticos e OEs para o desempenho está relacionada com a presença de patógenos, de maneira que a criação de aves em condições de higiene inadequadas é recomendada na avaliação de substitutos aos APCs (GIANNENAS et al., 2013; MURUGESAN; GABLER e PERSIA, 2014). Lotes criados em condições sanitárias precárias, sobre cama reutilizada, podem apresentar infecções subclínicas que comprometem a saúde intestinal e aumentam o gasto de energia a partir da ativação contínua da resposta imune de fase aguda, resultando em queda no desempenho (KLASING e JOHNSTONE, 1991). Assim, a recomendação de aumentar a carga patogênica intestinal na avaliação dos aditivos é baseada em suas propriedades profiláticas contra doenças bacterianas, presumivelmente, a partir da promoção do equilíbrio intestinal, ou da modulação da imunidade do hospedeiro, ou ambos (BRENES e ROURA, 2010; GIANNENAS et al., 2013; MURUGESAN; GABLER e PERSIA, 2014).

A compreensão do modo de ação dos aditivos alimentares é essencial para elucidar as contradições relatadas na literatura e otimizar sua utilização a partir da manipulação da dieta para um melhor aproveitamento dos nutrientes. No entanto, eventuais alterações intestinais induzidas pelo probiótico ou OEs podem ser mascaradas na presença de desafio sanitário, já que nestas circunstâncias as comunidades microbianas do intestino são alteradas, a resposta imune é desencadeada e a integridade da mucosa intestinal pode ser comprometida (KLASING e JOHNSTONE, 1991; NIEWOLD, 2007). Assim, isolando-se o efeito de uma alta carga patogênica ambiental, pode-se ter acesso ao efeito direto de qualquer alteração fisiológica no desempenho após a suplementação com *Bacillus subtilis* e OEs. Portanto, a compreensão do papel do *Bacillus subtilis* e dos OEs na fisiologia do intestino e sua contribuição para o desempenho, quando aves são criados em condições sanitárias adequadas, é essencial para otimizar sua utilização e também para gerar um parâmetro para estudos adicionais simulando o ambiente comercial.

Além disso, a maioria dos experimentos que avaliou o desenvolvimento da função digestiva em frangos concentrou seus esforços nas primeiras duas semanas de vida (UNI et al., 2003; GILBERT et al., 2007). Consequentemente, o estudo do perfil de expressão de genes relacionados à digestão e absorção membranosa de carboidratos e proteínas, e suas respectivas funções poderia contribuir para a otimização do uso

de nutrientes a partir da manipulação da dieta durante as distintas fases do ciclo de produção.

No presente estudo foram investigados os efeitos da adição do APC avilamicina ou de *Bacillus subtilis* e OEs (carvacrol, cinamaldeído, cineol e pimenta extrato) isolados ou associados no desempenho, bem como sobre aspectos celulares e moleculares no intestino ao longo do ciclo produtivo de frangos de corte criados em boas condições sanitárias. Parâmetros intestinais foram investigados através da expressão de genes que codificam enzimas digestivas e transportadores, suas atividades bioquímicas, bem como pela morfometria intestinal e um ensaio de absorção *in vitro*. A expressão de genes e enzimas estudados e os dados do ensaio de absorção *in vitro* de glicose também foram avaliados em função do tempo.

II MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O experimento foi conduzido no aviário experimental do Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, SP.

2.2. Animais, dieta e manejo

Foram utilizados 1320 frangos de corte machos da linhagem Cobb-500[®], obtidos de um incubatório comercial. Os pintainhos foram distribuídos em cinco tratamentos, com seis repetições de 44 aves cada, em um delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos constituíram-se de 5 dietas distintas: i. dieta basal como controle (CON); ii. *Bacillus subtilis* (BS); iii. *Bacillus-subtilis* + óleos essenciais (BS + OEs); iv. óleos essenciais (OEs); v. avilamicina como controle positivo (AVI). Nas dietas ii, iii, iv e v os aditivos foram adicionados à dieta basal em substituição ao inerte (caolim). As aves foram submetidas a duas fases de criação: inicial (1 a 21 dias de idade) e crescimento (22 a 42 dias), sendo que em cada fase a ração foi formulada à base de milho e farelo de soja para atender as exigências nutricionais das aves, de acordo com Rostagno et al. (2011) (Tabela 1). Além disso, a ração formulada em todo período experimental foi livre de qualquer tipo de anticoccidiano. As aves foram criadas em condição termoneutra, sob um programa de luz contínuo de 24 horas, em

um galpão experimental constituído de boxes de 2,50 m de comprimento por 1,50 m de largura, totalizando 3,75 m², forradas com cama de maravalha com aproximadamente 10 cm de altura.

Tabela 1. Composição das dietas inicial e final.

Ingredientes (%)	Inicial 1 a 21 dias	Crescimento 22 a 42 dias
Milho	55,451	61,297
Farelo de soja 45%	37,216	30,809
Óleo de soja	3,202	4,375
Fosfato Bicálcico	1,669	1,235
Calcário calcítico	0,934	0,844
Sal comum	0,490	0,452
DL - Metionina	0,325	0,279
L - Lisina – HCL	0,243	0,240
Suplemento Mineral e Vitamínico ¹	0,400	0,400
Antioxidante	0,010	0,010
Avilamicina ²
Óleos essenciais ³
<i>Bacillus subtilis</i> ⁴
Caolim (inerte)	0,060	0,060
Total	100,000	100,000

Valores calculados

Energia Metabolizável, (kcal/kg)	3,020	3,174
Proteína Bruta, (%)	21,600	19,133
Lisina Digestível, (%)	1,253	1,097
Metionina Digestível, (%)	0,609	0,536
Metionina + Cistina Digestível, (%)	0,902	0,801
Triptofano Digestível, (%)	0,244	0,209
Cálcio, (%)	0,867	0,713
Fósforo Disponível, (%)	0,424	0,333
Sódio (%)	0,213	0,198

¹Frangos/FOCUS premix mineral e vitamínico fornecido pela Agrocerec Multimix. Níveis de garantia do produto (por kg de premix): Vitamina A 2.000.000,00 UI; vitamina D3 600.000,00 UI; vitamina E 3.000,00 UI; vitamina K3 500,00 mg; vitamina B1 600,00 mg; vitamina B2 1500,00 mg; vitamina B6 1000,00 mg; vitamina B12 3.500,00 mcg; Niacina 10,00 g; ácido pantotênico 3.750,00 mg; ácido fólico 250,00 mg; colina 86,60 g; ferro 12,50 g; manganês. 17,50 g; zinco 12,50 g; cobre 25,00 g ; iodo 300,00 mg; selenio 50,00 mg.

²Surmax-200® fornecido pela Eli Lilly. A adição de Surmax-200 em substituição ao caolim (inerte) proporcionou 0,01 g de atividade de avilamicina por kg da dieta.

³Activo® foi fornecido pela GRASP. Activo foi padicionado em substituição ao caolim (inerte) na proporção de 0,125 g por kg da dieta.

⁴Biotop® foi fornecido pela FATEC. A adição de Biotop em substituição ao caolim (inerte) proporcionou 5,0 x 10⁸ UFC por kg da dieta.

2.3. Desempenho

O desempenho das aves foi avaliado pelo peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar aos 7, 21 e 42 dias de idade. O ganho de peso foi determinado através da diferença entre o peso das aves no início e no final de cada período. O consumo de ração foi determinado pela diferença entre as pesagens da ração fornecida e a sobra nos comedouros das unidades experimentais, sendo que a mortalidade das aves foi considerada para o cálculo. A conversão alimentar foi determinada pela relação entre o ganho de peso e o consumo de ração de cada parcela.

2.4. Coleta de amostras

Aos 7, 21 e 42 dias uma ave por parcela (seis aves por tratamento) foi abatida por deslocamento cervical, após jejum alimentar de oito horas, para as análises de atividade enzimática e de expressão gênica de membrana intestinal. Amostras de aproximadamente 20 centímetros do jejuno (correspondendo à porção do intestino delgado posterior a alça duodenal e anterior ao divertículo de Meckel) foram abertas longitudinalmente, grampeadas pelas extremidades sobre papelão, sendo a mucosa lavada com solução salina tamponada (pH 7,4) a 4° C. Então, a mucosa foi raspada com uma lâmina metálica esterilizada e o material obtido foi acondicionado em microtubos estéreis, livres de Rnase, congelado em nitrogênio líquido e conservado em freezer a – 70°C para o processamento laboratorial.

Nas mesmas idades, outra ave de cada repetição (seis aves por tratamento) foi abatida por deslocamento cervical, após jejum alimentar de oito horas, para a obtenção dos segmentos do jejuno para o ensaio de absorção de glicose *in vitro*. Em seguida, o jejuno de cada ave foi isolado, e medido. Os segmentos foram lavados com solução de PBS (salina tamponada com pH 7,4) e uma das extremidades foi amarrada com fio para o início do ensaio.

2.5. Avaliação da expressão dos genes relacionados à digestão (APN, SI e MGA) e absorção dos nutrientes (*SLC15A1*, *SLC2A2*, *SLC5A1* e *ATP1A1*) pela técnica de PCR em tempo real (qPCR)

2.5.1. Extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNA total

A extração do RNA total de mucosa intestinal foi realizada utilizando-se o Kit AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit[®] da Axygen. Aproximadamente 50 mg do tecido foi pulverizado em almofariz contendo nitrogênio líquido. Após maceração, duas alíquotas de 20 mg de material foram transferidas para um tubo estéril de 1,5 mL, e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente mantidas em freezer -70°C até o início da extração de RNA. Uma alíquota de 20 mg de cada parcela experimental foi utilizada na extração de RNA conforme o protocolo do fabricante. O protocolo em questão sofreu apenas uma alteração, que consistiu na adição de um tratamento com DNase, para eliminar os fragmentos de DNA, entre as duas lavagens que antecedem a eluição do RNA presente na coluna cerâmica. Para tanto, a coluna foi incubada por 30 minutos a 37°C com uma solução composta por 20 µL da enzima RQ1 – “RNase-free” DNase (Prodimol, 1U/µL), 8 µL de 10 x “reaction buffer” (Prodimol) e 52 µL de água DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato).

O RNA extraído foi quantificado através do Qubit[®] da life Technologies. O mesmo equipamento foi utilizado para a quantificação de DNA e proteína das amostras para se avaliar a pureza da extração.

A integridade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,5%), observando-se a presença das bandas de RNA ribossomal (18S e 28S), bem como através do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), o qual realiza uma eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida a laser para fornecer um índice de integridade do RNA (RIN).

2.5.2. Gene normalizador para PCR em tempo real

Os alvos escolhidos como candidatos a gene normalizador foram os genes GAPDH (Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase), β -actina e HPRT1 (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) conforme Hoque et al. (2007). Tais genes são constitutivos e não devem ter sua expressão variando na célula entre tecidos diferentes em condições variadas. As taxas de expressão destes genes foram analisadas com os “softwares geNormplus” (<http://www.biogazelle.com/genormplus>),

e NormFinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>), figuras 1 e 2, respectivamente.

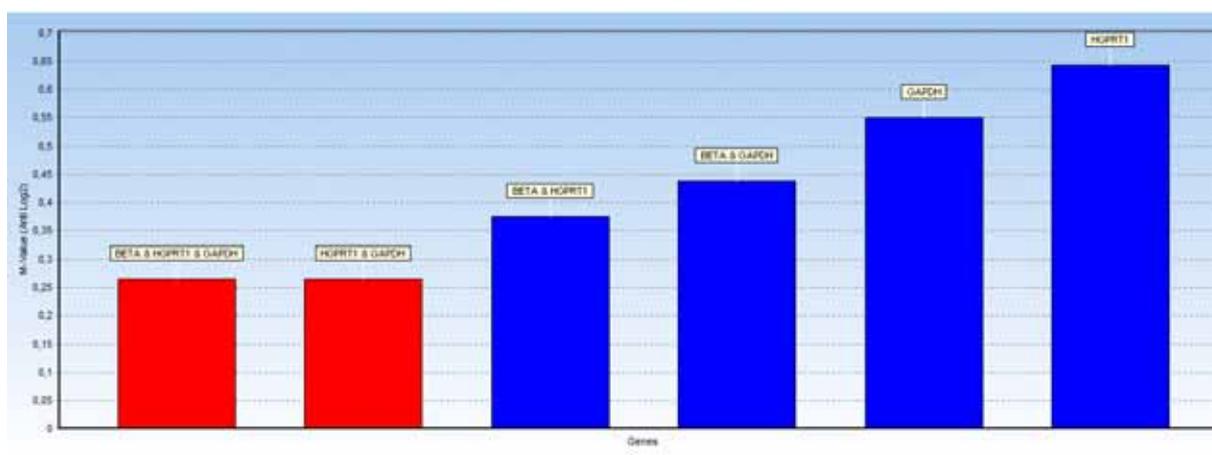


Figura 1. Estabilidade dos 3 genes candidatos a gene normalizador segundo o programa Genorm considerando todo o período experimental. O gene com o menor valor de variabilidade é o de menor interferência experimental (GAPDH). O eixo Y reflete os valores de M (“M-value”), onde os valores mais baixos indicam uma expressão mais estável.

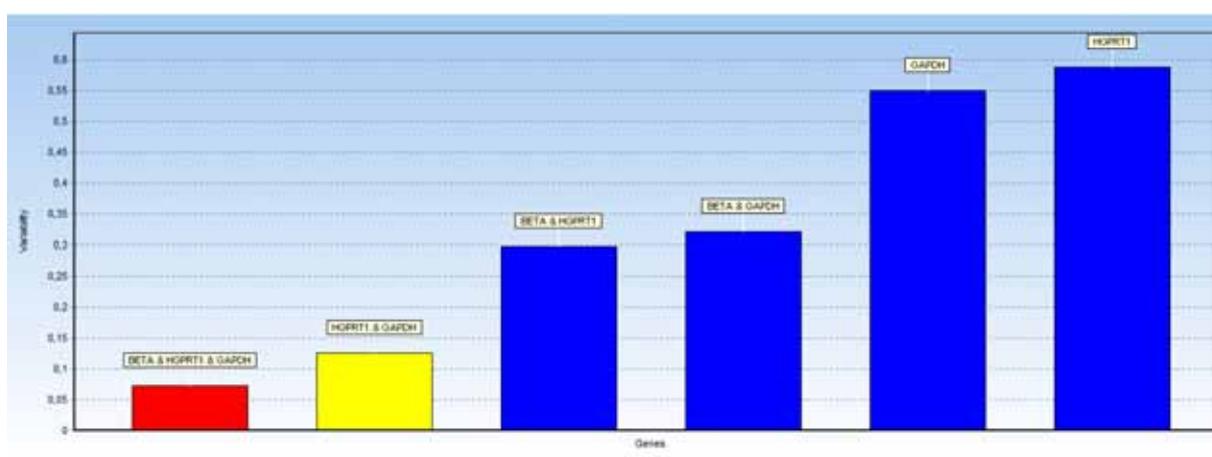


Figura 2. Estabilidade dos 3 genes candidatos a gene normalizador segundo o programa Normfinder considerando todo o período experimental. O gene com o menor valor de variabilidade é o de menor interferência experimental (GAPDH). O eixo Y reflete os valores de M (“M-value”), onde os valores mais baixos indicam uma expressão mais estável.

Além disso, os parâmetros de covariância dos três genes normalizadores e suas possíveis combinações foram analisados pelo procedimento PROC MIXED do SAS (INSTITUTE, 2011), de forma que a combinação GAPDH, β -actina e HPRT1 apresentou uma das menores variações entre tratamentos e idades em cada uma das idades estudadas, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da análise com modelo linear misto com os componentes de variância para cada gene aos 7, 21 e 42 dias de idade.

	ACTB	HPRT1	GAPDH	ACTB& HPRT1	ACTB& GAPDH	HPRT1 & GAPDH	ACTB& GAPDH & HPRT1
	7 dias						
p-value ANOVA	0,32	0,55	0,50	0,40	0,48	0,51	0,49
Variância repetições	0,07	0,05	0,14	0,06	0,06	0,04	0,04
Variância resíduos	0,64	0,49	0,55	0,49	0,53	0,39	0,44
	21 dias						
p-value ANOVA	0,61	0,93	0,45	0,66	0,86	0,90	0,85
Variância repetições	0,14	0,28	0,30	0,11	0,23	0,10	0,12
Variância resíduos	0,62	0,57	0,42	0,46	0,39	0,34	0,34
	42 dias						
p-value ANOVA	0,08	0,18	0,10	0,06	0,04	0,12	0,05
Variância repetições	0,28	0,13	0,34	0,18	0,09	0,11	0,08
Variância resíduos	0,36	0,36	0,29	0,28	0,25	0,30	0,25

ACTB= β -actina citoplasmática.

HPRT1 = hipoxantina fosforibosiltransferase 1

GAPDH = gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

2.5.3. Reação de transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real

A síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o Kit comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Life Technologies, USA), a partir de 5,0 µg de RNA total do jejuno e utilizando-se oligo (dT) como iniciador. Para tanto, foram adicionados em um microtubo específico para reações de PCR, 5 µg de RNA total, 1 µL de oligo (dT) 20 (50 µM), 1 µL de tampão de anelamento e água tratada com DEPC, para um volume final de 8 µL.

A reação de síntese do cDNA em termociclador (MJ Research, INC.), compreendeu uma desnaturação inicial de 65°C por 5 minutos, seguida de anelamento dos iniciadores a 20°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram mantidas no gelo, adicionando-se a cada reação 10 µL de 2X First-Strand Reaction Mix e 2 µL SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix. A reação prosseguiu com a extensão da fita a 50°C por 60 minutos, seguida de inativação da enzima a 80°C por 5 minutos.

Após essas etapas, as fitas molde de RNA foram removidas através de digestão com a enzima Ribonuclease H (1U), por 22 minutos a 37°C. A seguir, adicionou-se a cada amostra, 1 µL de EDTA (5M, pH 8,0) e 3 µL de água milli-Q autoclavada, seguindo-se de rápida centrifugação. As amostras foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL devidamente identificados. Para iniciar o processo de precipitação do cDNA, adicionou-se por reação 25 µL de água milli-Q autoclavada, 5 µL de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 125 µL de álcool etílico absoluto gelado. Após misturar lentamente com as mãos a reação, os tubos foram mantidos a -20°C “over night” (12 horas). No dia seguinte, as amostras foram submetidas à centrifugação por 20 minutos, a 4°C, a velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de álcool etílico 70% gelado. As amostras foram novamente submetidas à centrifugação por 6 minutos, a 4°C, a velocidade máxima, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi seco em bomba à vácuo por 10 minutos e resuspendido em 52 µL de água milli-Q autoclavada. Os cDNAs foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific), armazenados em freezer a -20°C para posterior realização do PCR em tempo real.

As reações de RT-qPCR utilizaram o reagente SYBR Green e foram realizadas em um aparelho GeneAmp 7900 (Applied Biosystems), seguindo-se o protocolo descrito por Coussens et al., (2003). Os “primers” utilizados nas reações de qPCR

foram elaborados com base nas seqüências de nucleotídeos dos genes descritas para galinhas no Genbank, utilizando-se o “software Primer Express 3.0” (Applied Biosystems) (Tabela 3). A especificidade desses “primers” foi avaliada *in silico*, utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os resultados das reações de RT-qPCR foram analisados com o software RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems) e os valores de Ct (threshold cycle) ou ciclo de quantificação (Cq) foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVARK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de RTq-PCR com os respectivos números de acesso no “Genbank” e descrição.

Gene	Nº de acesso “GenBank”	Descrição ou função do gene	Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3'), F/R
<i>ANPEP</i>	NM_204861.1	aminopeptidase N, enzima digestiva	TGGTTGAATGAGGGCTTTTGC/ GGTCGCCATCACCGTGTAC
<i>SI</i>	XM_422811.4	sacarase-isomaltase, enzima digestiva	GTGCTCCATGAGTTTGCACAAG/ CAGCGGGCATTGGGTAAGTA
<i>MGAM</i>	XM_423298.3	maltase-glicoamilase, enzima digestiva	GGGACCCAGATGACAAAAATCCAT/ CGAGTCTGAGAAAAACCCACAGAT
<i>SLC15A1</i>	NM_204365.1	transportador de oligopeptídeos 1	GACCAGCAGGGATCGAGATG/ CTGAATCTGCATAGCTCCAAAAGTC
<i>SLC5A1</i>	NM_001293240	transportador de glicose e galactose dependente de Na ⁺	AGGAGGAGAAACCCCGATGAAA/ TCTTTAGGCATCCTGGGTCTTC
<i>SLC2A2</i>	NM_207178.1	transportador de glicose galactose e frutose independente de Na ⁺	GGTCTGATGGGCATGTTAATCA/ GACATAACTCATCCAGGGGAAC
<i>ATP1A1</i>	NM_205521.1	transportador ATPase, Na ⁺ /K ⁺ , alfa 1 polipeptídeo	AAGATATTGCTGCTCGACTCAACA/ AATCAGAGCCCATGAACAACACATG
<i>ACTB</i>	NM_205518.1	β-actina citoplasmática	GAGAGAGAAAATTGTCCGTGACATC/ GCCATCTCCTGCTCGAAATC
<i>GAPDH</i>	NM_204305.1	gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	GTGCTGGCATTGCACCTGAAT/ TTGCTGTATCCAAAACCTCATTGTCA
<i>HPRT1</i>	NM_204848.1	hipoxantina fosforibosiltransferase 1	GCAGTACAATCCAAGATGGTGAA/ GCCGATATCCACACTTCGA

¹Primers designed by Primer Express software (Applied Biosystems)

2.6. Atividade de enzimas de membrana (fosfatase alcalina, aminopeptidase e maltase)

As vesículas de membrana da borda em escova (VMBE) foram preparadas conforme o método de Louvard et al. (1973). O fator de recuperação das VMBE foi calculado para a fosfatase alcalina intestinal como a razão entre a atividade enzimática específica final e a inicial. O fator de recuperação observado foi de 4,86.

A atividade de fosfatase alcalina intestinal foi determinada de acordo com Pizauro et al. (1995). A atividade da aminopeptidase foi determinada como descrito por Rueda et al. (2007), em meio de reação contendo 25 μL de vesículas da membrana intestinal "brush border", 250 μL de tampão 50mM imidazol, pH 7,5, e 125 μL de 1,6 mM L-leucine-p-nitroanilide (diluído em dimetilsulfóxido). Depois de 25 minutos de incubação a 41°C, a reação foi interrompida pela adição de 250 μL de ZnSO_4 (5% p/v). A atividade enzimática específica foi expressa como nmoles de p-nitroanilida produzidos por minuto por mg de proteína. Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como nmoles de p-nitroanilina liberados por minuto por mg de proteína (U/mg de proteína).

A atividade de maltase foi determinada através da dosagem de glicose liberada a partir da hidrólise de maltose. O substrato, diluído em tampão fosfato contendo EDTA foi adicionado ao extrato enzimático e este meio de reação foi incubado a 37°C por 25 minutos. A leitura foi feita a 500 nm. A unidade específica da maltase foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de maltose por mg de proteína do tecido estudado por minuto.

Todas as análises das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicatas. A quantidade de proteína presente no extrato bruto foi determinada através do equipamento Qubit® com o Kit específico para quantificação de proteína.

Não foi possível realizar a determinação das atividades de sacarase e de ATPase Na^+/K^+ inicialmente propostas devido ao fato de até o presente momento não se ter alcançado a padronização necessária para a condução destas análises.

2.7. Ensaio de Absorção de glicose *in vitro*

O lúmen do jejuno foi preenchido com uma solução de glicose a 5% e então a outra extremidade foi ligada com fio. Os intestinos foram mergulhados em um Becker com tampão de Krebs, a 37 °C e O_2 foi borbulhado suavemente na solução. Depois de 5 minutos uma solução de 300 μL da solução intraluminal foi colhida de cada

segmento do jejuno (100 ul de três diferentes porções) e colocadas em gelo. O jejuno foi devolvido ao Becker e amostras intraluminais subsequentes foram colhidas aos 15, 25, 35 e 45 minutos. A concentração de glicose nas amostras foi determinada por solução de Glicose PAP liquiform (Labtest, 500mL, cat. 84, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG). Foram utilizadas três determinações por amostra e as leituras de absorvância das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático (LABQUEST), com comprimento de onda apropriado. A análise estatística foi procedida pelo método da área abaixo da curva (AUC) a partir da curva obtida com as medições em série da concentração de glicose.

2.8. Análise estatística

Toda a análise foi conduzida usando o procedimento PROC MIXED do SAS (CARY, 2002). As análises de desempenho foram realizadas utilizando-se o método “one way ANOVA”, com efeito fixo de tratamento e ajustou-se o modelo para cada idade separadamente porque não estávamos interessados na análise ao longo do tempo para estas variáveis. Para todos os demais aspectos (expressão gênica, atividade enzimática e ensaio de absorção) ajustou-se um modelo linear misto “2-way mixed model” para considerar os efeitos da dieta, da idade e sua interação. Além disso, como todas as análises laboratoriais para estes aspectos foram bloqueadas, incluiu-se o bloco de análise laboratorial como efeito aleatório (repetição). A análise estatística seguiu o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + Re p_i + Trt_j + Id_k + TrtId_{jk} + e_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} é a observação referente ao bloco i, tratamento j e idade k;

μ é a média geral do experimento (efeito fixo);

Rep_i é o efeito aleatório do bloco i;

Trt_j é o efeito do tratamento j; efeito fixo, com 5 níveis de tratamento;

Id_k é o efeito da idade k; efeito fixo, com 3 níveis;

$TrtId_{JK}$ é o termo da interação;

e_{ijk} é o erro experimental;

Em todos os casos, avaliou-se a presença de interação entre tratamento e idade, em caso de interação significativa ($P < 0,05$), avaliou-se o efeito dos tratamentos

em cada idade, mas em caso de interação não significativa, desempenhou-se as comparações de efeito principal de dieta ou idade. Para as comparações entre tratamentos utilizou-se o teste de Dunnett na comparação dos tratamentos com o controle e para as comparações de idade utilizou-se a diferença mínima significativa protegida com base no teste-t da ANOVA.

III RESULTADOS

3.1. Desempenho zootécnico

Avaliou-se os efeitos da adição de *Bacillus subtilis* (BS), uma mistura de óleos essenciais (carvacrol, cinamaldeído, cineol e extrato de pimenta) (OEs) ou sua combinação no desempenho de frangos Cobb® até os 42 dias de idade. Não houve diferença entre as médias dos tratamentos e o controle ($P > 0,05$) para os parâmetros de desempenho avaliados (Tabela 4).

Tabela 4. Médias observadas e resultados da análise de variância para consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g) e conversão alimentar (CA, g/g) de frangos de corte (N=6) nos períodos de 1 a 7, 8 a 21, 1 a 21, 22 a 42 e 1 a 42 dias de idade.

	Tratamento					EPM
	CON	BS	BS+OEs	OEs	AVI	
1 a 7 dias						
CR (g)	138,17	137,50	136,83	135,67	140,67	3,20
GP (g)	124,83	122,50	128,83	126,33	129,17	2,81
CA	1,11	1,13	1,07	1,08	1,10	0,03
1 a 21 dias						
CR (g)	1196,67	1216,33	1203,83	1197,83	1169,50	10,79
GP (g)	923,00	927,00	913,83	924,50	905,33	6,70
CA	1,30	1,31	1,32	1,29	1,30	0,01
1 a 42 dias						
CR (g)	4893,17	4955,00	4921,50	4972,33	4895,00	42,58
GP (g)	3199,33	3239,00	3179,83	3202,50	3173,83	29,68
CA	1,53	1,53	1,55	1,55	1,54	0,01
8 a 21 dias						
CR (g)	1092,17	1113,67	1105,83	1099,50	1072,50	9,71
GP (g)	798,33	804,33	784,67	798,50	776,17	7,56
CA	1,37	1,39	1,41	1,38	1,38	0,01
22 a 42 dias						
CR (g)	3787,33	3863,67	3802,67	3866,50	3765,50	42,48
GP (g)	2276,00	2311,83	2266,00	2278,17	2268,50	28,86
CA	1,66	1,67	1,68	1,70	1,66	0,01

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina.

EPM = erro padrão da média.

CR = consumo de ração.

GP = ganho de peso.

CA = conversão alimentar.

3.2. Expressão Gênica

Determinou-se a quantidade relativa de RNA mensageiro (RNAm) de genes codificadores de enzimas digestivas da borda em escova “brush border”, transportadores de peptídeos e monossacarídeos em frangos alimentados com diferentes aditivos alimentares por PCR em tempo real (qPCR) pelo método da quantificação relativa (RT-qPCR). Efeito principal de tratamento (P=0,01) foi observado para a expressão de *SLC15A1* (Tabela 5), com maior expressão nas aves BS que no grupo CON (Figura 3).

Tabela 5. Resultados da análise de variância da expressão dos genes estudados através de um modelo linear misto.

Efeitos	GL	Valores de P						
		<i>ANPEP</i>	<i>ATP1A1</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>MGAM</i>	<i>SLC15A1</i>	<i>SLC5A1</i>	<i>SI</i>
Tratamento	4	0,32	0,07	0,89	0,21	0,01	0,54	0,55
Idade	2	0,77	0,01	0,01	<,0001	0,001	0,0002	<,0001
Interação	8	0,12	0,04	0,09	0,01	0,87	0,46	0,62

Os valores de P representam a soma de quadrados do tipo III.

Efeito significativo encontra-se destacado em negrito.

GL = graus de liberdade.

ANPEP = gene codificador da aminopeptidase N.

ATP1A1 = gene codificador do transportador ATPase, Na⁺/K⁺.

SLC2A2 = gene codificador do transportador de glicose galactose e frutose independente de Na⁺.

MGAM = gene codificador da maltase-glicoamilase.

SLC15A1 = gene codificador do transportador de oligopeptídeos 1.

SLC5A1 = gene codificador do transportador de glicose e galactose dependente de Na⁺.

SI = gene codificador da sacarase-isomaltase.

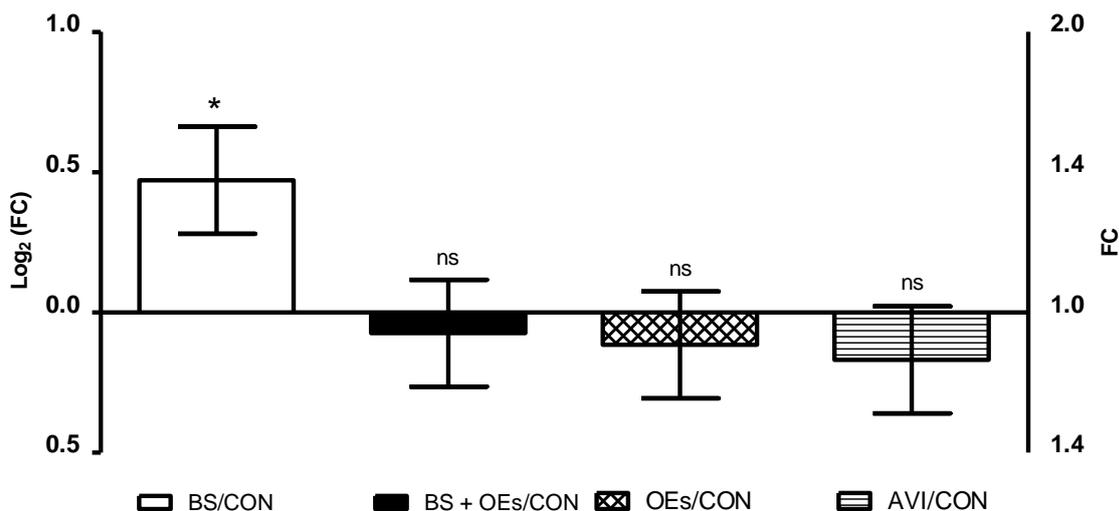


Figura 3. Expressão do gene *SLC15A1* nos diferentes tratamentos em relação ao controle (CON) durante todo período experimental.

A abscissa refere-se ao \log_2 “fold-changes” para os contrastes indicados pela legenda. A escala de “Fold-change” (FC) foi incluída no eixo da direita. Houve efeito principal da dieta ($P < 0,05$).

* indica diferença significativa pelo teste Dunnet ($p < 0,05$).

ns = não significativo.

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina.

SLC15A1 = gene codificador do transportador de oligopeptídeos 1.

As expressões de *ATP1A1* e *MGAM* variaram ao longo do tempo de acordo com a dieta, conforme indicado pela interação significativa ($P < 0,05$) (Tabela 5). Os tratamentos OEs e BS + OEs apresentaram quantidades reduzidas de RNAm de *MGAM* em relação as aves do tratamento CON ($P < 0,05$), respectivamente, no dia 7 e nos dias 7 e 21 (Figura 4). Aos 21 dias, a quantidade de RNAm de *MGAM* das aves que receberam BS + OEs foi quase a metade da observada no tratamento CON. Na mesma idade, a expressão gênica de *ATP1A1* nas aves suplementadas com BS + OEs foi reduzida em comparação ao grupo CON ($P < 0,05$) (Figura 4).

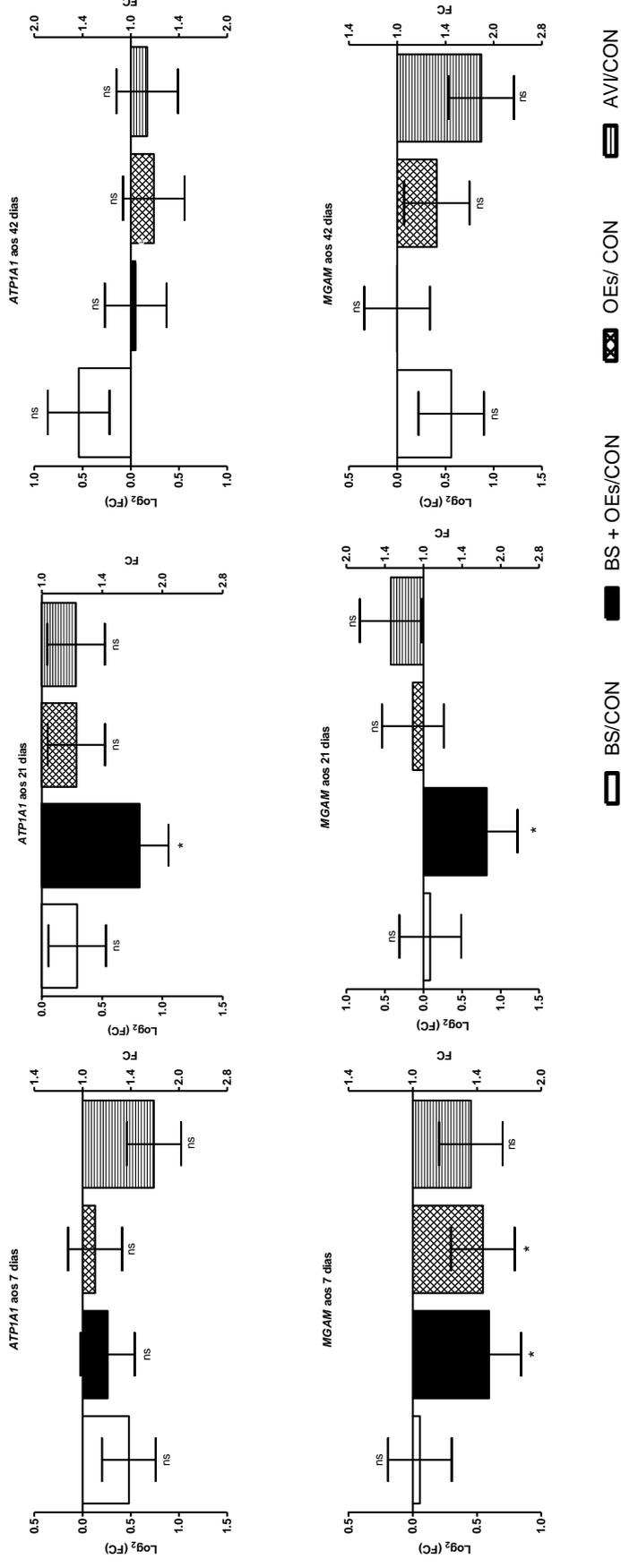


Figura 4. Expressão dos genes *ATP1A1* e *MGAM* nos diferentes tratamentos em relação ao controle (CON) aos 7, 21 e 42 dias de idade.

A abscissa refere-se ao \log_2 "fold-changes" para os contrastes indicados pela legenda. A escala de "Fold-change" (FC) foi incluída no eixo da direita. Houve interação significativa entre tratamento e idade ($p < 0,05$).

* indica diferença significativa pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

ns = não significativo.

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina.

ATP1A1 = gene codificador do transportador ATPase, Na^+/K^+ .

MGAM = gene codificador da maltase-glicoamilase.

Os níveis de RNAm dos genes *ATP1A1* e *MGAM* sofreram alteração ao longo do tempo de acordo com o aditivo alimentar na dieta (figuras 5A e 5B). Enquanto aves alimentadas com AVI apresentaram aumento inicial da expressão de *ATP1A1* (7 a 21 dias) ($P < 0.05$), as tratadas com BS mostraram expressão mais pronunciada deste gene entre 21 e 42 dias de vida ($P < 0.05$) (Figura 5A). A quantidade de RNAm do gene *MGAM* aos 21 dias no tratamento suplementado com BS + OEs foi a metade da observada aos 7 dias ($P < 0.05$), enquanto os níveis de RNAm nos demais tratamentos não foi alterada ($P > 0.05$) no mesmo período (Figura 5B). Entretanto, a quantidade de RNAm de *MGAM* aos 42 dias foi superior ao observado aos 7 dias ($P < 0.05$), independentemente do tratamento.

Efeito principal da idade ($P < 0.05$) foi verificado para os genes *SLC2A2*, *SLC15A1*, *SLC5A1* e *SI*, os quais apresentaram maior taxa de expressão com o aumento da idade (Figura 5C), enquanto a expressão gênica de *ANPEP* manteve-se constante ao longo do experimento ($P > 0.05$). Além disso, dos 7 aos 42 dias as expressões dos genes *SLC2A2*, *SLC15A1*, *SLC5A1* e *SI* aumentaram 1.62 ($p = 0.0131$), 1.69 ($P = 0.0015$), 1.73 ($P = 0.0002$) e 2.57 ($P < 0.0001$) vezes respectivamente, independentemente do tratamento (Figura 5C).

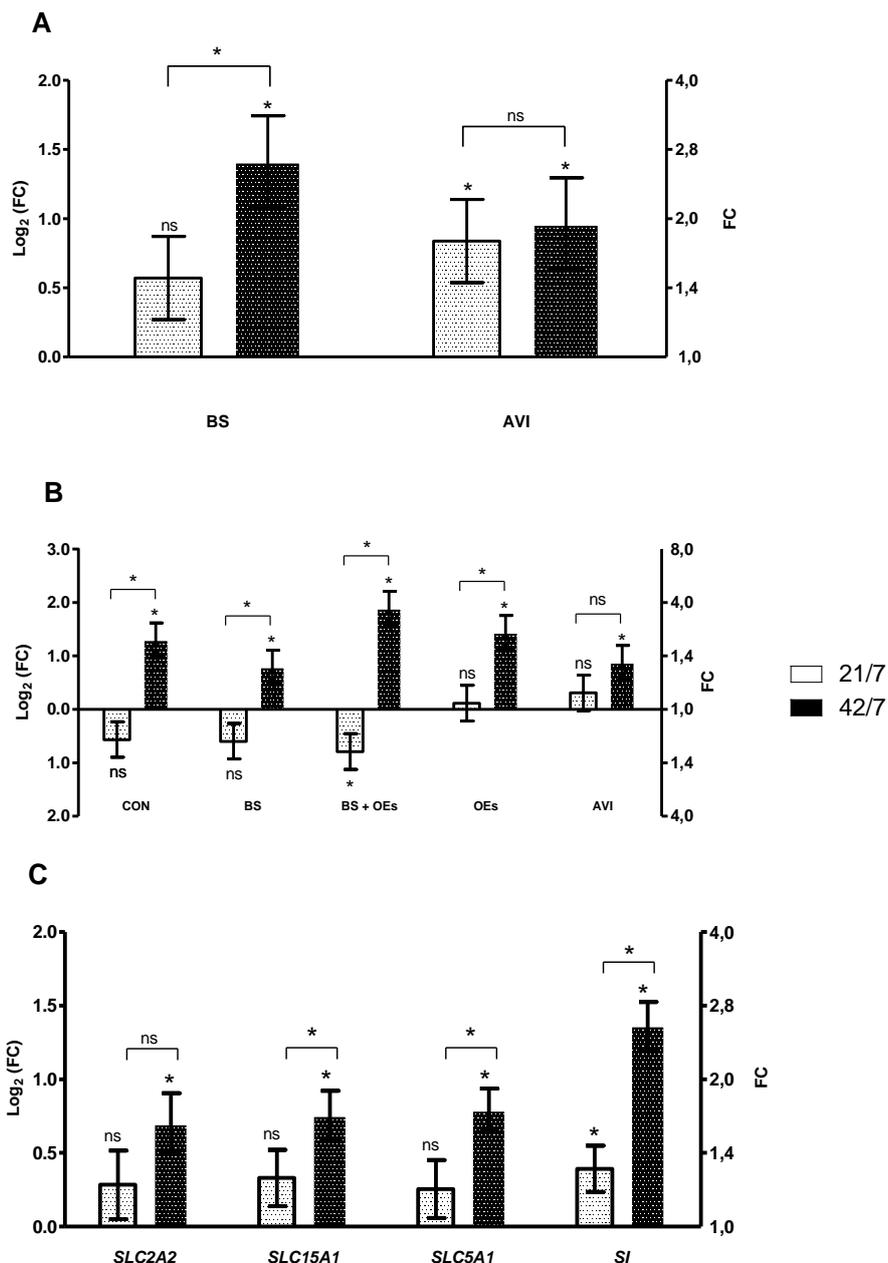


Figura 5. Comparação dos níveis de expressão gênica entre idades para: A – *ATP1A1* nos tratamentos BS e CON; B - *MGAM* em todos tratamentos; C - *SLC2A2*, *SLC15A1*, *SLC5A1* e *SI* considerando a média de todos tratamentos.

A abscissa refere-se ao log₂ “fold-changes” para os contrastes indicados pela legenda. O contraste 42/21 está indicado pelo colchete acima das barras. A escala de “Fold-change” (FC) foi incluída no eixo da direita.

Houve interação entre tratamento e idade ($P < 0,05$) (Painéis A e B) e efeito principal de idade ($P < 0,05$) (Painel C). Asterisco acima da barra ou do colchete indica diferença significativa pelo teste T ($P < 0,05$) para o respectivo contraste.

ns = não significativo.

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina.

ATP1A1 = gene codificador do transportador ATPase, Na⁺/K⁺.

MGAM = gene codificador da maltase-glicoamilase.

SLC2A2 = gene codificador do transportador de glicose galactose e frutose independente de Na⁺.

SLC15A1 = gene codificador do transportador de oligopeptídeos 1.

SLC5A1 = gene codificador do transportador de glicose e galactose dependente de Na⁺.

SI = gene codificador da sacarase-isomaltase.

3.3. Atividade enzimática

Avaliou-se a influência da dieta e da idade na atividade de fosfatase alcalina intestinal (FAI), bem como na atividade de enzimas relacionadas com a digestão de carboidratos e proteínas, maltase (MALT) e aminopeptidase (APN), respectivamente. Para atender as pressuposições de normalidade e variância as variáveis FAI e APN sofreram a transformação log-10 e raiz quadrada, respectivamente. Desta forma os resultados envolvendo estas variáveis nas figuras 6 e 7 foram apresentados na escala transformada, mas um segundo eixo y foi construído para apresentar a mesma diferença em termos % da atividade do controle (Figura 6) ou da idade referência (Figura 7).

Observou-se efeito principal da dieta nas atividades de FAI ($P=0.0004$) e APN ($P=0.0268$) (Tabela 6). As atividades de FAI e APN foram maiores ($P<0,05$) nos tratamentos OEs e AVI do que no grupo CON, enquanto os tratamentos OEs e BS + OEs não diferiram de CON (figuras 6A e 6B). A atividade de MALT das aves que receberam aditivos não diferiu do grupo CON ($P>0,05$), contudo atividade numericamente maior desta enzima foi verificada nos tratamentos OEs e AVI (Figura 6C).

Tabela 6. Resultados da análise com o modelo linear misto mostrando fatores que influenciam a atividade das enzimas de membrana intestinal estudadas.

Efeitos	GL	Valor de P		
		FAI	APN	MALT
Tratamento	4	0,0004	0,0268	0,0401
Idade	2	0,0116	<0,3984	<,0001
Interação	8	0,7101	0,4655	0,0556

Os valores de P representam a soma de quadrados do tipo III.

Efeito significativo encontra-se destacado em negrito.

GL = graus de liberdade.

FAI = fosfatase alcalina intestinal.

MALT = maltase.

APN = aminopeptidase-N.

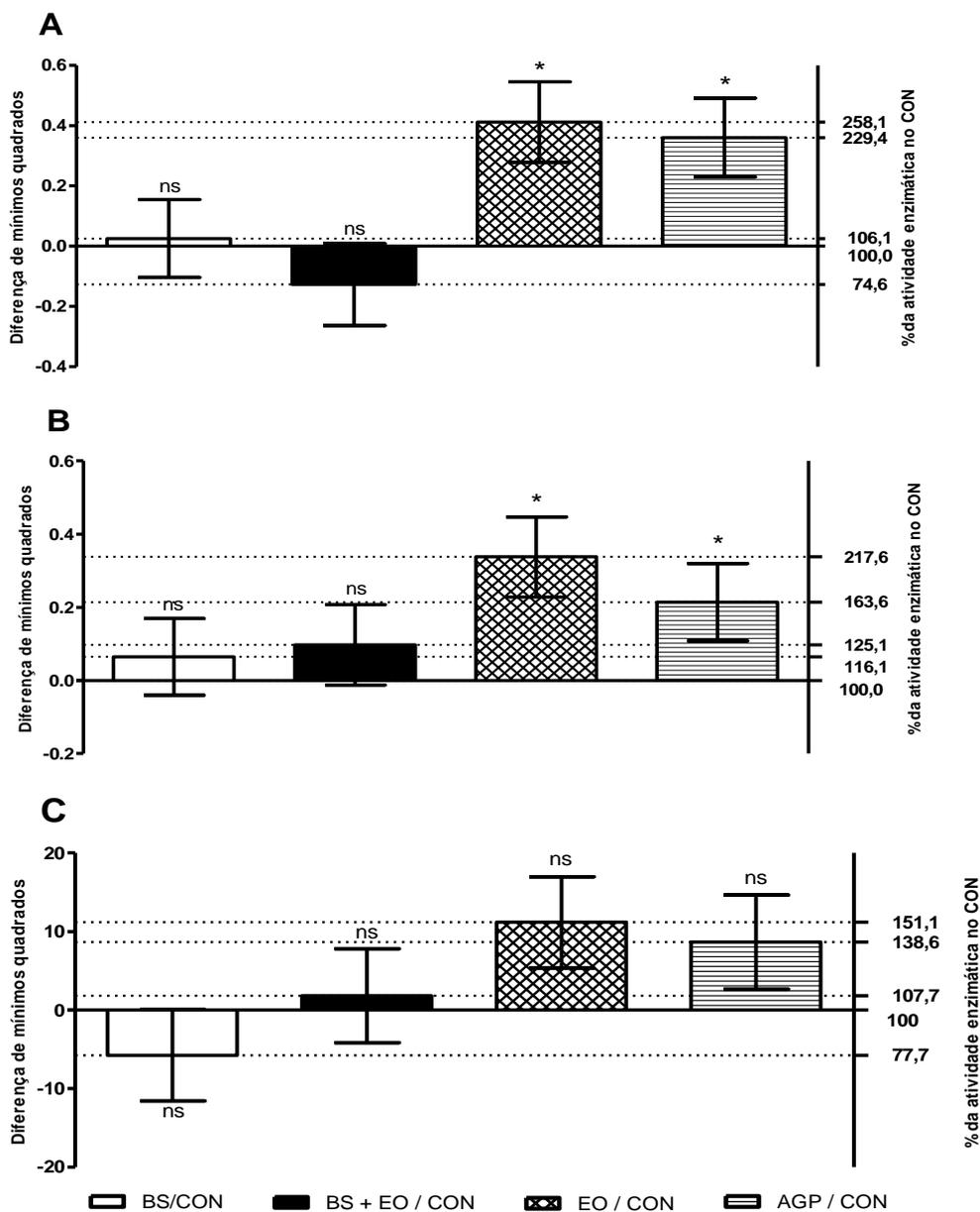


Figura 6. Atividade enzimática de FAI (A), APN (B) e MALT (C) nos diferentes tratamentos em relação ao tratamento controle (CON) durante todo período experimental.

A abscissa refere-se à diferença de mínimos quadrados para os contrastes indicados pela legenda. A escala percentual em relação ao controle foi incluída no eixo da direita. Houve efeito principal de tratamento ($P < 0,05$).

* indica diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

ns = não significativo.

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina

FAI = fosfatase alcalina intestinal

APN = aminopeptidase-N

MALT = maltase

Houve efeito principal da nas atividades de FAI ($P < 0.0116$) e MALT ($P < 0.0001$) (Tabela 6). A atividade de FAI sofreu redução de 7 a 21 dias ($P = 0,0034$) e permaneceu estável de 22 a 42 dias ($P = 0,3371$) (Figura 7A), enquanto a atividade de MALT aumentou nos dois períodos ($P < 0.05$) (Figura 7C). A atividade de APN manteve-se inalterada durante todo o período experimental ($P = 0,3984$) (Figura 7B).

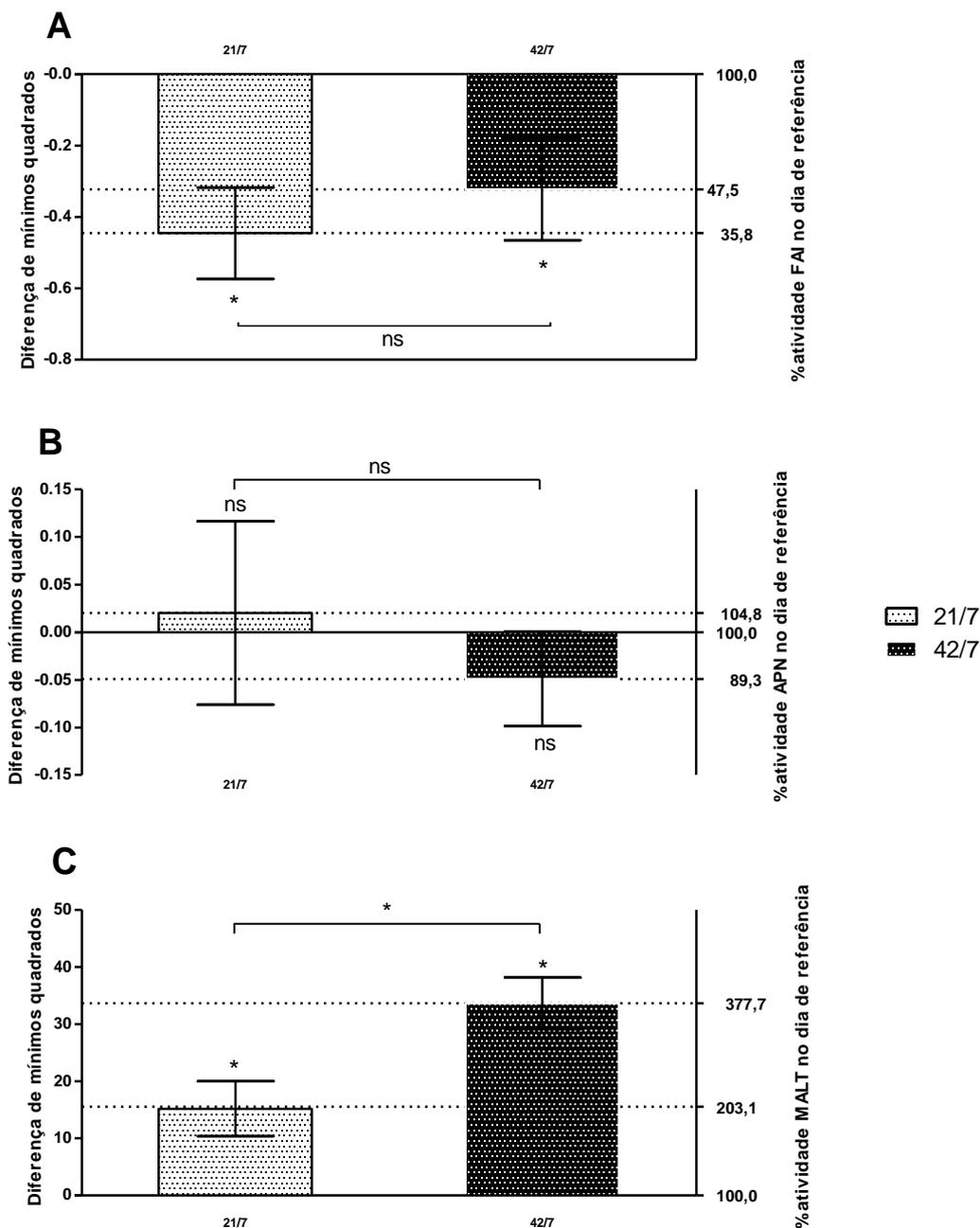


Figura 7. Comparação da atividade enzimática de FAI (A), APN (B) e MALT (C) entre idades de coleta, considerando a média de todos os tratamentos.

A abscissa refere-se à diferença de mínimos quadrados para contrastes indicados pela legenda. O contraste 42/21 está indicado pelo colchete acima das barras. A escala percentual em relação ao dia controle foi incluída no eixo da direita.

Houve efeito principal da idade ($P < 0,05$).

Um asterisco acima da barra ou do colchete indica diferença significativa pelo teste T ($P < 0,05$) para o respectivo contraste.

FAI = fosfatase alcalina intestinal

APN = aminopeptidase-N

MALT = maltase

3.5. Ensaio de absorção

Para verificar os possíveis efeitos da dieta e da idade sobre a transcrição de genes codificadores de proteínas envolvidas no transporte intestinal de hexoses (*GLUT2*, *SGLT1* e *ATP1A1*) investigados nesta pesquisa foram capazes de afetar a sua função, a área abaixo da curva (AUC) de decaimento de glicose intraluminal foi avaliada *in vitro*. Não houve efeito de tratamento na AUC para glicose ($P = 0,8388$), no entanto considerando a média dos valores de AUC ao longo do experimento, os tratamentos OEs e AVI apresentaram valores de AUC mais baixos. Houve um efeito principal da idade ($P < 0,0001$), com redução de AUC com a idade (Tabela 7).

Tabela 7. Área abaixo da curva (média \pm desvio padrão) para o decaimento de glicose intraluminal *in vitro*.

	AUC ¹					Média ²
	Tratamento					
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	
Idade						
7	65,6	74,4	60,4	66,4	61,3	65,6 \pm 2,8 ^A
21	44,9	43,7	46,9	43,7	43,1	44,5 \pm 1,6 ^B
42	26,9	26,8	32,4	27,9	30,4	28,9 \pm 1,0 ^C
Média ³	48,8 \pm 2,4	48,3 \pm 2,1	46,6 \pm 2,1	46,0 \pm 2,3	44,9 \pm 2,3	

¹Área abaixo da curva (unidades);

^{2,3}Média \pm erro padrão da média;

^{A,B,C}Valores seguidos de letras iguais não diferem nas comparações entre idades pelo teste T ($P < 0,05$).

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais

AVI = tratamento suplementado com avilamicina

IV DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Desempenho Zootécnico

Os objetivos deste estudo incluíram a avaliação do probiótico *Bacillus subtilis*, de uma mistura comercial de óleos essenciais (carvacrol, cinamaldeído, cineol e extrato de pimenta) e da sua combinação como promotor de crescimento em frangos. Não houve efeito dos tratamentos no desempenho zootécnico o que está de acordo com alguns trabalhos envolvendo a suplementação com *Bacillus subtilis* (WILLIS e

REID, 2008; LEE et al., 2010) ou óleos essenciais (BOZKURT et al., 2012; ABUDABOS e ALYEMNI, 2013). Bozkurt et al. (2012) também não encontraram diferença no desempenho entre aves da dieta basal e as suplementadas com monensina ou extrato de ervas (24,5% carvacrol, 20,1% 1,8-cineol, timol 12,1% e 6,0% de cânfora), no entanto, melhorias no desempenho em resposta a ambos aditivos foram detectadas após o desafio com uma mistura de *Eimeria* spp. Assim, tem sido proposto que a contribuição de probióticos e OEs no desempenho ocorre na presença de patógenos (GIANNENAS et al., 2013; MURUGESAN; GABLER e PERSIA, 2014).

No presente estudo, as aves foram alojadas em um aviário que se encontrava em vazio sanitário por cerca de 6 meses e que foi devidamente desinfetado antes de receber os pintinhos. Além disso, os pintainhos foram alojados em boxes com cama de maravalha nova. Estas medidas foram tomadas com a finalidade de isolar a influência dos aditivos testados na fisiologia intestinal e identificar sua contribuição no desempenho, minimizando a influência de uma elevada carga patogênica ambiental no intestino. APCs possuem maior eficácia quando as aves são criadas em condições inadequadas de higiene (NIEWOLD, 2007). Assim, os resultados semelhantes de desempenho entre AVI e CON neste experimento indicam que as aves foram criadas sob carga patogênica reduzida. Esta situação suporta a hipótese de que a eficácia de *Bacillus subtilis* e OEs está relacionada com o controle de microrganismos patogênicos.

4.2. Expressão Gênica e atividade enzimática

4.2.1. Influência da dieta

A expressão de genes codificadores de enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos (*MGAM* e *SI*) e proteínas (*ANPEP*) da membrana da borda em escova, bem como as atividades de FAI, MALT e APN não diferiram entre os tratamentos BS e CON. O tratamento BS promoveu aumento na quantidade de RNAm de *SLC15A1* em relação a dieta basal (CON), enquanto a expressão dos demais genes de transportadores estudados (*SLC5A1*, *SLC2A2* e *ATP1A1*) manteve-se inalterada, bem como a absorção de glicose *in vitro* (AUC). De maneira similar, a suplementação com o probiótico *Enterococcus faecium* não influenciou a expressão e a atividade de enzimas digestivas em leitões (MARTIN et al., 2012), enquanto *B coagulans* aumentou

as atividades de protease e amilase em frangos (WANG e GU, 2010). A divergência entre os dois estudos indica que a capacidade do probiótico produzir ou estimular a produção de enzimas do animal varia de acordo com a cepa. No presente estudo as atividades de MALT e APN não foram influenciadas pelo tratamento BS, indicando que o probiótico não estimula a produção das respectivas enzimas no epitélio e a maturação do sistema digestório.

Apesar da escassez de investigações do transporte epitelial em resposta a suplementação com probióticos em frangos não serem de nosso conhecimento, existem relatos de que a absorção de glicose no intestino pode ser favorecida com o uso de probióticos em mamíferos. O tratamento oral de ratos com *Saccharomyces boulardii* promoveu acentuada estimulação da absorção de D-glicose na membrana borda em escova de enterócitos, com aumento associado no co-transportador de Na⁺ D-glicose (SGLT-1), medido por triagem radiográfica da proteína (BUTS e BERNASCONI, 2005). Além disso, a administração de *B. thtaiotaomicron* em camundongos acarretou aumento na expressão de algumas proteínas importantes para a absorção de nutrientes, incluindo o co-transportador Na⁺/glicose e a proteína de ligação de ácidos graxos (HOOPER e GORDON, 2001). Os resultados de expressão gênica (*SLC2A2*, *SLC5A1* e *ATP1A1*) e do ensaio de absorção (AUC) em aves suplementadas com probiótico desta pesquisa não corroboram os achados com outras cepas de probiótico em mamíferos.

Por outro lado, observou-se aumento na expressão de *SLC15A1* no tratamento BS, o que sugere maior absorção de oligopeptídeos. A elevação do teor proteico na dieta ou sua deficiência promovem a expressão do transportador de peptídeos no intestino (GILBERT et al., 2008). Além disso, *Bacillus* spp. possuem reconhecida capacidade proteolítica, e maior atividade de protease e digestibilidade proteica já foram demonstradas em animais alimentados com *Bacillus* spp (WANG e GU, 2010; RAY et al., 2012). Deste modo, a elevação na expressão de *SLC15A1* no tratamento BS poderia ser justificada por uma maior disponibilidade de peptídeos no conteúdo intestinal devido a uma maior digestão proteica pelas proteases secretadas pelo *Bacillus subtilis*.

A absorção de produtos da digestão de proteína no intestino delgado ocorre primariamente na forma de oligopeptídeos ao invés de aminoácidos (MATTHEWS, 1975) e a atividade de PepT1 pode estimular o transporte de aminoácidos livres via transportadores do sistema b⁰⁺ (WENZEL et al., 2001). Assim, o aumento na

expressão de *SLC5A1* verificado neste estudo sugere que aves suplementadas com *Bacillus subtilis* tiveram uma vantagem considerável na absorção de aminoácidos em relação as aves controle.

O mecanismo de ação mais provável dos OEs baseia-se na sua ação antimicrobiana, como os APCs. Curiosamente, os grupos AVI e OEs apresentaram maiores atividades de APN e FAI que o controle, com a atividade de MALT, seguindo a mesma tendência. Paralelamente, as expressões de *ANPEP*, *MGAM* e *SI* mantiveram-se inalteradas nos tratamentos AVI e OEs. Como neste experimento, o APC e os OEs utilizados foram continuamente fornecidos na ração, considerando suas ações antimicrobianas, é possível que a semelhança das atividades das enzimas intestinais nestes dois tratamentos envolva alterações similares na microbiota.

Os seguintes papéis têm sido atribuídos à FAI: i) regulação do pH na superfície do duodeno, ii) detoxicação do LPS bacteriano no lúmen do intestino, iii) redução da toxicidade do LPS *in vivo*, iv) controle da inflamação intestinal e v) prevenção da passagem bacteriana pela mucosa intestinal *in vivo* (LALLES, 2010).

O LPS bacteriano liga-se ao “tool like receptor 4” desencadeando a resposta imune (LALLES, 2010). Além disso, a introdução de bactérias vivas, mortas ou o LPS isolado no intestino aumentam a atividade de FAI (LALLES, 2010). Curiosamente, demonstrou-se que uma alça de retroalimentação entre LPS e FAI é responsável pelo controle da inflamação intestinal (BATES et al., 2007). Assim, acredita-se que a maior atividade de FAI em resposta à suplementação com AVI ou OEs é resultado de uma maior exposição do intestino ao LPS bacteriano, pela lise direta de bactérias Gram -, ou pela aumento da proporção Gram -/Gram + na microbiota intestinal, já que avilamicina e OEs agem sobretudo em Gram + (BUTAYE et al., 2003; GIANNENAS et al., 2013). Elevação da atividade de FAI pode ser uma grande vantagem especialmente na presença bactérias patogênicas no intestino, quando infecções subclínicas podem comprometer a saúde intestinal e aumentar o gasto energético com perpetuação da resposta imune de fase aguda, comprometendo o desempenho (KLASING e JOHNSTONE, 1991). A redução do gasto com a resposta imune já era tida como uma das bases biológicas responsável pelos ganhos de eficiência alimentar e de desempenho em resposta aos APCs (DIBNER e RICHARDS, 2005). Nossos dados sugerem um mecanismo de ação parecido para os OEs.

O aumento da atividade de APN e a tendência de aumento de MALT indicam melhora da função digestiva das aves dos tratamentos AVI e OEs. A distribuição da

atividade das enzimas de membrana ao longo do eixo cripta/vilo depende da taxa de secreção enzimática, migração celular e extrusão (IJI et al., 2001b). A discrepância entre as quantidades de RNAm de *MGAM*, *SI* e *ANPEP* e a atividade de MALT e APN neste estudo, indica que a elevação das atividades não ocorreu pela maior síntese da enzima. As maiores atividades encontradas podem ser o resultado de uma menor perda epitelial e alteração da renovação celular com a suplementação com APC e OEs. APCs e OEs são substâncias antimicrobianas e redução da atividade microbiana na digesta ou ao nível da mucosa pode conferir maior integridade da mucosa (HUGHES, 2003). De fato, suínos criados em ambiente gnotobiótico com microbiota normal ou *E. coli* apresentam maior renovação celular que animais “germ-free” ou alimentados com *L. fermentum* (WILLING e VAN KESSEL, 2007).

A maioria das enzimas digestivas são secretadas como precursores inativos, tornando-se ativas apenas após a maturação do enterócito (IJI et al., 2001a), assim as células maduras do vilo são mais funcionais em secretar enzimas e absorver nutrientes que células imaturas (UNI et al., 1998; FERRARIS, 2001). No entanto, dependendo da taxa de renovação celular, o enterócito pode tornar-se senescente antes de ser extrudido na ponta da vilosidade (IJI et al., 2001b). A maior atividade de APN e MALT dos tratamentos AVI e OEs pode envolver a mudança da taxa de migração dos enterócitos para favorecer a síntese e alocação das proteínas na membrana.

Recentemente o estudo da suplementação associada de diferentes classes de aditivos, como probióticos, OEs e ácidos orgânicos tem sido proposto na busca de eventuais efeitos sinérgicos (BRENES e ROURA, 2010). No presente estudo o tratamento BS + OE promoveu redução da expressão de *MGAM* aos 7 e aos 21 dias e redução de *ATP1A1* aos 21 dias, enquanto a atividade de MALT manteve-se inalterada. Os benefícios da administração de OEs na fisiologia intestinal não estão presentes quando se combina o aditivo com *Bacillus subtilis*. Provavelmente o efeito do *Bacillus subtilis* em anular os efeitos dos OEs se deve a alterações na microbiota em decorrência da multiplicação dos *Bacillus*. Estudos futuros envolvendo o sequenciamento da microbiota poderão elucidar estas possíveis relações.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar o efeito de um probiótico e de uma mistura de OEs na expressão de genes relacionados à digestão e absorção de carboidratos e proteínas. A maior atividade das enzimas da borda em escova estudadas (FAI e APN) em aves alimentadas com avilamicina ou

OEs deve ser mais investigada, especialmente em situações adversas como a criação em piores condições sanitárias, onde a suplementação poderia contribuir para uma melhor utilização de carboidratos e proteínas, e conseqüentemente, melhor conversão alimentar. A administração contínua de *Bacillus subtilis* na ração aumentou a quantidade de RNAm de PepT1 o que sugere aumento no transporte transcelular de peptídeos. Melhora na utilização da proteína dietética não apenas pode se traduzir em economia para a indústria avícola, como pode reduzir o impacto ambiental da excreção de nitrogênio. Na presente pesquisa as aves foram criadas em condições adequadas de higiene e receberam ingredientes altamente digestíveis o que pode ter limitado o potencial das alterações observadas em melhorar o aproveitamento dos nutrientes e o desempenho. Assim, estudos adicionais poderiam elucidar melhor a capacidade do *Bacillus subtilis* e dos OEs testados em melhorar a utilização de carboidratos e proteínas em condições adversas.

4.2.2. Influência da idade

A compreensão da capacidade do intestino assimilar aminoácidos e glicose é fundamental para a formulação de dietas adequadas ao perfil enzimático e de transportadores de nutrientes no intestino delgado em determinado momento. A atividade de enzimas pancreáticas geralmente é similar entre aves de postura e de corte, contudo a atividade das enzimas da borda em escova em frangos é menor, especialmente com o avançar da idade (NIR et al., 1993; MAHAGNA e NIR, 1996). Neste sentido, têm sido sugerido que a digestão membranosa de carboidratos é limitante em frangos (GILBERT et al., 2007).

Neste experimento genes codificadores de enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos na borda em escova apresentaram maior expressão aos 42 dias que ao término da primeira semana de vida (2,5 vezes para *MGAM* e 2,58 vezes para *SI*), o que está de acordo com o aumento na atividade de MALT no mesmo período (3,78 vezes). No entanto, enquanto a atividade de MALT aumentou 2,03 vezes entre 7 e 21 dias, a expressão de *MGAM* e *SI*, manteve-se relativamente estável no mesmo período (0,85 e 1,31 vezes, respectivamente). O aumento da atividade de MALT neste estudo é similar ao encontrado por UNI et al. (2003), os quais observaram que as atividades de sacarase e maltase aumentaram gradualmente entre quatro e 11 dias em outra linhagem de frangos.

A maior atividade de MALT com a idade no presente trabalho pode ter ocorrido por dois processos distintos, inicialmente por alterações pós-transcricionais, em seguida por reprogramação celular. Foi demonstrado, que após 14 dias de idade, a taxa de migração celular nas vilosidades intestinais de frangos é reduzida drasticamente, levando a uma maior densidade de enterócitos maduros (IJI et al., 2001a). Embora o enterócito maduro seja mais funcional, quando a taxa de migração celular é reduzida ele pode se tornar senescente antes de ser extrudido na ponta da vilosidade (IJI et al., 2001b). Em frangos com 21 dias, o pico da atividade de alfa-glicosidase ocorre em torno de 300 μm da ponta da cripta, e acima desta altura a atividade sofre redução gradual pelo aumento da degradação enzimática (IJI et al., 2001b). Desta forma, a maior atividade de MALT entre 7 e 21 dias sugere uma maior estabilidade enzimática na linhagem estudada. Por outro lado, o aumento da atividade de MALT entre 21 e 42 dias envolveu aumento da expressão de gênica, o que pode ser uma resposta a maior quantidade de carboidratos fornecida pela dieta no período. De fato, a regulação pelo substrato e controle ao nível transcricional já havia sido demonstrados para maltase e sacarase (UNI et al., 2003; KARASOV et al., 2010).

O aumento da atividade de MALT com a idade indica que a digestão dos carboidratos pode não ser limitante para a digestão da linhagem de frangos estudada, conforme sugerido anteriormente para frangos de outras linhagens (GILBERT et al., 2007). A seleção genética para o crescimento da linhagem utilizada neste estudo pode ter favorecido a reprogramação celular para uma menor degradação enzimática e maior síntese de maltase para uma maior digestão de carboidratos.

Existem evidências de que o padrão de desenvolvimento das funções digestivas e absorptivas em galinhas se assemelha ao desenvolvimento em vertebrados herbívoros, ou seja funções relacionadas com a assimilação de carboidratos aumentam (disacaridases e transporte de hexoses), enquanto funções relacionadas ao aproveitamento de proteínas (proteases e transporte de aminoácidos) diminuem com a idade (BUDDINGTON e DIAMOND, 1989). Na presente pesquisa, a expressão do gene associado com a digestão de proteínas manteve-se estável com o avançar da idade das aves de acordo com a atividade da respectiva proteína, indicando que a digestão proteica pode ser limitante para as aves estudadas (ANPEP). No entanto, a atividade relativamente estável de APN pode ser considerada uma vantagem se comparada com a queda de atividade apresentada por outra linhagem de frangos (Steggles® x Ross®) (IJI et al., 2001a). Por outro lado, um estudo

com pintainhos Arbor Acres® reportou níveis crescentes de RNAm de *ANPEP* do nascimento aos 14 dias de idade (GILBERT et al., 2007). Por trás das diferenças para as variáveis relacionadas com a digestão proteica de membrana entre nossos achados e a literatura podem residir diferenças na habilidade de cada linhagem assimilar a proteína dietética. Tais diferenças podem ser determinantes para a curva de crescimento de cada linhagem, conforme sugerido por GILBERT et al. (2007), que encontraram diferentes níveis de expressão de *ANPEP* entre linhagens selecionadas com dietas com diferentes relações proteína / carboidrato.

Neste estudo, o padrão de expressão de *FAI* até os 21 dias é consistente com os achados de Iji et al. (2001b) em pintainhos de corte. Os autores encontraram menor atividade específica de *FAI* ao longo do intestino delgado da eclosão aos 21 dias de vida, com atividade concentrada sobretudo no topo das vilosidades. A queda na atividade de *FAI* pode ter ocorrido pelo mesmo motivo proposto para a elevação de *MALT* no mesmo período, ou seja, devido a uma possível queda na migração dos enterócitos e acúmulo de células com menor atividade nas vilosidades (IJI et al., 2001b). A estabilidade da atividade de *FAI* entre 21 e 42 dias reflete a maturação intestinal logo aos 21 dias de idade, uma vez que a enzima possui papel importante na manutenção da homeostase intestinal e em sua integridade (LALLES, 2010).

A presente pesquisa também avaliou o padrão temporal de expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas na absorção de hexoses (*GLUT2*, *SGLT1* e *ATP1A1*) e de di e tripeptídeos (*SLC15A1* e *ATP1A1*). Todos os genes envolvidos com a absorção estudados apresentaram maior expressão com o avançar da idade, exceto *ATP1A1*, cuja expressão cresceu com a idade apenas nos tratamentos BS e AVI. Estes achados corroboram os resultados de CHEN et al. (2005), que mostraram que a abundância de RNAm de *SLC15A1* tende a aumentar da eclosão aos 35 dias em frangos Cobb®. Nossos achados também suportam os resultados de GILBERT et al. (2007), que observaram aumento linear dos níveis de RNAm de *SLC2A2*, *SLC15A1* e *SLC5A1* entre a eclosão e os 14 dias de idade em pintainhos Aviagen®.

O aumento da quantidade de RNAm de genes relacionados com a absorção de hexoses (*SLC2A2* e *SLC5A1*) de 21 a 42 dias pode ser atribuído a maior quantidade de carboidrato fornecido pela dieta de crescimento, de maneira similar ao ocorrido com a expressão de *SI* e *MGAM* e a atividade de *MALT*. Em contrapartida, o aumento da expressão de *SLC15A1* de 21 a 42 dias não parece ter sido determinado pelo substrato, uma vez que no período houve redução da quantidade de proteína

fornecida na dieta, enquanto a expressão de *ANPEP* e a atividade de APN permaneceram inalteradas.

Os valores de AUC apresentaram queda linear com a idade neste estudo, indicando aumento da capacidade do intestino absorver glicose a medida que o frango cresce. Além disso, houve aumento da altura das vilosidades intestinais de 7 a 21 dias, a qual manteve-se estável até os 42 dias (dados mostrados no capítulo 3). Normalmente a absorção absoluta de nutrientes aumenta com a idade devido ao aumento da área absorptiva (RAYO et al., 1992), mas a eficiência de absorção em relação as massas intestinal e corporal diminui (IJI et al., 2001c). A redução na taxa de transporte em relação a massa intestinal à medida que os animais crescem está associada com o aumento da afinidade dos transportadores, que leva a redução de sua capacidade (NAVAB e WINTER, 1988). De maneira geral, a capacidade de absorção é igual a ingestão de determinado nutriente, mas em animais de produção, com alta ingestão de nutrientes, a absorção pode ser limitante para o crescimento (OBST e DIAMOND, 1992). Assim, aumentar o número de transportadores de nutrientes no intestino, poderia ser uma forma de compensar a queda de sua funcionalidade com o desenvolvimento, especialmente a partir de 21 dias, quando a área de absorção não sofre grandes alterações, conforme indicado pela altura das vilosidades (dados mostrados no capítulo 3).

V CONCLUSÕES

A adição de *Bacillus subtilis* ou óleos essenciais na ração induz alterações na expressão de genes e atividade de enzimas relacionados à digestão e absorção de açúcares e peptídeos, porém não promove melhora no desempenho zootécnico. Os resultados servem como parâmetro para estudos adicionais com os mesmos aditivos simulando o ambiente comercial.

Durante o desenvolvimento, o intestino do frango sofre alterações específicas que podem ser levadas em conta para a formulação de dietas que melhor se adequem ao perfil de enzimas e transportadores de nutrientes expressados no intestino ao longo do tempo.

VI REFERÊNCIAS

ABUDABOS, A. M.; ALYEMNI, A. H. Effects of the essential oil blend CRINA® Poultry in feed on broiler performance and gut microbiology. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, n. 4, p. e83, 2013.

BASMACIOĞLU MALAYOĞLU, H.; BAYSAL, Ş.; MISIRLIOĞLU, Z.; POLATA, M.; YILMAZD, H.; TURAND, N. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat–soybean meal diets. **British Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 67-80, 2010.

BATES, J. M.; AKERLUND, J.; MITTGE, E.; GUILLEMIN, K. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. **Cell Host Microbe**, v. 2, n. 6, p. 371-82, Dec 13 2007.

BOZKURT, M.; SELEKB, N.; KÜÇÜKYILMAZA, K.; ERENB, H.; GÜVENC, E.; ÇATLIA, A.U.; ÇINARA, M. Effects of dietary supplementation with a herbal extract on the performance of broilers infected with a mixture of *Eimeria* species. **Br Poult Sci**, v. 53, n. 3, p. 325-32, 2012.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1, p. 1-14, 2010.

BUDDINGTON, R. K.; DIAMOND, J. M. Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters. **Annu Rev Physiol**, v. 51, p. 601-19, 1989.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-188, 2003.

BUTS, J.-P.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: Basic Science and Clinical Applications in Gastroenterology. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 34, n. 3, p. 515-532, 2005.

CARY, N. SAS Institute Inc. **USA, SAS for Windows Release**, v. 8, 2002.

CHEN, H. et al. Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. **J Nutr**, v. 135, n. 2, p. 193-8, Feb 2005.

CLEMENTS, L. D.; MILLER, B. S.; STREIPS, U. N. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. **Syst Appl Microbiol**, v. 25, n. 2, p. 284-6, Aug 2002.

DIARRA, M. S.; MALOUIN, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. 5, p. 282, 2014.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poult Sci**, v. 84, n. 4, p. 634-43, Apr 2005.

FERRARIS, R. P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. **BIOCHEMICAL JOURNAL-LONDON-**, v. 360, n. 2, p. 265-276, 2001. ISSN 0264-6021.

GIANNENAS, I.; BONOS, E; CHRISTAKI, E; FLOROU-PANERI P. Essential Oils and their Applications in Animal Nutrition. **Med Aromat Plants**, v. 2, n.6, 2013.

GILBERT, E. R.; LI, H.; EMMERSON, D. A.; WEBB JR., K. E.; WONG, E. A. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. **Poult Sci**, v. 86, n. 8, p. 1739-53, Aug 2007.

GILBERT, E. R.; LI, H.; EMMERSON, D. A.; WEBB JR, K. E.; AND WONG, E. A. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. **J Nutr**, v. 138, n. 2, p. 262-71, Feb 2008.

HOQUE, T.; BOGHAL, M.; WEBB, R. A. Validation of internal controls for gene expression analysis in the intestine of rats infected with *Hymenolepis diminuta*. **Parasitology international**, v. 56, n. 4, p. 325-329, 2007. ISSN 1383-5769.

HUGHES, R. J. **Energy metabolism of chickens: physiological limitations**. RIRDC, 2003. ISBN 0642585504.

IJI, P. A.; SAKI, A.; TIVEY, D. R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. **Br Poult Sci**, v. 42, n. 4, p. 505-13, Sep 2001a.

IJI, P. A.; SAKI, A.; TIVEY, D. R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes. **Br Poult Sci**, v. 42, n. 4, p. 514-22, Sep 2001b.

IJI, P. A.; SAKI, A.; TIVEY, D. R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 3. Development and characteristics of tryptophan transport. **British poultry science**, v. 42, n. 4, p. 523-529, 2001c.

INSTITUTE, S. **SAS 9. 3 Output Delivery System: User's Guide**. SAS institute, 2011. ISBN 1607648938.

JANG, I. et al. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n. 3, p. 304-315, 2007.

KARASOV, W. GATICA-SOSA, C.; BRZK, P.; CAVIEDES-VIDAL, E. Gene expression basis for flexibility of intestinal maltase activity in young house sparrows. **FASEB JOURNAL**, 2010, FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA.

KIEN, C. L.; BLAUWIEKE, R; BUNN, J. Y.; JETTON, T. L.; FRANKEL, W. L.; HOLST, J. J. Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. **J Nutr**, v. 137, n. 4, p. 916-22, Apr 2007.

KLASING, K. C.; JOHNSTONE, B. J. Monokines in growth and development. **Poultry Science**, v. 70, n. 8, p. 1781-1789, 1991.

LALLES, J. P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutr Rev**, v. 68, n. 6, p. 323-32, Jun 2010.

LEE, K. W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H. J.; FREHNER, M.; LOSA, R.; BEYNEN, A. C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **Br Poult Sci**, v. 44, n. 3, p. 450-7, Jul 2003.

LEE, K. W.; LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S.; LI, G. X.; JANG, S. I.; BABU, U. S.; PARK, M. S.; KIM, D. K.; LILLEHOJ, E. P.; NEUMANN, A. P.; REHBERGER, T. G.; SIRAGUSA, G. R. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. **Poult Sci**, v. 89, n. 2, p. 203-16, Feb 2010.

LIVARK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAHAGNA, M.; NIR, I. Comparative development of digestive organs, intestinal disaccharidases and some blood metabolites in broiler and layer-type chicks after hatching. **British poultry science**, v. 37, n. 2, p. 359-371, 1996.

MARTIN, L.; PIEPER, R.; KRÖGER, S.; GOODARZI BOROOJENI, S.; VAHJEN, W.; NEUMANN, K.; VAN KESSEL, A.G.; ZENTEK, J. Influence of age and *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 on development of small intestinal digestive physiology in piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 175, n. 1, p. 65-75, 2012.

MATTHEWS, D. M. Intestinal absorption of peptides. **Physiol Rev**, v. 55, n. 4, p. 537-608, Oct 1975.

MURUGESAN, G. R.; GABLER, N. K.; PERSIA, M. E. Effects of direct-fed microbial supplementation on broiler performance, intestinal nutrient transport and integrity under experimental conditions with increased microbial challenge. **Br Poult Sci**, v. 55, n. 1, p. 89-97, Feb 2014.

MURUGESAN, G. R.; ROMERO, L. F.; PERSIA, M. E. Effects of Protease, Phytase and a *Bacillus* sp. Direct-Fed Microbial on Nutrient and Energy Digestibility, Ileal Brush Border Digestive Enzyme Activity and Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentration in Broiler Chickens. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101888, 2014.

NAVAB, F.; WINTER, C. G. Effect of aging on intestinal absorption of aromatic amino acids in vitro in the rat. **METHODS**, v. 5, p. 34, 1988.

NIEWOLD, T. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v. 86, n. 4, p. 605-609, 2007.

NIR, I.; NITSAN, Z.; MAHAGNA, M. Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. **British Poultry Science**, v. 34, n. 3, p. 523-532, 1993.

OBST, B. S.; DIAMOND, J. Ontogenesis of intestinal nutrient transport in domestic chickens (*Gallus gallus*) and its relation to growth. **The Auk**, p. 451-464, 1992.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 152, n. 2, p. 121-129, 1995.

RAY, A.; GHOSH, K.; RINGØ, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 465-492, 2012.

RAYO, J.; ESTEBAN, S.; TUR, J. Effect of starvation on the in vivo intestinal absorption of sugars and amino acids in young chickens (*Gallus domesticus*). **Archives Of Physiology And Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 155-158, 1992.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 252p.

RUEDA, E.; LEÓN, M.; CASTAÑEDA, M.; MENDEZ A.; MICHELANGELI, C. Effects of concanavalin A on intestinal brush border enzyme activity in broiler chickens. **Br Poult Sci**, v. 48, n. 6, p. 696-702, Dec 2007.

UNI, Z.; PLATIN, R.; SKLAN, D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 168, n. 4, p. 241-247, 1998.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poult Sci**, v. 82, n. 11, p. 1747-54, Nov 2003.

VILÀ, B.; ESTEVE-GARCIA, E.; BRUFAU, J. Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 03, p. 369-380, 2010. ISSN 1743-4777.

WANG, Y.; GU, Q. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. **Res Vet Sci**, v. 89, n. 2, p. 163-7, Oct 2010.

WENZEL, U. MEISSNER, B.; DÖRING, F.; DANIEL, H. PEPT1-mediated uptake of dipeptides enhances the intestinal absorption of amino acids via transport system b(0,+). **J Cell Physiol**, v. 186, n. 2, p. 251-9, Feb 2001.

WILLING, B.; VAN KESSEL, A. Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. **Journal of animal science**, v. 85, n. 12, p. 3256-3266, 2007.

WILLIS, W. L.; REID, L. Investigating the Effects of Dietary Probiotic Feeding Regimens on Broiler Chicken Production and *Campylobacter jejuni* Presence. **Poultry Science**, v. 87, n. 4, p. 606-611, April 1, 2008

WINDISCH, W.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of animal science**, v. 86, n. 14 suppl, p. E140-E148, 2008.

CAPÍTULO 3 – MORFOMETRIA E MICROBIOTA DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM AVILAMICINA, *Bacillus subtilis* E ÓLEOS ESSENCIAIS

RESUMO – *Bacillus subtilis* e óleos essenciais (OEs) têm sido investigados como substitutos à antibióticos promotores de crescimento (APC). Tais aditivos demonstraram-se capazes de melhorar o desempenho zootécnico de frangos, presumivelmente através da modulação da microbiota intestinal. O presente estudo investigou os efeitos da avilamicina e da adição isolada ou combinada de *Bacillus subtilis* e de uma mistura de OEs (carvacrol, cinamaldeído, cineol e extrato de pimenta) na morfometria do jejuno, e na abundância de grupos bacterianos de maior predominância na mucosa do íleo de frangos de corte entre aos 7, 21 e 42 dias de idade. Os dados também foram avaliados em função do tempo para verificar a sucessão bacteriana. Para tanto, 1320 frangos foram distribuídos em cinco tratamentos, de acordo com a suplementação [dieta basal como controle (CON); *Bacillus subtilis* (BS); *Bacillus-subtilis* + óleos essenciais (BS + OEs); óleos essenciais (OEs); avilamicina como controle positivo (AVI)]. As análises morfométricas constituíram-se da análise da altura das vilosidades, profundidade de criptas, relação vilo/cripta e contagem de células calciformes. A análise da colonização bacteriana da mucosa do íleo buscou revelar o número de cópias do gene 16S DNAr dos grupos *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Conclui-se que a suplementação com BS ou OEs promove alterações momentâneas na morfometria intestinal dos frangos. Os *Lactobacillus* predominam na mucosa do íleo, e sua maior prevalência ocorre no dia 7, seguida pelo dia 42. A utilização de AVI ou OEs altera o padrão de sucessão dos *Enterococcus*, enquanto a dieta BS + OEs reduz os *Lactobacillus*.

Palavras-chave: 16S DNAr, aditivos alimentares, antibiótico promotor de crescimento, fisiologia intestinal, probiótico

CHAPTER 3 – MORPHOLOGY AND MICROBIOTA OF THE SMALL INTESTINE MUCOSA OF BROILERS SUPPLEMENTED WITH AVILAMYCIN, *Bacillus subtilis* AND ESSENTIAL OILS

ABSTRACT – *Bacillus subtilis* and essential oils (EOs) have been investigated as replacements for antibiotic growth promoters (AGPs) by improving the performance of chickens. This study investigated the effects of avilamycin and the single or combined supplementation of *Bacillus subtilis* and essential oils (carvacrol, cinnamaldehyde, cineole and pepper extract) in jejunum morphology, and abundance of the major bacterial groups in association with the ileum mucosa, at 7, 21 and 42 days of age. Data were also evaluated over the time course to verify bacterial succession. Therefore, 1320 broiler chickens were divided among five treatments, according to supplementation [basal diet as control (CON); *Bacillus subtilis* (BS); *Bacillus subtilis* + essential oils (BS + EOs); essential oils (EOs); avilamycin as positive control (AVI)]. The morphometric analyzes consisted of the analysis of villus height, crypt depth, villus / crypt ratio and goblet cell count. The analysis of bacterial colonization of the ileum mucosa involved 16SrDNA copy numbers the quantification of the number of copies of the the analysis of bacterial colonization of the ileum mucosa sought to reveal the 16SrDNA copy numbers of the *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* groups trough quantitative real time PCR (qPCR). In conclusion, BS or EOs supplementation promotes momentary changes in intestinal morphology of broilers. *Lactobacilli* predominate in the mucosa of the ileum, and their higher prevalence occur at day 7 and then at day 42. The use of AVI or EOs changes the pattern of succession of *Enterococcus*, while BS diet + EOs reduces *Lactobacillus*.

Keywords: 16S rDNA, antibiotic growth promoter, feed additives, intestinal physiology, probiotic

I INTRODUÇÃO

Os antibióticos promotores de crescimento (APCs) foram utilizados com bastante sucesso para melhorar o desempenho zootécnico de animais. No entanto, efeitos colaterais vem sendo relatados, como a presença de bactérias patogênicas resistentes e resíduo de antibiótico em produtos avícolas (DIARRA e MALOUIN, 2014). Conseqüentemente, há uma tendência global para a criação de frangos de corte com base em dietas livre APCs. Este fenômeno tem forçado os nutricionistas de aves pela busca de novas alternativas aos APCs, dentre as quais destacam-se probióticos e óleos essenciais (OEs). Estes aditivos têm sido associados com a melhora da fisiologia intestinal e com aumento do ganho de peso de frangos (JANG et al., 2007; BASMACIOĞLU MALAYOĞLU et al., 2010; WANG e GU, 2010).

O mecanismo de ação dos APCs, *Bacillus subtilis* e OEs ainda não é totalmente compreendido, mas há um consenso de que todos têm propriedades seletivas sobre a microbiota, conferindo proteção contra patógenos intestinais (LEE et al., 2003; BRENES e ROURA, 2010; VILÀ et al., 2010). Acredita-se que os APCs e os OEs atuam pela redução do número de bactérias e de seus metabólitos, resultando em menor competição por nutrientes com o hospedeiro (HARDY, 2002)(IMMERSEEL et al., 2004), enquanto a ação do probiótico está relacionada com a inibição de bactérias específicas (VILÀ et al., 2010).

Existem evidências de que probióticos e OEs também podem elevar a secreção de enzimas pancreáticas e promover melhorias na morfometria intestinal, como aumento das vilosidades que podem beneficiar a digestibilidade dos nutrientes (KIEN et al., 2007; WINDISCH et al., 2008; ALIAKBARPOUR et al., 2012; MURUGESAN, GABLER, et al., 2014; MURUGESAN, ROMERO, et al., 2014). Probióticos também podem secretar enzimas e assim aumentar a quebra de moléculas de carboidratos e proteínas (WANG e GU, 2010; RAY et al., 2012) disponibilizando açúcares e aminoácidos no intestino. A composição dos substratos disponíveis para as bactérias pode afetar a proliferação bacteriana total e também de cepas específicas no intestino (DEPLANKE; GASKINS, 2001), podendo afetar também a produção e composição do muco (FORDER et al., 2007; AZZAM et al., 2011). O muco interage com a microbiota devido a sua composição rica em carboidratos e pelos nutrientes exógenos nele presentes (DEPLANKE; GASKINS, 2001), provendo ambiente e substratos

favoráveis ao estabelecimento da microbiota comensal (ALIAKBARPOUR et al., 2012).

A população de bactérias no intestino atua em simbiose com o hospedeiro, regulando aspectos como, eficiência de absorção, tempo de passagem do alimento, utilização de nutrientes, maturação intestinal, colonização por patógenos, integridade intestinal, imunidade, bem como disponibiliza vitaminas e energia para o hospedeiro (AMIT-ROMACH et al., 2004; OVIEDO-RONDÓN, 2009). A comunidade microbiana intestinal pode ser dividida em duas subpopulações, uma associada à mucosa e a outra dispersa no conteúdo do lúmen. A primeira é altamente especializada e com habilidade de influenciar a estrutura funcional da mucosa, e a segunda diretamente relacionada com os alimentos ingeridos, participando de sua hidrólise e fornecendo nutrientes para si e o hospedeiro (LUNEDO et al., 2014).

A maior parte dos estudos da sucessão da comunidade microbiana intestinal em frangos envolve o conteúdo do íleo e do ceco (LU et al., 2003; WISE e SARAGUSA, 2007). Os trabalhos que caracterizam a população bacteriana no íleo mostram que populações de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* são as de maior ocorrência, seguidas por membros do grupo *Enterococcus* (WISE e SARAGUSA, 2007; LUNEDO et al., 2014).

Embora muitos fatores estejam envolvidos na regulação da microbiota intestinal, como pH, localização e idade (APAJALAHTI et al., 2004), a dieta é o maior determinante do perfil microbiano (OVIEDO-RONDÓN, 2009). Pesquisas da microbiota frente à suplementação com aditivos alimentares concentra-se nos APCs (WISE e SARAGUSA, 2007). Ainda não está claro se os APCs reduzem ou não a microbiota Gram+ no intestino dos animais, pois foram reportados reduções (VAN ASSCHE et al., 1974; VERVAEKE et al., 1979; ENGBERG et al., 2000; KNARREBORG et al., 2002) e elevações (COLLIER et al., 2003; DUMONCEAUX et al., 2006) destas bactérias com o uso de APCs em animais. Até o presente momento a microbiota associada à mucosa do íleo de frangos suplementados com aditivos foi pouco estudada, especialmente a adição de *Bacillus subtilis* e OEs isolados ou combinados. Em suínos os OEs promoveram redução da relação *Enterobacteriaceae/Lactobacillus* estudo no ceco e assim a saúde intestinal dos animais, contudo tanto os OEs, como a avilamicina não alterou o número total de bactérias (CASTILLO et al., 2006).

O presente estudo investigou os efeitos da avilamicina e da adição isolada ou combinada de *Bacillus subtilis* e de uma mistura de OEs (carvacrol, cinamaldeído, cineol e pimenta extrato) na morfometria intestinal do jejuno, e na quantificação do gene 16S DNAr de grupos bacterianos específicos presentes na mucosa do íleo de frangos de corte entre 1 e 42 dias de idade.

II MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local, animais e dieta

O local, as aves, o desenho experimental, as dietas e o manejo utilizados foram os mesmos descritos no Capítulo 2, nos itens “2.1, Local” e “2.2 Animais, dieta e manejo”, exceto que para as análises da microbiota foram utilizadas apenas 4 repetições por tratamento. Além disso, a coleta das amostras deste experimento foi realizada em aves diferentes daquelas utilizadas para as análises do Capítulo 2.

2.2. Coleta de amostras

Aos 7, 21 e 42 dias uma ave de cada repetição (seis aves por tratamento) foi abatida por deslocamento cervical, após jejum alimentar de 8 horas, para a análise dos parâmetros morfométricos intestinais. O jejuno foi delimitado desde a alça duodenal até o divertículo de Meckel e em seguida isolado do restante do intestino. Um fragmento de aproximadamente 10 cm de comprimento da região medial do jejuno foi isolado, aberto longitudinalmente e fixado imediatamente em formol a 10%, tamponado com fosfato pH 7.4 por 24 horas. Em seguida as amostras seguiram para o laboratório de microscopia óptica.

Para a análise da microbiota associada a mucosa foram utilizadas amostras de quatro repetições por tratamento, sendo que cada amostra foi formada pelo material colhido de três aves (“pool”), totalizando 12 aves por tratamento em cada momento de coleta. O número de animais foi determinado seguindo recomendações de ZHOU et al. (2007), que estudou diferentes tamanhos de amostragem para a garantia de variabilidade em análises de microbiota de amostras intestinais de frangos de corte.

As aves foram abatidas por deslocamento cervical na ausência de jejum e o trato gastrointestinal foi exposto. O íleo foi delimitado desde o divertículo de Meckel até

a união íleo-cecal e em seguida separado por ligaduras, isolado e acondicionado em uma placa de petri contendo PBS esterilizado (8mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄; pH 7,4). As placas com os segmentos foram mantidas em ambiente resfriado e com fluxo contínuo de CO₂ durante o transporte do galpão para o laboratório e até o início da manipulação da amostra para a formação do pélete bacteriano. Este cuidado foi tomado com a finalidade de diminuir a proliferação das colônias presentes nos tecidos coletados e também evitar a proliferação de bactérias aeróbias não colonizadoras do trato durante o período entre a coleta das amostras e sua manipulação laboratorial.

2.3. Morfometria da mucosa do intestino delgado

As amostras foram fixadas em formol 10% (tamponado com fosfato pH 7.4) por 24 horas. Em seguida, cada fragmento de jejuno foi lavado em álcool 70% para retirada do fixador e, posteriormente, desidratado em série de concentração crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizado em xilol e infiltrado em parafina. Foram feitos cinco cortes histológicos semi-seriados de 5µm de espessura. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados. Em seguida, incubados em ácido periódico 0,5% por 15 minutos, lavados e incubados com reagente de Schiff, por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas lavagens, uma com água sulfurosa (10mL de metabissulfito de sódio, mais 10 mL ácido clorídrico 1N com 200 mL de água destilada), outra com água corrente seguida por água destilada. Após esta bateria de coloração, os cortes foram desidratados, diafanizados e finalmente as lâminas foram montadas. As análises morfométricas. Imagens dos cortes com 50x e 200x de aumento foram capturas utilizando um sistema de análise de imagens¹ e foram analisadas utilizando-se o programa Image J (COLLINS, 2007). As variáveis estudadas foram: altura dos vilos (AV), profundidade das criptas (PC) e número de células caliciformes (NCC). Para AV e PC utilizou-se as imagens com 50x de aumento, sendo que foram realizadas 30 mensurações/variável/ave. O número de células caliciformes (PAS+) foi determinado com base nas imagens com aumento de 200x, ao longo de 200 µm na parte média do vilos, em um total de 10 vilos por amostra.

¹ LEICA: Microscópio DM2500, câmera digital DFC280 e Leica QWin Software.

2.4. Análise da microbiota intestinal

2.4.1. Preparo do “pellet” bacteriano

Para a análise da microbiota associada à mucosa do íleo realizou-se a concentração da fração bacteriana das amostras, de acordo com a metodologia de Gong et al. (2002). Neste procedimento, depois de retirado o conteúdo presente no lúmen, uma porção de 10cm da região mediana de cada segmento intestinal do “pool” amostrado foi aberta longitudinalmente, presa em uma placa limpa, lavada com solução PBS e colocada em tubo Falcon com 30mL de solução PBS (1% Tween80). Após agitação vigorosa por um minuto, os segmentos de cada “pool” foram retirados do tubo e a solução centrifugada a 27000g por 20 minutos, formando um pélete bacteriano. Os péletes foram ressuspensos em TE 10:1 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8,0), centrifugados a 16800rpm por 20 minutos, o sobrenadante descartado e os péletes bacterianos congelados a -80°C até a extração de DNA. Segundo o autor a metodologia de coleta é capaz de recuperar mais de 95% das células bacterianas presentes no material coletado.

2.4.2. Extração de DNA das amostras de microbiota intestinal

A extração do DNA total das amostras coletadas foi realizada com o AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit® (Axygen), seguindo as instruções do fabricante. Uma alíquota de 25 mg do pélete bacteriano foi pesada e dissolvida em 150µL do “buffer” S (contendo RNase A) por vigorosa homogeneização em “vortex”. Foram adicionados 20µL da enzima lisozima (50mg/mL), os tubos homogeneizados e incubados a 37°C durante 30 minutos. Adicionou-se também 25µL da enzima proteinase K (20mg/mL), seguido de homogeneização e nova incubação a 55°C durante 30 minutos. Foram adicionados 30µL de EDTA (0,25M; pH 8,0), as amostras incubadas no gelo por 5 minutos, seguidos de adição de 450µL de “buffer” G-A (responsável pela finalização da lise das células bacterianas e exposição do DNA), agitação no “vortex” por 15 segundos e incubação a 65°C por 10 minutos. Após a lise, adicionou-se 400µL do “buffer” G-B, o qual se complexa com as proteínas presentes na amostras, e 1mL do “buffer” DV, que separa o DNA das proteínas complexadas. Após centrifugação, a fase superior, contendo o tampão e as proteínas foi descartado e mais 1mL do “buffer” DV adicionado, repetindo a centrifugação. A fase superior com o tampão foi novamente descartada, e a fase inferior, contendo o DNA extraído,

recuperada e transferida para um “spin-filter”, passando por posterior centrifugação. Ao centrifugado, foram adicionados 400µL do “buffer” de ligação BV, a solução homogeneizada e transferida para uma coluna, seguido de posterior centrifugação. Descartou-se o filtrado e foram realizadas: uma lavagem com o “buffer” W1 e duas lavagens com o “buffer” W2. Após as lavagens, a coluna foi transferida para um novo tubo e o DNA eluído da coluna pela adição de 50µL água ultrapura aquecida a 65°C. A qualidade do DNA extraído foi verificada, uma amostra de trabalho diluída a 10ng/µL para os procedimentos iniciais, e as amostras concentradas congeladas a -20°C. A concentração das amostras de DNA foi determinada mediante leitura da absorbância em espectrofotômetro (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 260nm e por fluorometria (Qubit 1.0 fluorometer®, Life Technologies). Foram avaliadas também as relações dos comprimentos de onda 260/280 e 260/230 pelo espectrofotômetro, a primeira estima a contaminação por proteínas, a segunda por sais (SAMBROOK et al., 1989).

A partir da quantificação por fluorometria, as amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de 1,25 ng/µL em água ultrapura, e estas soluções de trabalho armazenadas a 20°C para a utilização no ensaio de qPCR.

2.4.3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados e cobertura de estirpes

Para a realização do ensaio de PCR quantitativo, foram escolhidos quatro conjuntos de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores) previamente descritos na literatura (Tabela 1). Foram escolhidos primers que contemplam os principais grupos bacterianos presentes no intestino proximal de frangos de corte, para possibilitar a análise das variações globais na microbiota deste ambiente.

Tabela 1. “Primers” utilizados nas reações de qPCR.

Microorganismo Alvo	T. am. (pb) ¹	T. an. (°C) ²	T. m. (°C) ³	Sequência (5´3´)	Referência
Grupo Bacteroides-Prevotella	418	59		F ⁴ : GAAGGTCCCCCACATTG R ⁵ : CAATCGGAGTTCTTCGTG	Bartosch et al. (2004)
Família <i>Enterobacteriaceae</i>	195	63	82,9	F: ATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	Bartosch et al. (2004)
Gênero <i>Enterococcus spp.</i>	144	61	80,4	F: CCCTTATTGTTAGTTGCCATATT R: ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	Rinttila et al. (2004) Heilig et al. (2002)
Grupo <i>Lactobacillus</i>	341	58	82,6	F: CACCGCTACACATGGAG R: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	Walter et al. (2001)

¹T. am.: Tamanho do “amplicon” em pares de bases.

²T. an.: Temperatura de anelamento dos oligos para qPCR.

³T. m.: Temperatura média de melting dos “amplicons” obtidos a partir das curvas de dissociação.

⁴F: “forward” “primer”

⁵R: “reverse” “primer”

Bartosch et al. (2004) confirmaram a especificidade do conjunto de primer para o grupo Bacteroides-Prevotella com cepas de *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Bacteroides vulgatus*. Os mesmos autores confirmaram a especificidade do conjunto de primer para a Família *Enterobacteriaceae* com cepas de *Escherichia*, *Shigella* e *Salmonella*. Além destes gêneros, este grupo também inclui gêneros como *Yersinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus* e *Serratia*.

Heilig et al. (2002), Rinttila et al. (2004) e Walter et al. (2001), verificaram a especificidade do conjunto de primers para o grupo *Lactobacillus*, e confirmaram a amplificação das seguintes cepas: *L. acetotolerans*, *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. alimentarius*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. aviarius*, *L. bifementans*, *L. brevis*, *L. buchnei*, *L. casei*, *L. collinoides*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fermentus*, *L. fructivorans*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. kefirii*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mucosae*, *L. murinus*, *L. oris*, *L. panis*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. ruminis*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. sharpeae*, *L. vaginalis*, *L. zaeae*. Além destas, este primer também anelou com os gêneros *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.* e *Weissella spp.*

Para o gênero *Enterococcus spp.*, Rinttila et al. (2004) verificaram a especificidade do conjunto de primer com as cepas: *E. asini*, *E. avium*, *E. azikeevi*, *E. 27 canis*, *E. casseliflavus*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermanniensis*, *E. hirae*, *E.*

malodoratus, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. rottae*, *E. saccharolyticus*, *E. villorum*.

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados também foi avaliada *in silico*, utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e, posteriormente pelo sequenciamento de “amplicons” obtidos nas reações de PCR realizadas com amostras de DNA do presente estudo. Além disso, após a amplificação e clonagem em vetor plasmídeo, a especificidade foi reconfirmada pelo sequenciamento de “amplicons” obtidos nas reações de PCR realizadas com amostras de DNA do presente estudo.

2.4.4. Amplificação das amostras de DNA genômico

As amostras de DNA genômico foram amplificadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Para cada reação de PCR, utilizaram-se 50ng de DNA genômico, tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 66ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5U de taq DNA polimerase e água ultra-pura para um volume final de 50µL. A reação de PCR foi realizada utilizando a seguinte sequência de termo-ciclos: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para cada primer (Grupo *Lactobacillus* 52°C; Família *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus spp.* 62°C; Domínio *Bacteria* 60°C) por 40 segundos, 72°C por 1:30 minutos e 72°C por 7 minutos. Os “amplicons” gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 2%, diluído em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM; pH 8,0), conforme as recomendações de Sambrook e Russell (2001). Previamente à clonagem os produtos de PCR foram purificados através do Kit MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN), conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

2.4.5. Clonagem em vetor plasmídeo TOPOTA®

Após a obtenção dos “amplicons” os fragmentos amplificados por PCR foram clonados utilizando o kit comercial TOPOTA® (Invitrogen), específico para clonagem de produtos de PCR, seguindo as instruções do fabricante. Após a inserção, 3µL da reação de ligação foram adicionados a células quimicamente competentes de *Escherichia coli* DH10β, a solução incubada no gelo por 30 minutos, e um choque térmico provocado colocando os tubos em banho-Maria a 42°C por 45 segundos,

inserindo assim o plasmídeo na célula competente. Para recuperação e multiplicação das células transformadas, foi adicionado 1mL de meio SOC (triptona, extrato de levedura, 9,2mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 37mM MgCl₂, 0,75% de glicose), e os tubos incubados a 37°C, com agitação constante de 220rpm durante 90 minutos.

Placas de Petri foram preparadas com meio de cultura 2xTY (1,2% de ágar), acrescido de 50µg/mL do antibiótico canamicina. Após solidificação do meio, 40µL de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e 25µL de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) foram espalhados sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, com o objetivo de identificar as colônias de bactérias que continham o inserto ligado ao vetor plasmídeo. Após secagem da solução IPTG – X-GAL, 200µL das células transformadas cultivadas em meio SOC foram aplicados nas placas de Petri com o auxílio de uma alça de Drigalski, e as placas incubadas a 37°C durante 12 – 16 horas.

2.4.6. Cultivo de clones bacterianos e extração de DNA plasmidial

Uma colônia positiva (contendo o inserto) e isolada de cada placa foi coletada com o auxílio de palitos de madeira esterilizados e transferida para um tubo contendo meio de cultura 2xTY, acrescido de 50µg/mL do antibiótico canamicina. O meio foi incubado sob agitação constante (220rpm), a 37°C, durante 12 – 16 horas.

O DNA plasmidial dos clones foi extraído por lise alcalina seguindo protocolo estabelecido por Sambrook e Russel (2001). Uma alíquota de 2mL de colônia multiplicada em meio líquido foi transferida para um novo tubo, e centrifugada a 12000g por 1 minuto, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano ressuspendido em 200µL de tampão GET (50mM glicose, 25mM Tris, 10mM EDTA; pH 8,0), contendo RNase A, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 200µL da solução II (0,2M NaOH, 1% SDS), seguido de incubação em gelo por 5 minutos, adição de 150µL da solução III (acetato de potássio 3M; pH5,5), e incubado novamente no gelo por 5 minutos. Este processo visou a separação do DNA plasmidial do DNA genômico da bactéria, de forma que, na centrifugação que se segue no protocolo, ocorreu a precipitação do DNA genômico complexado com proteínas, enquanto o DNA plasmidial permaneceu no sobrenadante, o qual foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 500µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e a solução centrifugada a 12000g, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e uma segunda extração com clorofórmio foi realizada.

Ao sobrenadante recuperado, foi adicionado 1mL de etanol absoluto e a solução incubada “overnight” a -20°C para precipitação do DNA plasmidial. Após a incubação, a solução foi centrifugada a 12000g, por 5 minutos, a 4°C, e o pellet resultante mantido e lavado com 500µL de etanol 70%. Após a lavagem, o pellet foi seco sob vácuo para total evaporação do etanol, e ressuspendido em 50µL de água ultra-pura. A concentração de DNA nas amostras foi mensurada espectrofotometricamente através do aparelho NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific), e as amostras diluídas para uma solução de trabalho de concentração 100ng/µL, a qual foi encaminhada para sequenciamento.

2.4.7. Sequenciamento dos clones e comprovação da especificidade dos “primers”

A reação de sequenciamento foi realizada com a enzima AmpliTaq polimerase e BigDye Terminator (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores M13, específicos para a região do vetor TOPO TA (Invitrogen) que flanqueia o inserto. O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation). As sequências “forward” e “reverse” foram filtradas respeitando um mínimo de 85% de correspondência entre as sequências e sobreposição mínima de 20%. Em seguida, com auxílio do programa Chromas 1.45 (Griffith University, Australia) a localização exata dos primers foi encontrada. Utilizando a ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o fragmento clonado foi comparado com as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), admitindo-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da sequência.

Após confirmação da sequência clonada, os plasmídeos foram purificados e preparados para confecção das curvas-padrão.

2.4.8. Purificação e linearização dos plasmídeos para a construção das curvas-padrão

O DNA plasmidial foi aplicado em gel de agarose padrão a 1,5% fundido em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA; pH 8,0), seguindo as recomendações de Sambrook e Russell (2001). As bandas de DNA plasmidial

visualizadas foram identificadas e cortadas do gel com auxílio de lâmina estéril. Então, o DNA plasmidial presente no fragmento de gel foi purificado utilizando o kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN), conforme o protocolo descrito no kit.

Com base no mapa da região do gene “LacZ operon” do vetor utilizado e o auxílio do programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation), foi verificada a inexistência de sítios de restrição para as enzimas candidatas nas sequências dos insertos clonados. Os plasmídeos foram linearizados com a enzima de restrição *Bam*HI. Para a reação de restrição, incluiu-se 5µL de 10X “fast digest buffer” (Fermentas), 1µg de DNA plasmidial, 3µL da enzima *Bam*HI e água ultra-pura para um volume final de 50µL de reação. Os tubos foram incubados a 37°C durante 3 horas e então a enzima inativada por incubação de 20 minutos a 80°C. Uma alíquota de 2µL do produto da reação de restrição foi visualizado em gel de agarose padrão a 1,5% fundido em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA; pH 8,0), em corrida realizada seguindo as recomendações de Sambrook e Russell (2001).

Após confirmação da digestão total, os plasmídeos linearizados foram purificados com o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), seguindo recomendações do fabricante.

2.4.9. Construção da curva padrão e quantificação absoluta

As curvas-padrão foram construídas a partir de plasmídeos linearizados, contendo o inserto alvo previamente confirmado por sequenciamento. A partir da soma do tamanho do inserto e do vetor plasmidial, calculou-se o número de cópias do gene em cada ponto da curva-padrão a partir da seguinte equação:

$$Y_{\text{moléculas/reação}} = \frac{x \text{ g de DNA}}{\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde: tamanho do plasmídeo corresponde a soma do vetor mais o inserto; 660 é a média do peso molecular em Daltons de um par de bases de DNA dupla fita; $6,022 \times 10^{23}$ é a constante de Avogadro.

Para cada gene sob estudo foi gerada uma curva-padrão, através de 7 diluições do DNA de plasmídeo contendo o inserto específico com concentrações de $1,94 \times 10^{-1}$ a $1,94 \times 10^{-7}$ ng/µL para *Enterobacteriaceae*, $1,88 \times 10^{-1}$ a $1,88 \times 10^{-7}$ ng/µL para Grupo *Lactobacillus* e $2,02 \times 10^{-1}$ a $2,02 \times 10^{-7}$ ng/µL para Gênero *Enterococcus*. Não se

construiu a curva-padrão para *Bacteroides-Prevotella*, pois durante a padronização das reações, as amostras médias testadas (uma amostra por tratamento por idade de coleta) apresentaram valor de CT acima do limite de detecção. Assim, não se efetuou a quantificação deste grupo bacteriano nas amostras de mucosa.

2.4.10. Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um equipamento GeneAmp 7900 (Applied Biosystems®), em um volume final de 12,5 µl contendo 1,25 µl de água livre de DNA, 6,75 µl de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem), 2,5 µl (100 mM/µl) de cada oligonucleotídeo iniciador e 2 µl da amostra de DNA. Para o grupo *Lactobacillus* a concentração dos “primers” foi alterada para 200 mM/µl. As condições de amplificação incluíram um período inicial de 50°C por 2 minutos, depois 10 minutos a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento específica (Tabela 1) por 1 minuto. Ao final da reação foi empregado um ciclo de vinte minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da amplificação.

2.4.11. Análise de “threshold” e eficiência das curvas-padrão

Os valores de CT foram obtidos e analisados pelo software 7900 System SDS v2.4 (Applied Biosystems). Para definição do “threshold” de cada curva-padrão, foi realizada análise conjunta da eficiência destas curvas, a partir do valor de “slope”, referente à inclinação da reta, conforme equação abaixo.

$$e = 10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}}\right)} - 1$$

Onde: e = eficiência

Todas as curvas apresentaram valor de “slope” entre -3,6 e -3,1, ou seja os valores de eficiência ficaram entre 90 e 110% conforme recomendado por (LIVARK e SCHMITTGEN, 2001), exceto a do gênero *Enterococcus spp.* que ficou com eficiência de 88%. Apesar disso, as comparações entre idades e tratamentos foram mantidas, já que a subestimação é da curva-padrão e, portanto, proporcional para todas as amostras.

Após definido na curva-padrão, o “threshold” foi aplicado às demais placas de mesmo grupo bacteriano, os valores das amostras controle comparadas e, havendo concordância, os valores de CT de todas as amostras guardados. Além disso para

cada curva também foi definida uma faixa de detecção, a partir da análise das curvas de dissociação e dos controles negativos. Todas as amostras testadas caíram dentro da faixa de detecção dos alvos estudados.

A partir das curvas de amplificação obtidas, os valores de “threshold” para cada placa foram ajustados, de forma que a eficiência das curvas-padrão atingisse o valor de 100%. Os “slopes”, as equações e demais informações sobre as curvas-padrão estão na Tabela 2.

Tabela 2. Equações das curvas-padrão e valores de “slope”, r^2 e eficiência dos grupos bacterianos estudados.

Grupo de bactérias	“Slope”	Equação	r^2	e
Família <i>Enterobacteriaceae</i>	- 3,4380243	$Y = -3,4380243x + 35,43786$	0,99937785	0,9537
Gênero <i>Enterococcus spp.</i>	-3,652789	$Y = -3,652789x + 36,5278900$	0,9992876	0,8783
Grupo <i>Lactobacillus</i>	- 3,3329866	$Y = -3,3329866x + 34,063400$	0,9938435	0,9954

e = eficiência da reação de PCR

Após todas as análises, os valores de CT foram transformados em número de cópias a partir da equação linear resultante das curvas-padrão estimadas, pela seguinte fórmula:

$$N = 10^{\frac{(CT-b)}{a}}$$

Onde: N = número de cópias na amostra; CT = ciclo de “threshold”; a = slope; b = intercepto.

2.5. Análise estatística

A análise estatística neste trabalho foi a mesma descrita para as variáveis laboratoriais do Capítulo 2 (item 2.8), exceto que neste capítulo efetuou-se as comparações entre tratamentos pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

III RESULTADOS

3.1. Morfometria intestinal

A morfometria intestinal (altura de vilos, profundidade de cripta, relação vilo/cripta e número de células caliciformes) de frangos foram avaliados aos 7, 21 e 42 dias de idade. Foram observadas interações significativas entre dieta e idade para as variáveis PC (0,0168) e AV/PC (0,0006) e efeito principal da idade sobre a AV ($P < 0,0001$) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da análise de variância das variáveis morfométricas estudadas através de um modelo linear misto.

Efeitos	GL	Valores de P			
		AV	PC	AV/PC	NCC
Tratamento	4	0,3842	0,4311	0,0484	0,9688
Idade	2	<,0001	0,0013	<,0001	0,0584
Interação	8	0,2795	0,0168	0,0006	0,0650

Os valores de P representam a soma de quadrados do tipo III.

Efeito significativo encontra-se destacado em negrito.

GL = graus de liberdade.

AV = Altura de vilos.

PC = Profundidade de cripta.

AV/PC = Relação vilo/cripta.

NCC = Número de células caliciformes.

Tabela 4. Morfometria da mucosa do jejuno de frangos de corte (N=6) aos 7, 21 e 42 dias de idade.

	Altura de vilos, μm					
	Tratamento					
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	Média ¹
Idade						
7	837	786	805	861	813	820 \pm 26 B
21	1240	1320	1240	1308	1178	1257 \pm 32 A
42	1398	1545	1335	1221	1359	1372 \pm 40 A
Média ¹	1158 \pm 45	1217 \pm 39	1127 \pm 39	1130 \pm 41	1117 \pm 44	

	Profundidade de cripta, μm					
	Tratamento					
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	Média
Idade						
7	168	169 B	163	134 B *	144	156 \pm 3
21	182	148 B	170	170 A	164	167 \pm 5
42	179	193 A	171	195 A	174	182 \pm 5
Média	176 \pm 6	170 \pm 5	168 \pm 5	166 \pm 6	160 \pm 6	

	Relação vilo/cripta, $\mu\text{m}/\mu\text{m}$					
	Tratamento					
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	Média
Idade						
7	4,96 B	4,65 B	4,93 B	6,42 *	5,69 B	5,33 \pm 0,14
21	6,78 A	8,72 A *	7,02 A	7,56	7,20 A	7,46 \pm 0,23
42	6,87 A	8,092 A	7,37 A	6,32	7,84 A	7,30 \pm 0,27
Média	6,20 \pm 0,23	7,16 \pm 0,25	6,44 \pm 0,24	6,77 \pm 0,35	6,91 \pm 0,25	

	Número de células calciformes, em 200 μm					
	Tratamento					
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	Média
Idade						
7	8,30	9,50	9,00	9,50	8,83	9,03 \pm 0,18
21	9,38	8,78	8,64	7,88	8,50	8,64 \pm 0,20
42	8,66	7,97	8,18	8,43	8,88	8,42 \pm 0,14
Média	8,78 \pm 0,23	8,75 \pm 0,23	8,61 \pm 0,22	8,60 \pm 0,23	8,74 \pm 0,23	

¹Média \pm erro padrão da média.

^{A,B}Valores seguidos de letras iguais não diferem nas comparações entre idades pelo teste T (P < 0,05).

* indica diferença significativa pelo teste de Dunnet (p < 0,05).

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina.

Os tratamentos não influenciaram a altura das vilosidades e o número de células caliciformes nas três idades avaliadas (Tabela 4). Contudo, menor profundidade de criptas foi observada nas aves do tratamento OEs quando comparado ao controle aos 7 dias de idade ($P < 0,05$), o que contribuiu para a elevação na relação vilo/cripta na mesma idade ($P < 0,05$). Também foi observada maior relação vilo/cripta nas aves do tratamento BS que nas aves controle aos 21 dias de idade ($P < 0,05$).

A profundidade de criptas e a relação vilo/cripta sofreram alteração ao longo do tempo de acordo com o aditivo alimentar na dieta (Tabela 4). Neste sentido, a profundidade de criptas nas aves alimentadas com BS sofreu aumento de 21 para 42 dias ($P < 0,05$), enquanto nas aves recebendo OEs tiveram elevação da profundidade das criptas entre 7 e 21 dias ($P < 0,05$) (Tabela 4). Por outro lado, a relação vilo/cripta sofreu aumento de 7 para 21 dias em todos os tratamentos ($P < 0,05$), exceto no OEs que apresentou relação vilo/cripta constante nas três idades de coleta (Tabela 4).

Efeito principal de idade foi verificado para a altura de vilos, que sofreu aumento de 7 para 21 dias ($P < 0,05$), mantendo-se estável até o final do experimento (Tabela 4).

3.2. Microbiota presente na mucosa intestinal

A influência da dieta e da idade no número de cópias da região variável do gene 16S DNAr para a família *Enterobacteriaceae*, gênero *Enterococcus sp* e grupo *Lactobacillus* foi avaliada na mucosa do íleo de frangos aos 7, 21 e 42 dias e os resultados da análise de variância encontram-se na Tabela 5. Adicionalmente, foram criadas figuras com o número de cópias/g de mucosa de cada grupo considerando-se a média de todos tratamentos em cada idade (Figura 1), ou com o valor separado por tratamento (Figura 2).

Tabela 5. Resultados da análise de variância do número de cópias do gene 16S para os grupos bacterianos estudados através de um modelo linear misto.

Efeitos	GL	Valores de P			E/L
		<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Grupo	
		<i>e</i>	<i>spp.</i>	<i>Lactobacillus</i>	
Tratamento					0,0998
o	4	0,1117	0,0650	0,0382	
Idade	2	0,0572	<,0001	0,0004	0,0005
Interação	8	0,0971	0,0064	0,2239	0,4996

Os valores de P representam a soma de quadrados do tipo III.

Efeito significativo encontra-se destacado em negrito.

GL = graus de liberdade.

E/L = relação *Enterobacteriaceae/Lactobacillus*

As contagens do gene 16S relacionadas à família *Enterobacteriaceae* não variaram entre tratamentos (Tabela 6), bem como não sofreram alteração ao longo das idades de coleta.

Efeito principal de tratamento foi verificado no número de cópias do gene 16S do grupo *Lactobacillus*, com menor número de cópias nas aves do tratamento BS+OEs que no controle ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Foi verificada interação significativa entre dieta e idade para o número de cópias do gene 16S do gênero *Enterococcus spp.* (Tabela 5). O desdobramento da interação mostrou que, aos 21 dias de idade, as aves do tratamento AVI apresentaram maior número maior de cópias de 16S do gênero *Enterococcus spp.* que o controle ($P < 0,05$). Além disso, todos os tratamentos apresentaram redução de *Enterococcus spp.* de 7 para 21 dias (2,28 vezes em média). Entre 21 e 42 dias, a contagem de 16S de *Enterococcus spp.* se estabilizou nos tratamentos CON, BS e BS+OEs, sofrendo aumento no tratamento OEs ($P < 0,05$) e redução nas aves do AVI ($P < 0,05$).

O número de cópias de 16S de *Lactobacillus* foi maior aos 7 dias que aos 21 e 42 dias, sendo que houve aumento de 21 para 42 dias ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Número de cópias¹ bacterianas da família *Enterobacteriaceae*, do Gênero *Enterococcus spp.* e do Grupo *Lactobacillus* e relação *Enterobacteriaceae* /*Lactobacillus* na mucosa do íleo de frangos de corte (N=4) aos 7, 21 e 42 dias de idade.

Família <i>Enterobacteriaceae</i>						
Idade	Tratamento					Média ²
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	
7	2,57	2,66	2,59	2,66	2,73	2,64 ± 0,04
21	2,52	2,33	2,51	2,56	2,79	2,54 ± 0,05
42	2,37	2,64	2,37	2,37	2,49	2,45 ± 0,06
Média ²	2,49 ± 0,05	2,54 ± 0,05	2,49 ± 0,05	2,53 ± 0,06	2,67 ± 0,06	

Gênero <i>Enterococcus spp.</i>						
Idade	Tratamento					Média
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	
7	4,61 A	3,61 A	4,19 A	4,43 A	4,32 A	4,23 ± 0,14
21	1,67 B	1,54 B	1,78 B	1,68 C	2,56 B*	1,85 ± 0,09
42	1,62 B	1,76 B	1,82 B	2,35 B	1,5 C	1,81 ± 0,10
Média	2,64 ± 0,12	2,30 ± 0,13	2,60 ± 0,12	2,82 ± 0,15	2,80 ± 0,13	

Grupo <i>Lactobacillus</i>						
Idade	Tratamento					Média
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	
7	4,81	4,46	4,34	4,31	4,43	4,47 ± 0,10 A
21	3,69	3,06	3,36	3,61	4,06	3,55 ± 0,10 C
42	3,93	4,16	3,70	4,01	4,48	4,05 ± 0,10 B
Média	4,14 ± 0,13	3,89 ± 0,12	3,80 ± 0,12*	3,98 ± 0,12	4,32 ± 0,13	

Família <i>Enterobacteriaceae</i> /Grupo <i>Lactobacillus</i>						
Idade	Tratamento					Média
	CON	BS	BS + OEs	OEs	AVI	
7	0,53	0,60	0,60	0,65	0,62	0,60 ± 0, 01 B
21	0,68	0,76	0,75	0,71	0,69	0,72 ± 0,01 A
42	0,60	0,64	0,64	0,59	0,56	0,61 ± 0,03 B
Média	0,61 ± 0, 02	0,67 ± 0, 02	0,66 ± 0, 02	0,65 ± 0, 02	0,62 ± 0, 02	

¹log₁₀ do número de cópias do gene 16S DNAr em 2,5ng de DNA genômico;

²Média ± erro padrão da média.

A,B,CValores seguidos de letras iguais não diferem nas comparações entre idades pelo teste T (P < 0,05).

* indica diferença significativa pelo teste de Dunnet (p< 0,05).

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina.

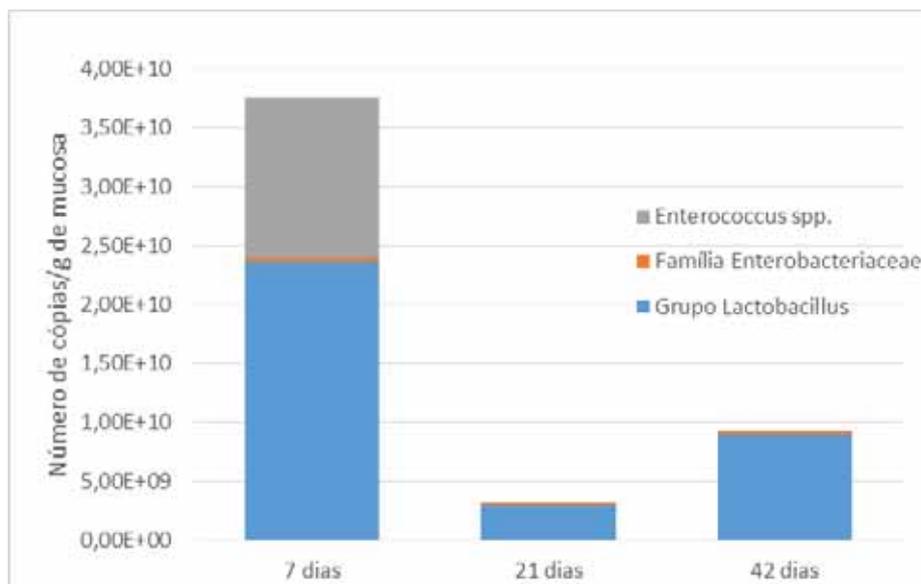


Figura 1. Valor total de cópias do gene 16 S rDNA genômico de cada um dos grupos estudados na mucosa do íleo de frangos de corte aos 7, 21 e 42 dias de idade.

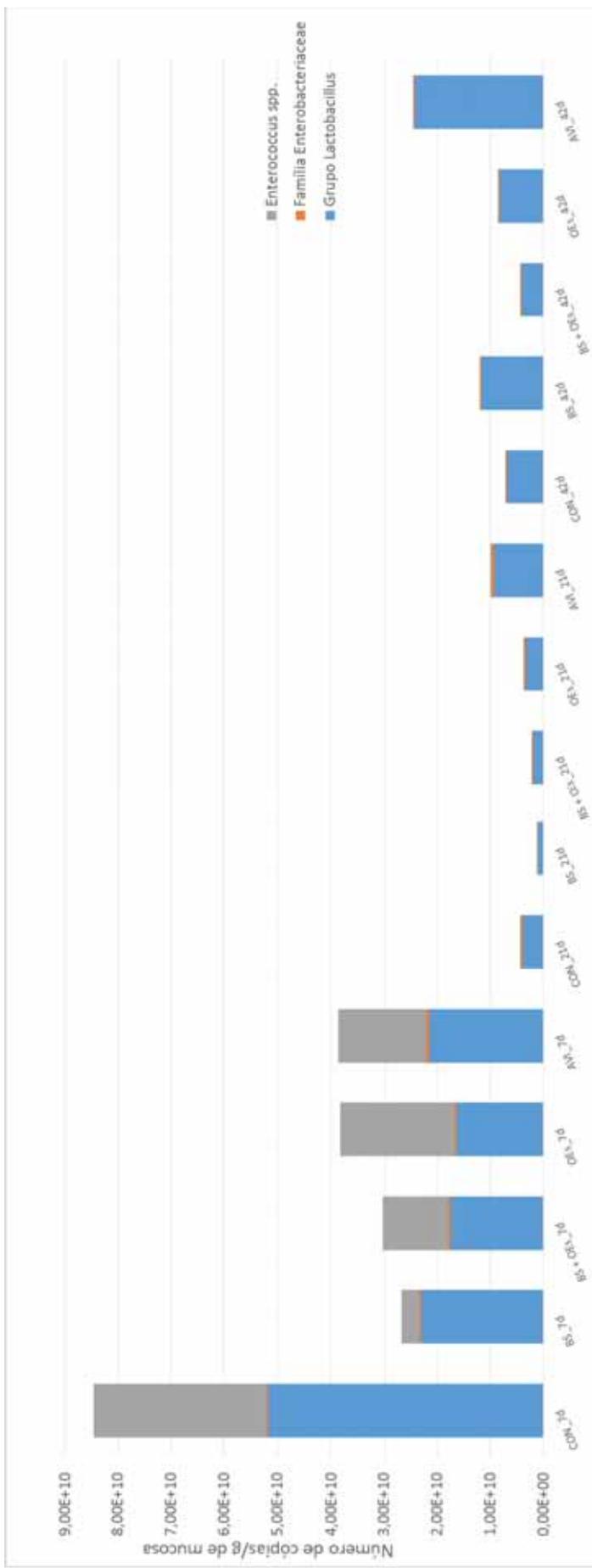


Figura 2. Valor total de cópias do gene 16 S rDNA genômico de cada um dos grupos estudados na mucosa do íleo de frangos de corte de acordo com os tratamentos, aos 7, 21 e 42 dias de idade.

CON = tratamento controle.

BS = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis*.

BS + OEs = tratamento suplementado com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais.

OEs = tratamento suplementado com óleos essenciais.

AVI = tratamento suplementado com avilamicina.

IV DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Morfometria intestinal

Efetuuou-se a análise temporal das variáveis morfométricas com a finalidade de se encontrar possíveis relações com as análises da microbiota. O desenvolvimento da mucosa intestinal já é bem conhecido em frangos, assim não foram feitas observações mais profundas a seu respeito. Foi verificado aumento da altura de vilos dos 7 aos 21 dias, que contribuiu para maiores médias da relação vilo/cripta e tendência de redução do número de células calciformes. Estudos morfométricos do intestino delgado de frangos já haviam indicado que a altura de vilos dobra nas primeiras 48 h após a eclosão, atingindo o pico entre seis e oito dias no duodeno, e após 10 dias no jejuno e no íleo (SKLAN, 2001). Foi sugerido que o aumento em área superficial do intestino tende a acompanhar alterações na altura das vilosidades, já que o crescimento da largura dos vilos é bem menor que o de sua altura (SKLAN, 2001). Desta forma, entre 7 e 21 dias provavelmente ocorreu aumento da capacidade de digestão e absorção intestinal em decorrência do aumento da área de superfície. A tendência de redução da contagem de células calciformes entre 7 e 21 dias provavelmente seja resultado da elevação na altura das vilosidades, conforme ocorrido em outros estudos (GEYRA et al., 2001).

Existem relatos na literatura indicando que uma das formas pela qual os APCs, probióticos e OEs promovem o ganho de peso, se dá pela melhora da estrutura física da mucosa intestinal (DEMIR et al., 2003; MURUGESAN; GABLER e PERSIA, 2014) (MANZANILLA et al., 2006), indiretamente a partir da modulação da microbiota intestinal. Neste sentido, o benefício com a elevação da altura das vilosidades envolve o aumento da área superficial da mucosa intestinal, que reconhecidamente leva a maior digestão e absorção de nutrientes pela maior expressão de enzimas e transportadores de membrana (PLUSKE et al., 1996).

Os dados de morfometria intestinal nesta pesquisa revelam que a suplementação com avilamicina, *Bacillus subtilis* ou OEs promoveu alterações pontuais nas variáveis morfométricas. A suplementação com OEs reduziu a profundidade das criptas aos 7 dias, elevando a relação vilo/cripta. Na mesma idade, também se verificou menor média de profundidade de cripta nas aves que receberam avilamicina. Redução na profundidade de cripta também foi encontrada por Demir et

al. (2003) em frangos suplementados com tomilho e aumento da relação vilo/cripta em suínos suplementados com uma combinação de óleos essenciais (OETTING et al., 2006). KROISMAYR et al. (2008) encontraram redução na profundidade de criptas no cólon de leitões em resposta a suplementação com avilamicina, e atribuíram seus achados à redução da atividade microbiana no local. Criptas menos profundas indicam reduzido “turnover” no epitélio intestinal, menor demanda para a formação tecidual, e gasto energético de manutenção (SAVAGE et al., 1997). Tais alterações podem ter ocorrido devido a ação antimicrobiana dos APCs e OEs, que possivelmente promoveu redução da atividade de bactérias específicas que perturbam a integridade da mucosa (HUGHES, 2003), uma vez que em termos absolutos, o número de cópias do 16S dos grupos estudados foi bem semelhante ao verificado nos tratamentos BS e BS + OE.

A menor profundidade de cripta e a maior relação vilo/cripta aos 21 dias nas aves alimentadas com *Bacillus subtilis* coincidiu com o momento em que a soma do número de cópias do 16S dos três grupos bacterianos estudados foi mais baixa considerando todo o experimento, o que pode ter contribuído para a menor profundidade de cripta em decorrência de uma menor extrusão na ponta das vilosidades. CHICHLOWSKI et al. (2007) encontraram redução de segmentos filamentosos como bactérias no jejuno de aves alimentadas com probiótico através da técnica de microscopia de varredura. Os mesmos autores, observaram camada de muco menos espessa e com menor densidade de bactérias nas aves tratadas com antibiótico (CHICHLOWSKI et al., 2007).

Grande atenção tem sido dada atualmente para o muco que reveste os enterócitos, o qual além de conferir proteção aos enterócitos pela redução do atrito proporcionado pelo bolo alimentar, fornece um ambiente adequado para o estabelecimento da microbiota comensal da ave e para os processos finais de digestão e absorção de nutrientes (DEPLANKE; GASKINS, 2001). É plausível afirmar que a composição e a taxa de produção de mucina, bem como os agentes que a modulam, são fatores decisivos na colonização por bactérias. Maior número de células indica, teoricamente, maior produção de mucina e, conseqüentemente, mais nutrientes para proliferação bacteriana. Jamroz et al. (2005) estudando a adição de mistura contendo princípios vegetais ativos (carvacrol, cinamaldeído e capsaicina) sobre a histologia e morfometria do proventrículo e jejuno observaram que frangos de corte alimentados com os OEs apresentaram intensa secreção de muco no proventrículo e na parede do jejuno, sugerindo a existência de propriedades protetoras das

vilosidades. Segundo os autores isto pode explicar a redução da adesão epitelial de *E coli*, *C. perfringens* e fungos no conteúdo intestinal das aves do estudo (JAMROZ et al., 2005). Pesquisas reportaram aumento do número de células caliciformes em suínos recebendo avilamicina (MANZANILLA et al., 2006) e aumento da expressão gênica do gene codificador da mucina intestinal (MUC 2) e da contagem de células caliciformes produtoras de mucina ácida em animais suplementados com *Lactobacillus* (ALIAKBARPOUR et al., 2012). Os dados da presente pesquisa não suportam estas evidências, ao menos no que se refere à contagem de células caliciformes produtoras de mucina neutra (PAS+).

Em linhas gerais, como as alterações encontradas nas variáveis morfológicas com o uso dos aditivos alimentares foram pontuais, não é possível afirmar se elas implicam em benefícios aos processos de digestão e absorção das aves.

4.2. Microbiota presente na mucosa intestinal

O presente estudo avaliou o perfil temporal de colonização de importantes grupos bacterianos na mucosa do íleo de frangos de corte. O número de cópias da Família *Enterobacteriaceae* manteve-se relativamente estável nos três momentos de coleta avaliados, como uma ligeira tendência de queda ($3,49 \times 10^8$, $2,77 \times 10^8$ e $2,47 \times 10^8$ cópias/g de mucosa, respectivamente aos 7, 21 e 42 dias) (Figura 1). Os *Lactobacillus* foram predominantes durante todo período experimental, enquanto os *Enterococcus* ocuparam parcela expressiva da população associada à mucosa do íleo aos 7 dias, perdendo esta condição em seguida. Os valores estão de acordo com trabalhos que estimaram o número de cópias destes grupos na mucosa do íleo de frangos com as mesmas idades pela técnica de qPCR (WISE e SIRAGUSA, 2007; LUNEDO et al., 2014). Wise e Saragusa (2007) também encontraram predominância de sequências de *Lactobacillus* no íleo, com números bem menores de representantes dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*.

Lunedo et al. (2014) não encontraram variação do número de cópias da Família *Enterobacteriaceae* em aves alimentadas com dieta a base de sorgo e farelo de soja nas mesmas idades avaliadas no presente estudo ($\pm 3 \times 10^8$ cópias/g de muco), contudo esta população sofreu redução de 61 vezes entre 7 e 42 dias (3×10^9 para 3×10^7 cópias/g de muco) nas aves alimentadas com a dieta contendo milho. Segundo os autores, com o avançar da idade, a capacidade das aves alimentadas com sorgo controlar a invasão das Enterobactérias é menor que das recebendo milho em

decorrência das lesões que o sorgo causa na mucosa intestinal. Em nosso experimento as aves foram alimentadas com milho e não foi observada uma redução tão expressiva com o avançar da idade o que diverge de Lunedo et al. (2014). Possivelmente este fato esteja relacionado com a diferença no ambiente de criação das aves, já que neste experimento as aves foram criadas em cama de maravalha ao contrário do referido experimento (LUNEDO et al., 2014) em que as aves foram criadas em gaiolas. As aves criadas em piso têm o hábito de ciscar as partículas da cama, o que lhes proporciona maior consumo de fibras que as aves em gaiolas, auxiliando o desenvolvimento da função intestinal (SHIELDS e GREGER, 2013). Aumento da altura das vilosidades, relação vilo/cripta e profundidade da mucosa nas aves criadas em piso, podem levar a uma maior estabilidade da população bacteriana, bem como menor carga de patógenos (WILLIS et al., 2002). Neste experimento, logo aos 7 dias, foi observado grande desenvolvimento das características morfométricas e maior atividade de fosfatase alcalina intestinal (FAI) (Capítulo 2), a qual atua na prevenção da passagem bacteriana pela mucosa intestinal e na detoxificação do LPS bacteriano no lúmen (LALLES, 2010).

A cama recebe as fezes das aves e possui temperatura e umidade favoráveis à multiplicação bacteriana, o que é capaz de alterar a microbiota das aves (SAMLI et al., 2010), e servir como agente de exclusão competitiva (WILLIS et al., 2002). Neste sentido, foi demonstrado que a taxa infecção de frangos por *Salmonella*, uma bactéria de importância para a saúde pública e das aves, é muito menor em aves criadas em piso do que em gaiolas (WILLIS et al., 2002). Samli et al., (2010) trabalhando com bactérias em meio de cultura, encontraram maiores contagens de bactérias produtoras de ácido láctico e de *Escherichia coli* no conteúdo do íleo de frangos com 21 dias de idade criados em cama de maravalha do que nos mantidos em gaiolas. Em condições em que a microbiota comensal está estabelecida, as Enterobactérias enfrentam maior dificuldade para se multiplicar no nicho e mesmo invadir o hospedeiro. Assim, a estabilidade da população de Enterobacterias em relação ao estudo de Lunedo et al. (2014), pode indicar que aos 7 dias a microbiota das aves deste estudo encontrava-se mais madura. Possivelmente estão envolvidos neste processo fatores intestinais, como a elevada atividade de FAI aos 7 dias e o precoce desenvolvimento das características morfométricas, bem como o contato com os microrganismos da cama.

Nossos dados revelam que a maturidade da microbiota ainda não estava completamente atingida aos 7 dias. A contagem do 16S DNAr do grupo *Enterococcus spp.* foi maior aos 7 dias, sofrendo redução de 240 vezes para o dia 21, quando manteve-se estável até os 42 dias (Figura 1). Estes dados estão de acordo com Lunedo et al. (2014), que encontraram redução de 305 vezes desta população na mucosa do íleo entre 7 e 21 dias em aves alimentadas com dieta a base de milho e farelo de soja. Os *Enterococcus* são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, pertencentes à subdivisão das bactérias ácido-láticas e fermentadoras de glicose. São organismos comensais da microbiota intestinal de homens e animais, tendo como principal característica a grande capacidade de resistência ao estresse ambiental, sobrevivendo a amplas faixas de temperatura e pH (GONÇALVES, 2009). Tais propriedades têm permitido classificar os *Enterococcus* como cepas oportunistas, que possuem capacidade de ocupar o espaço deixado por outras bactérias mais sensíveis a determinado habitat (WISE e SARAGUSA, 2007). Assim, a predominância dos *Enterococcus* aos 7 dias neste estudo pode ser entendida como reflexo de uma microbiota em desenvolvimento, cujos colonizadores naturais ainda não haviam se estabelecido totalmente, deixando o nicho disponível para estas cepas oportunistas. Por sua vez, o amadurecimento da microbiota, cria um ambiente mais hostil aos *Enterococcus*, resultando na expressiva queda de sua presença na camada de muco aos 21 e 42 dias.

A predominância dos *Lactobacillus* nos três momentos de coleta (Figura 1) está de acordo com outra pesquisa envolvendo técnicas moleculares, em que se constatou que de 2 a 4 dias pós-eclosão são encontradas principalmente cepas de *Streptococcus* e *Enterobacteria*, e, após uma semana, *Lactobacillus* predominam no intestino delgado e se mantém ao longo da vida do animal (AMIT-ROMACH et al, 2004). Esses, dados também estão de acordo com pesquisas com meio de cultura (BARNES et al., 1972; MEAD e ADAMS, 1975).

O número de cópias do gene 16S referentes ao grupo *Lactobacillus* sofreu queda de 8,32 vezes entre 7 e 21 dias, elevando-se 3,16 vezes em seguida (entre 21 e 42 dias). Estes resultados divergem de Lunedo et al. (2014), que encontraram aumento do número de cópias do 16S dos *Lactobacillus* na mucosa e no conteúdo apenas entre 21 e 42 dias de idade em frangos alimentados com dietas contendo milho ou sorgo. Possivelmente a divergência entre os estudos novamente esteja relacionada com uma maior complexidade da microbiota nas aves criadas em piso

(SAMPLI et al., 2010), que possivelmente propicia maior desafio (competição) para a multiplicação dos *Lactobacillus*, à medida que a cama se torna mais contaminada.

Outro fator pode ter contribuído para a queda do número de cópias do 16S do grupo *Lactobacillus* entre 7 e 21 dias. Foram formuladas duas dietas, com aumento da relação energia/proteína na dieta administrada a partir dos 22 dias, de modo que aos 21 dias possivelmente as aves tinham déficit de carboidrato na ração. Este fato, associado ao aumento da absorção de açúcar mostrado pelo ensaio de absorção *in vitro* (Capítulo 2) em decorrência do aumento da área disponível para a absorção (aumento na atura das vilosidades), deve ter limitado ainda mais o substrato para a multiplicação destas cepas. Por outro lado, a ascensão das contagens de *Lactobacillus* dos 21 para os 42 dias pode envolver uma maior disponibilidade de oligossacarídeos na camada de muco em decorrência da maior ingestão de carboidratos.

A relação Enterobactérias/*Lactobacillus* tem sido utilizada tradicionalmente como indicador da saúde intestinal dos animais e é desejável que o número de *Lactobacillus* supere o número de Enterobactérias para aumentar a robustez do intestino a agentes oportunistas (CASTILLO et al., 2006). Além disso, o aumento de espécies de *Lactobacillus* em amostras de fezes de pintainhos e patos jovens foi associada com aumento do ganho de peso (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). Neste estudo as aves foram criadas em condições adequadas de higiene, e também não foram infectadas por microrganismos patogênicos. Estas condições de manejo e o fato de que os *Lactobacillus* naturalmente possuem maior ocorrência na mucosa do íleo justificam os baixos valores encontrado para a relação na presente pesquisa. Contudo, o aumento relativo da relação Enterobactérias/*Lactobacillus* aos 21 dias neste estudo, principalmente em decorrência da queda dos *Lactobacillus*, pode indicar que este período pode ser crítico quando as aves são criadas em condições adversas, que propiciem o contato com microrganismos patogênicos. Nestas condições, medidas de manejo que evitem uma queda tão grande na população dos *Lactobacillus* na mucosa do íleo, poderiam beneficiar a saúde das aves. Neste contexto, a criação de aves com um maior número de dietas, específicas para cada fase, poderiam favorecer a multiplicação destas importantes bactérias comensais.

Em relação ao efeito das dietas, a suplementação com avilamicina, *Bacillus subtilis* ou OEs não reduziu o número de cópias de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp.* e do grupo *Lactobacillus* bem como a relação *Enterobacteriaceae/Lactobacillus*,

sendo que a avilamicina esteve associada com maiores valores numéricos de cópias do 16S dos três grupos estudados, e com maior contagem de *Enterococcus* aos 21 dias em relação ao controle. De maneira similar, UTIYAMA et al. (2006) não observaram alteração das contagens de microrganismos (UFL/g de conteúdo do intestino delgado) de leitões em resposta à adição de extrato vegetal (cravo + eugenol, orégano + carvacrol e tomilho) em três níveis na ração (700, 1400 e 2100ppm). No mesmo estudo foi verificado maior número de microrganismos totais, Gram positivos, Gram negativos, *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (UFC/g de conteúdo no intestino delgado) em leitões alimentados com APC (50 ppm de bacitracina de zinco + 50 ppm de alaquinox + 50 ppm de colistina). A suplementação com avilamicina ou extrato de plantas (carvacrol 5%, cineol 3% e capsaicina 2%) também não alterou o número de cópias de 16S de bactérias totais no conteúdo do estômago, jejuno, ceco e cólon distal de suínos, bem como na mucosa do jejuno (CASTILLO et al., 2006). No entanto, o estudo obteve maior número de *Lactobacillus* no ceco de aves alimentadas com o extrato de plantas (CASTILLO et al., 2006).

A avilamicina e os OEs atuam sobretudo em bactérias Gram-positivas, desta maneira seria esperado uma redução do número de cópias do 16S de *Lactobacillus* e *Enterococcus spp.* com seu uso, o que não foi observado. Outros autores utilizando a avilamicina como APC (50ppm) também não encontraram diferença no número de bactérias (DECUYPERE et al., 2002). De maneira similar, COLLIER et al. (2003), utilizando outro macrolídeo como APC (tilosina), verificaram aumento de Gram-positivas, o que reflete a complexidade das interações bacterianas na microbiota intestinal.

O aumento dos *Enterococcus spp.* em animais alimentados com APC como a virginamicina foi observado em outros estudos (WELTON et al., 1998; JENSEN et al., 2002) WISE e SARAGUSA, 2007). É possível que a maior presença destas bactérias nas aves alimentadas com avilamicina esteja relacionada com a presença de resistência, de modo que estas cepas tenham utilizado o nicho deixado por outras bactérias não resistentes ao APC. Os *Enterococcus* possuem caráter oportunista reconhecido e também alta capacidade de trocar material genético com outras bactérias, resultando em relatos de cepas resistentes e na preocupação com a contaminação de produtos de origem animal (FERREIRA, 2005).

Evidências demonstram que o *Bacillus subtilis* pode promover a secreção de muco nas células caliciformes (ALIAKBARPOUR et al., 2012), aumentar a digestão das aves pela secreção bacteriana de enzimas ou pela estimulação das enzimas no hospedeiro (WANG e GU, 2010; RAY et al., 2012;) (LEE et al., 2014), além de modular sua resposta imune (LEE et al., 2014). Tais ações possivelmente influenciam a interação da microbiota com o epitélio intestinal. Contudo, no presente estudo a dieta contendo *Bacillus subtilis* não influenciou o número de cópias de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp.* e do grupo *Lactobacillus* bem como a relação *Enterobacteriaceae/Lactobacillus*, exceto pela redução dos *Lactobacillus* quando o *Bacillus subtilis* foi associado ao óleo essencial. Não está claro se esta redução possui alguma base fisiológica.

Foi demonstrado que o nível de inclusão do *Bacillus subtilis* determina a sua capacidade de elevar o número de cópias do 16S do grupo *Lactobacillus* em suínos desmamados, enquanto a suplementação por si só reduz o número de cópias de *E. coli* e a diarreia (HU et al., 2014). No referido estudo, foram testados três níveis de *Bacillus subtilis* na dieta (2×10^9 , 4×10^9 e 20×10^9 UFC/kg da dieta), sendo que apesar das dietas alterarem de forma distinta a composição da microbiota, apenas a maior concentração do aditivo proporcionou aumento do número de cópias de *Lactobacillus*. Na presente pesquisa, o *Bacillus subtilis* foi adicionado na dose de 5×10^8 UFC/kg de ração, conforme a recomendação do fabricante, o que pode ter limitado o efeito do probiótico em alterar o número de bactérias pertencentes ao grupo *Lactobacillus*. Por outro lado, é possível que o número de bactérias específicas dentro de cada grupo tenha sido alterado, sem que a mudança tenha se refletido em alteração no número de cópias do grupo como um todo.

Na ausência de efeitos dos aditivos suplementados na quantificação do 16S dos grupos bacterianos estudados, é possível que os antibióticos e as outras alternativas disponíveis como probióticos e óleos essenciais atuem na seleção de bactérias específicas, alterando a complexidade da microbiota. A alteração na composição da microbiota intestinal em resposta ao uso de APC, *Bacillus subtilis* ou extratos de ervas foram confirmadas em frangos (PEDROSO et al., 2005) e suínos (COLLIER et al., 2003; CASTILLO et al., 2006; HU et al., 2014) através de técnicas de fragmentação do DNA da comunidade intestinal (“fingerprinting”).

A resposta das bactérias mais abundantes no íleo de frangos alimentados ou não com APC (bacitracina de zinco) e infectados com *Clostridium perfringens* foi

avaliada pelas técnicas de DDGE (“denaturing gradiente gel eletrophoresis”) e qPCR (FENG et al., 2010). Os autores encontraram um padrão distinto de bandas entre os tratamentos 2 dias após a infecção, sendo que as análises por qPCR identificaram redução de *Lactobacillus*, especialmente *L. aviarius*, associadas a maiores danos no epitélio nas aves não tratadas. Em linhas gerais, os aditivos testados neste experimento não influenciaram o número de cópias dos grupos avaliados, nem a relação *Enterobacteriaceae/Lactobacillus*, um tradicional marcador da saúde intestinal (CASTILLO et al., 2006), o que ser o reflexo das boas condições de higiene em que as aves foram criadas, evidenciadas pelo vazio sanitário de 6 meses praticado, desinfecção e utilização de cama de maravalha nova.

As aves utilizadas nesta pesquisa também foram alimentadas com ingredientes altamente digestíveis, o que pode ter limitado a capacidade dos aditivos alterar a proliferação bacteriana, pois naturalmente a microbiota já deve ter sido suprida de condições adequadas para sua colonização. Em situações distintas, como quando se substitui o milho pelo sorgo na dieta, por exemplo, foi demonstrado recentemente que há maior perda de epitélio e queda do índice mitótico no duodeno e no jejuno, maior produção de mucina e alteração na população das Enterobactérias (TORRES et al., 2013).

V CONCLUSÕES

A suplementação com *Bacillus subtilis* ou óleos essenciais promove alterações momentâneas na morfometria intestinal dos frangos.

Os *Lactobacillus* predominam na mucosa do íleo, e sua maior prevalência ocorre no dia 7, seguida pelo dia 42.

A utilização de avilamicina ou óleos essenciais altera o padrão de sucessão dos *Enterococcus*, enquanto a associação *Bacillus subtilis* e óleos essenciais reduz os *Lactobacillus*.

VI REFERÊNCIAS

ALIAKBARPOUR, H. et al. The *Bacillus subtilis* and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 25, n. 9, p. 1285-1293, 2012.

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, 2004. ISSN 0032-5791.

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, 2004. ISSN 0032-5791.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10463, 2010.

AZZAM, M. et al. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. **Poultry science**, v. 90, n. 10, p. 2251-2256, 2011

BARNES, E. M. et al. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. **British Poultry Science**, v. 13, n. 3, p. 311-326, 1972.

BARTOSCH, S.; FITE, A.; MACFARLANE, G.T; MCMURDO, M.E.T. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.3575–3581, 2004.

BASMACIOĞLU MALAYOĞLU, H. et al. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat–soybean meal diets. **British Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 67-80, 2010.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1, p. 1-14, 2010.

CASTILLO, M. et al. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. **Journal of animal science**, v. 84, n. 10, p. 2725-2734, 2006.

CHICHLOWSKI, M. et al. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. **Poultry science**, v. 86, n. 6, p. 1121-1132, 2007.

COLLIER, C. et al. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. **Journal of animal science**, v. 81, n. 12, p. 3035-3045, 2003.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, n. 1 Suppl, p. 25-30, 2007.

DECUYPERE, C. et al. The influence of Lentinus edodes preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 42, p. S18, 2002.

DEMIR, E. et al. The use of natural feed additives as alternatives for an antibiotic growth promoter in broiler diets. **British Poultry Science**, v. 44, n. S1, p. 44-45, 2003.

DEPLANKE, B., GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73 (suppl), p. 1131S-1141S, 2001.

DIARRA, M. S.; MALOUIN, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. 5, p. 282, 2014.

DUMONCEAUX, T. J. et al. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2815-2823, 2006.

ENGBERG, R. M. et al. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry Science**, v. 79, n. 9, p. 1311-1319, 2000.

FENG, Y. et al. Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 1, p. 116-121, 2010.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus***. Dissertação (Mestrado) – UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 2005.

FORDER, R. E. A. et al. Bacterial Modulation of Small Intestinal Goblet Cells and Mucin Composition During Early Posthatch Development of Poultry1. **Poultry science**, v. 86, n. 11, p. 2396-2403, 2007.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 01, p. 53-61, 2001.

GONÇALVES, A. F. **Análise molecular da resistência a antibióticos, factores de virulência e grupos filogenéticos em *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. de animais**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2009.

GONG, J. et al. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.208, p.1-7, 2002.

HARDY, B. The issue of antibiotic use in the livestock industry: what have we learned? **Animal biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 129-147, 2002.

HEILIG, H.G.; ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E.E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A.D; DE VOS, W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p.114–123, 2002.

HU, Y. et al. Effects of *Bacillus subtilis* KN-42 on Growth Performance, Diarrhea and Faecal Bacterial Flora of Weaned Piglets. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 8, p. 1131, 2014.

HUGHES, R. J. **Energy metabolism of chickens: physiological limitations**. RIRDC, 2003. ISBN 0642585504.

IMMERSEEL, F. V. et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.

JAMROZ, D. et al. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. **British poultry science**, v. 46, n. 4, p. 485-493, 2005.

JANG, I. et al. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n. 3, p. 304-315, 2007.

JENSEN, L. B. et al. Streptogramin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from production animals in Denmark in 1997. **Microbial Drug Resistance**, v. 8, n. 4, p. 369-374, 2002.

KIEN, C. L. et al. Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. **J Nutr**, v. 137, n. 4, p. 916-22, Apr 2007.

KNARREBORG, A. et al. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5918-5924, 2002.

KROISMAYR, A. et al. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 9, p. 377-387, 2008.

LALLES, J. P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutr Rev**, v. 68, n. 6, p. 323-32, Jun 2010.

LEE, K. W. et al. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **Br Poult Sci**, v. 44, n. 3, p. 450-7, Jul 2003.

LEE, K.-W. et al. Immune modulation by *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, 2014.

LIVARK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, J. et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.6816-6824, 2003.

LUNEDO, R. et al. Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize-or sorghum-fed broiler chickens using real-time PCR. **British poultry science**, v. 55, n. 6, p. 795-803, 2014.

MANZANILLA, E. et al. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of animal science**, v. 84, n. 10, p. 2743-2751, 2006.

MEAD, G.; ADAMS, B. Some observations on the caecal micro-flora of the chick during the first two weeks of life. **British poultry science**, v. 16, n. 2, p. 169-176, 1975.

MURUGESAN, G. R.; GABLER, N. K.; PERSIA, M. E. Effects of direct-fed microbial supplementation on broiler performance, intestinal nutrient transport and integrity under experimental conditions with increased microbial challenge. **Br Poult Sci**, v. 55, n. 1, p. 89-97, Feb 2014.

MURUGESAN, G. R.; GABLER, N. K.; PERSIA, M. E. Effects of direct-fed microbial supplementation on broiler performance, intestinal nutrient transport and integrity under experimental conditions with increased microbial challenge. **Br Poult Sci**, v. 55, n. 1, p. 89-97, Feb 2014.

MURUGESAN, G. R.; ROMERO, L. F.; PERSIA, M. E. Effects of Protease, Phytase and a Bacillus sp. Direct-Fed Microbial on Nutrient and Energy Digestibility, Ileal Brush Border Digestive Enzyme Activity and Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentration in Broiler Chickens. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101888, 2014.

OETTING, L. L. et al. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos ea histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1389-1397, 2006.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SPE, p. 209-225, 2009.

PEDROSO A.A; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R. The structure of bacterial community in the intestine of newly hatched chicks. **J. Appl. Poult. Res.**, V.15, P.232-237, 2005.

RAY, A.; GHOSH, K.; RINGØ, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 465-492, 2012.

RINTTILA, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. Development of an extensive set of 16S rDNA targeted primers for quantification of pathogenic and

indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p.1166–1177, 2004.

SAMLI, H. et al. Effects of *Enterococcus faecium* supplementation and floor type on performance, morphology of erythrocytes and intestinal microbiota in broiler chickens. **British poultry science**, v. 51, n. 4, p. 564-568, 2010.

SAVAGE, T.; ZAKRZEWSKA, E.; ANDREASEN, J. R. The effects of feeding mannan oligosaccharide supplemented diets to poult on performance and the morphology of the small intestine. **Poult Sci**, v. 76, n. Suppl 1, p. 139, 1997.

SHIELDS, S.; GREGER, M. Animal Welfare and Food Safety Aspects of Confining Broiler Chickens to Cages. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 386-400, 2013.

SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, n. 04, p. 415-428, 2001.

TORRES, K. et al. Effects of corn replacement by sorghum in broiler diets on performance and intestinal mucosa integrity. **Poultry science**, v. 92, n. 6, p. 1564-1571, 2013.

UTIYAMA, C. E. et al. Effects of antimicrobials, prebiotics, probiotics and herbal extracts on intestinal microbiology, diarrhea incidence and performance of weanling pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, 2006.

VAN ASSCHE, P.; DE MEY, L.; DESCAMPS, J. In vitro study of the influence of virginiamycin and spiramycin on the composition and biochemical activities of the gastrointestinal flora of piglets. II. Influence on the biochemical activities of the microflora. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie**, v. 231, n. 1-3, p. 163-174, 1974.

VERVAEKE, I. et al. Quantitative in vitro evaluation of the energy metabolism influenced by virginiamycin and spiramycin used as growth promoters in pig nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 3, p. 846-856, 1979.

VILÀ, B.; ESTEVE-GARCIA, E.; BRUFAU, J. Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 03, p. 369-380, 2010.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G.W.; LIS, C.M.; MUNRO, K.; HAMMES, W.P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 2578–2585, 2001.

WANG, Y.; GU, Q. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. **Res Vet Sci**, v. 89, n. 2, p. 163-7, Oct 2010.

WANG, Y.; GU, Q. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. **Res Vet Sci**, v. 89, n. 2, p. 163-7, Oct 2010.

WELTON, L. et al. Antimicrobial resistance in enterococci isolated from turkey flocks fed virginiamycin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 3, p. 705-708, 1998.

WILLIS, W.; MURRAY, C.; TALBOTT, C. Campylobacter isolation trends of cage versus floor broiler chickens: a one-year study. **Poultry science**, v. 81, n. 5, p. 629-631, 2002.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of animal science**, v. 86, n. 14 suppl, p. E140-E148, 2008.

WISE, M.; SIRAGUSA, G. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one-to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 4, p. 1138-1149, 2007.

ZHOU, H. et al. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. **Poultry science**, v. 86, n. 12, p. 2541-2549, 2007.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese deste projeto se baseou em que a adição de avilamicina (AVI) (antibiótico promotor de crescimento), *Bacillus subtilis* (probiótico) e óleos essenciais (OEs) (carvacrol, cinamaldeído, cineol e extrato de pimenta), eleva o desempenho zootécnico de frangos a partir de benefícios na mucosa intestinal e na microbiota a ela associada. Demonstrou-se que a suplementação de AVI ou OEs na ração de frangos de 1 a 42 dias de idade promove maior atividade de fosfatase alcalina intestinal e aminopeptidase, enquanto a adição de *Bacillus subtilis* promove maior quantidade de RNAm do gene codificador do transportador de peptídeos 1 (*SLC15A1*). A utilização de AVI ou OEs promove alterações momentâneas na morfometria intestinal e modifica o padrão de sucessão dos *Enterococcus*, enquanto a associação de *Bacillus subtilis* e OEs na dieta reduz os *Lactobacillus*. Apesar dos efeitos observados, os aditivos alimentares não promoveram alteração no desempenho zootécnico.

Nosso estudo foi elaborado para avaliar o efeito dos aditivos em aspectos ligados à digestão e absorção de nutrientes. Possivelmente, o fato das aves terem sido criadas sem desafio por patógenos que comprometessem a integridade intestinal, associado ao fato de receberem alimentos altamente digestíveis para uma formulação voltada para ganho de peso superior, pode ter limitado a capacidade destes aditivos aumentarem o desempenho. O elevado índice zootécnico das aves do tratamento controle suportam esta explicação, pois possivelmente o crescimento das aves controle foi próximo do limite da linhagem. Portanto, qualquer melhoria dos aditivos na fisiologia intestinal que tenha favorecido os processos de digestão e absorção dos nutrientes, provavelmente não teve reflexo no ganho de peso devido a capacidade metabólica da ave ganhar peso ter sido atingida no tratamento controle. O fato da microbiota associada à mucosa do íleo não ter variado muito entre as dietas, também pode reforçar esta hipótese, pois provavelmente o substrato oriundo da digestão ou da secreção de mucina disponíveis para as bactérias não variou muito entre os tratamentos. É possível que em situações em que a dieta seja formulada com níveis mais baixos de nutrientes, como em condições de maior inclusão de fibra na ração, eventuais melhorias na fisiologia intestinal nas aves suplementadas seja traduzida em melhora do ganho de peso.

Por outro lado, existem evidências de que probióticos e OEs atuam na função imunológica das aves, o que não foi objeto de estudo neste projeto. Como não

ocorreram alterações substanciais nos processos ligados à função digestiva com a suplementação dos aditivos testados, não se pode descartar que a sua principal contribuição para as aves envolva aspectos ligados à resposta imune. Neste sentido, a presente pesquisa demonstra claramente a possibilidade de se criar animais sem o uso de aditivos com índices zootécnicos similares ou até superiores em termos de média. Além disso, apesar de termos escolhido genes codificadores de enzimas e transportadores de importância para os processos de digestão e absorção, bem como algumas enzimas de membrana ligadas a estes processos, não foram abordadas todas as vias envolvidas no aproveitamento de hexoses e aminoácidos no intestino. Neste sentido, a correlação do desempenho com o estudo da expressão gênica global do intestino seguido pela validação dos genes diferentemente expressos por RT-qPCR e quantificação de suas respectivas proteínas, nas circunstâncias em que se realizou a presente pesquisa, e em condições de desafio, poderia auxiliar a desvendar a verdadeira importância de cada um dos diversos papéis atribuídos à estas substâncias na literatura.

A análise da microbiota intestinal neste estudo, realizada através da quantificação absoluta do número de cópias do 16 S dos grupos de maior ocorrência no íleo das aves, não revelou diferenças substanciais do número de cópias entre os tratamentos. Outros estudos já haviam relatado tendências similares. No passado, estudos da diversidade bacteriana revelaram diferença no perfil bacteriano em resposta à suplementação com aditivos alimentares, contudo os resultados muitas vezes não identificavam com exatidão quais espécies bacterianas sofriam variação. Desde então, houve uma grande evolução das técnicas para o estudo da comunidade microbiana, de forma que as metodologias modernas de sequenciamento em larga escala têm ampliado muito o conhecimento da diversidade bacteriana em diversos ecossistemas com tempo e custos reduzidos. Neste sentido, como existem evidências de que o efeito dos aditivos empregados neste projeto afeta espécies específicas de bactérias e a técnica utilizada envolveu a quantificação de grupos, projetos objetivando avaliar o efeito de aditivos na microbiota intestinal poderiam envolver o estudo da diversidade bacteriana com a tecnologia do sequenciamento em larga escala, precedido pela confirmação das espécies que eventualmente sofreram alteração por qPCR. Esta abordagem tem se mostrado altamente sensível e confiável e poderia ser uma excelente ferramenta para se avaliar a interação entre as diferentes classes de aditivos e a microbiota.

Embora não tenha sido o objetivo principal deste projeto, as variáveis fisiológicas e de microbiota foram avaliadas em função do tempo. A análise revelou que durante o seu desenvolvimento, o intestino do frango sofre alterações específicas e inespecíficas que podem ser levadas em conta para a formulação de dietas que melhor se adequem ao perfil de enzimas e transportadores de nutrientes expressados no intestino ao longo do tempo. As alterações específicas na expressão de genes e atividade de enzimas devem ser investigadas em outras linhagens, para se discriminar a influência da dieta e da genética em sua regulação. Ademais, investigações envolvendo o emprego de diferentes estratégias de manejo alimentar, como a administração de um maior número fases de dieta, em animais criados em condições de higiene que simulem as condições comerciais, poderiam ser encorajadas para se verificar o perfil da relação *Enterobacteriaceae/Lactobacillus* e a saúde intestinal em animais de produção.

Finalmente, ao invés de se buscar de forma desenfreada uma substância biológica ou quimicamente ativa para substituir os APCs, maior importância deveria ser dada por nutricionistas e pesquisadores para medidas sanitárias e de manejo adequadas, pois nossos resultados deixam claro que ao menos nas condições em que se realizou a presente pesquisa, todos aditivos testados são desnecessários.