

## DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO, DA OXIDAÇÃO DE LÍPÍDEOS E PROTEÍNAS, E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO JEJUNO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *EIMERIA* spp.

Isabela Sarro de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Angélica de Souza Khatlab (Coorientadora), Gabriela Hernandez Granzoto (Participante), Eliane Gasparino (Orientadora). e-mail: egasparino@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Agrárias/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES: Zootecnia/5.04.02.00-5-Genética e Melhoramento dos Animais Domésticos](#)

**Palavras-chave:** infecção, protozoário intestinal, radicais livres

### Resumo

Com este estudo nosso objetivo foi avaliar se o desafio por *Eimeria* spp. pode causar o estresse oxidativo no jejuno de frangos de corte, seis dias pós inoculação (6 dpi) com oocistos esporulados de *Eimeria*. Para isso, 96 frangos de corte machos com 1 dia de idade isentos de vacina anticoccidiana foram utilizados. Aos 14 dias de idade, 48 frangos de corte receberam por via oral 1 mL de solução contendo oocistos esporulados de *Eimeria* spp. ( $2 \times 10^4$  *E. acervulina*,  $2 \times 10^4$  *E. praecox*,  $1,6 \times 10^4$  *E. maxima* e  $4 \times 10^4$  *E. mitis*). Após o período de 6 dpi, seis aves de cada tratamento, foram abatidas por deslocamento cervical, para a coleta de amostras do jejuno. Foi observado oocistos de *Eimeria* spp. nas excretas dos animais desafiados confirmando a infecção causada por *Eimeria* spp., e ausência de oocistos nas excretas de frangos não desafiados, validando o uso desses animais como controle experimental. O maior número de oocistos/g de excreta foi detectado no 6º dia após a inoculação dos frangos com oocistos de *Eimeria* spp. Os animais desafiados apresentaram maior concentração de nitrito e oxidação de lipídeos, e menor expressão dos genes superóxido dismutase 1 e catalase no jejuno 6 dpi. Os resultados sugerem que no 6º dpi, os frangos desafiados apresentam maior produção de substância oxidativa e menor proteção antioxidante, que pode por sua vez ter culminado na oxidação lipídica nas células do jejuno. Coincidindo com o momento de maior liberação de oocistos nas excretas desses animais.

### Introdução

A infecção intestinal em frangos de corte, provocada por protozoários do gênero *Eimeria*, pode perturbar a homeostase das funções fisiológicas e metabólicas do organismo do animal, uma vez que durante a infecção, radicais livres como o óxido nítrico (NO) e o ânion superóxido, são produzidos durante a resposta imune celular do hospedeiro contra a invasão das *Eimeria* spp. (Allen, 1997). Estudos têm demonstrado que os animais

acometidos pela coccidiose, apresentam alterações no ambiente intestinal, como por exemplo, a alteração na expressão e atividade de enzimas antioxidantes (Georgieva et al., 2011; Khatlab et al., 2019), e aumento na concentração das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Allen, 1997). Esses produtos oxidativos são sintetizados e secretados por vários tipos de células imunes, em resposta ao estímulo de citocinas pró-inflamatórias. O nitrito e o nitrato são os produtos primários estáveis e não voláteis da degradação do NO, e o aumento destes produtos no organismo durante condições patológicas é considerado como um indicativo de aumento da produção do NO. Durante a infecção, células imunes ativadas secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, podendo ocorrer reação entre eles (Dusse et al., 2003), e formar um poderoso agente oxidante, capaz de oxidar biomoléculas importantes como os lipídeos e as proteínas, assim como pode inibir a atividade de importantes enzimas antioxidantes como a catalase (Brown, 1995), causando o estresse oxidativo nos animais infectados. Nesse sentido, nosso objetivo foi avaliar se o desafio por *Eimeria* spp. pode causar o estresse oxidativo no jejuno de frangos de corte 6 dpi com oocistos esporulados de *Eimeria* spp.

## Materiais e métodos

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - nº 4000170615) da Universidade Estadual de Maringá. Um total 96 frangos de corte machos (Cobb 500) de um dia de idade (isentos de vacina anticoccidiana) foram utilizados. Os frangos foram alojados em gaiolas metálicas suspensas, equipadas com comedouro e bebedouro, em ambiente climatizado seguindo as recomendações da linhagem Cobb 500. Os frangos foram distribuídos em dois tratamentos: sem desafio por *Eimeria* spp. (SE  $n=48$ ) e desafio por *Eimeria* spp. (CE  $n=48$ ). Aos 14 dias de idade, os animais do grupo experimental CE receberam por via oral 1 mL de solução contendo oocistos esporulados de *Eimeria* spp. ( $2 \times 10^4$  *E. acervulina*,  $2 \times 10^4$  *E. praecox*,  $1,6 \times 10^4$  *E. maxima* e  $4 \times 10^4$  *E. mitis*). O outro grupo (SE), recebeu por via oral 1 mL de solução salina. Os animais pertencentes aos tratamentos SE e CE, foram alojados separadamente para evitar infecção cruzada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições, e seis aves por tratamento. As rações foram formuladas com milho e farelo de soja para atender suas exigências nutricionais. Todas as aves ( $n=96$ ) foram abatidas por deslocamento cervical 6 dpi aos 20 dias de idade. Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e a ração. Nenhum anticoccidiano foi adicionado às rações.

Para realizar a análise coprológica qualitativa e quantitativa, as excretas dos frangos de ambos os tratamentos foram coletadas antes da inoculação dos oocistos de *Eimeria* spp. e após a inoculação por um período de seis dias. Dois gramas de excretas foram adicionados em 28 mL de solução saturada de sacarose e homogeneizadas. O homogenato obtido foi coado em peneira e com auxílio de pipeta tipo Pasteur as duas cavidades da câmara McMaster foram preenchidas com o homogenato. A câmara

McMaster foi avaliada em microscópio óptico P1 Olympus BX 50, acoplado com a câmera Olympus PMC 35 B utilizando objetiva de 40x. Nas duas células da câmara McMaster foram contados os oocistos de *Eimeria* spp. e o número de oocistos obtidos foi multiplicado por 100. Para avaliar a ocorrência de estresse oxidativo no jejuno por meio de análises bioquímicas e molecular, após o período de 6 dpi, seis aves de cada tratamento, foram abatidas por deslocamento cervical. Em seguida fragmentos do jejuno foram coletados, lavados com soro fisiológico estéril gelado, congelados em nitrogênio líquido e subsequentemente as amostras de jejuno foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

As análises de nitrito, determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, oxidação lipídica) e de proteínas carboniladas (oxidação proteica), foram determinadas conforme detalhado por Khatlab et al. (2019). O RNA total foi extraído do jejuno com o uso do reagente TRIzol, (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total extraído, foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000-c (Thermo Fisher Scientific), no comprimento de onda de 260 nm, e a sua integridade foi analisada em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), e visualizado sob luz ultravioleta. O RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada, utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. As reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), foram realizadas utilizando o composto fluorescente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Os primers superóxido dismutase 1 (*SOD1*, NM\_205064.1) e catalase (*CAT*, NM\_001031215.2) foram desenhados com base nas sequências dos genes depositadas no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). O gene  $\beta$ -actina (L08165.1) foi utilizado como controle endógeno. A quantificação relativa de expressão dos genes foi calculada por meio do método  $2^{-\Delta\text{CT}}$ . Os resultados estão expressos como unidade arbitrária (UA). Os resultados foram analisados por meio da ANOVA one way e as médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ) (SAS, 2002 versão 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## Resultados e Discussão

Não foi verificado oocistos nas excretas dos animais SE, o que valida o uso desses animais como controle experimental, por outro lado, a infecção causada por *Eimeria* spp. em frangos CE foi confirmada pela presença de oocistos em suas excretas. O maior número de oocistos/g de excreta foi detectado no 6º dia após os frangos terem sido inoculados com oocistos esporulados de *Eimeria* spp. Foi verificado efeito significativo dos tratamentos sobre a concentração de nitrito ( $P=0,001$ ), oxidação de lipídeos (TBARS) ( $P=0,004$ ) e expressão dos genes *SOD1* ( $P=0,0034$ ) e *CAT* ( $P < 0,001$ ). Os frangos do grupo CE apresentaram maior concentração de nitrito ( $5,71 \mu\text{M}$  de nitrito/mg de proteína) e oxidação lipídica ( $0,43 \text{ nmol}$  de TBARS/mg de proteína) do que os frangos

do grupo SE (nitrito = 4,64  $\mu$ M de nitrito/mg de proteína e TBARS = 0,36 nmol de TBARS/mg de proteína), respectivamente. Além disso, os frangos CE apresentaram menor expressão desses genes do que os frangos SE (*SOD1* 0,30 vs. 0,56 UA, respectivamente; *CAT* 0,08 vs. 0,44 UA, respectivamente). Não foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre o conteúdo de proteínas carboniladas ( $P=0,599$ ). O nitrito foi determinado como uma das formas de avaliar a formação de óxido nítrico no organismo durante a infecção, como um potencial causador de danos oxidativos em importantes biomoléculas. Assim, os resultados obtidos podem ter ocorrido devido a interação do NO com radicais derivados do oxigênio que produzem outras substâncias tóxicas, como o peroxinitrito um potente agente oxidante (Dusse et al., 2003), resultando na oxidação lipídica. Esses danos oxidativos celulares podem por sua vez ter causado redução na expressão dos genes *SOD1* e *CAT*. Além disso, a expressão do gene *CAT* pode ter sido inibida pelo óxido nítrico (Brown, 1995).

### Conclusões

Os resultados sugerem que os frangos desafiados apresentam um estado transitório de estresse oxidativo caracterizado pela maior produção de substância oxidativa e oxidação lipídica nas células do jejuno, e menor expressão de genes envolvidos na proteção antioxidante celular. Coincidindo com o momento de maior liberação de oocistos nas excretas desses animais.

### Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá, ao Departamento de Zootecnia pelo apoio técnico, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

### Referências

- ALLEN, P. C. Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. **Poultry Science**, v. 76, n. 6, p. 814-821, 1997.
- BROWN, G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. **European journal of biochemistry/FEBS**, v. 232, n. 1, p. 188-191, 1995.
- DUSSE, L. M.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- GEORGIEVA, N. V.; GABRASHANSKA, M.; KOINARSKI, V.; ERMIDOU-POL, S. Antioxidant status in *Eimeria acervulina* infected chickens after dietary selenium treatment. **Trace Elements and Electrolytes**, v. 28, n. 1, p. 42-48, 2011.
- KHATLAB, A. S.; DEL VESCO, A. P.; OLIVEIRA-NETO, A. R.; FERNANDES, R. P. M.; GASPARINO, E. Dietary supplementation with free methionine or methionine dipeptide mitigates intestinal oxidative stress induced by *Eimeria* spp. challenge in broiler chickens. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 58, p. 1-17, 2019.