BAUER OLIVEIRA E ALVARENGA

**Relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte
e sua composição bacteriana**

São Paulo

2020

BAUER OLIVEIRA E ALVARENGA

**Relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte
e sua composição bacteriana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4019
FMVZ

Alvarenga, Bauer Oliveira e
Relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte e sua composição
bacteriana / Bauer Oliveira e Alvarenga. – 2020.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira.

1. Morfologia fecal. 2. Microbiota fecal. 3. Metagenômica. 4. Frangos de corte. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 21 de março de 2020
CEUax N [8193090819](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Antonio José Piantino Ferreira

Área: Patologia Experimental E Comparada

Equipe envolvida: Bauer Oliveira E Alvarenga - [executor](#) (universidade De São Paulo); Antônio José Piantino Ferreira (orientador)

Título do projeto: "Relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte e sua composição bacteriana".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 17/12/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFIED

We certify that the Research "Relationship between the morphological aspect of broiler feces and its bacterial composition", protocol number CEUAX 8193090819 (ID 001271), under the responsibility Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day December 17, 2019.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte e sua composição bacteriana", protocolado sob o CEUAX nº 8193090819, sob a responsabilidade de Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 17 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVARENGA, Bauer Oliveira e

Título: **Relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte e sua composição bacteriana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Dra. Elizabeth Santin

Instituição: Jefe Nutrition Inc.

Julgamento: _____

Dra. Denise Russi Rodrigues

Instituição: Agência Goiana de Defesa Agropecuária

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de modo direto ou indireto, contribuíram para realização deste trabalho.

Em especial, à Biocamp que flexibilizou minhas atividades laborais e fomentou todas as despesas. Assim como, aos colegas de trabalho, que contribuíram para realização dessa etapa da minha vida.

Aos professores que não hesitaram em compartilhar seus conhecimentos, seja de modo presencial ou digital, uma vez que, ao longo do curso fomos surpreendidos com a pandemia COVID-19.

A minha Família que sempre me apoiou e esteve ao meu lado.

Ao Sr. Carlos Toshihiro Mizusaki, que abriu as portas da empresa para coleta das amostras e seus funcionários Carlão da Torre e Carlinhos da Torre sempre muito gentis.

A NGS Soluções Genômicas, em especial a Dra. Polyana Tizioto, que além de realizar um excelente trabalho, me forneceu importantes orientações sobre metagenômica.

A Deus sempre presente em meus pensamentos e que me presenteia com a oportunidade de conhecer as pessoas certas para minha evolução pessoal, profissional e espiritual.

“Nascer sabendo é uma limitação porque obriga a apenas repetir e, nunca, a criar, inovar, refazer, modificar. Quanto mais se nasce pronto, mais refém do que já se sabe e, portanto, do passado; aprender sempre é o que mais impede que nos tornemos prisioneiros de situações que, por serem inéditas, não saberíamos enfrentar.”

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

ALVARENGA, B. O. **Relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte e sua composição bacteriana**. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Analisar o aspecto fecal de frangos pode revelar de modo precoce, alterações que poderão ser relacionadas a problemas entéricos, que em grande parte das vezes ocorrem devido ao desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose). Deste modo, o presente estudo teve como objetivo utilizar análises de metagenômica para analisar a relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos e sua respectiva composição bacteriana. O estudo foi composto por um total de oito grupos, os grupos 1, 2 e 3 analisaram fezes com passagem de ração (PR), nos escores 1, 2 e 3, respectivamente. Os grupos 4, 5 e 6 analisaram fezes com muco avermelhado (MA), nos escores 1, 2 e 3, respectivamente. O grupo 7 analisou fezes ileais normais (FIN) e o grupo 8 analisou descargas cecais (DC). Cada grupo foi composto por seis amostras, totalizando 48 amostras. As amostras tiveram o DNA total extraído, e na sequência, se amplificou a região V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no sistema MiSeq e as *reads* produzidas foram de 2x250 pb. O programa DADA2 fez a modelagem e a correção de erros de *amplicons* sem a construção de OTUs. As diversidades alfa e beta, assim como, a abundância relativa dos filos e gêneros permitiram entender um pouco mais do comportamento das comunidades bacterianas em seus respectivos aspectos fecais. A diversidade alfa mostrou, através de curvas de rarefação, que as amostras atingiram seu máximo potencial de revelação gênica. E o index de Shannon revelou que o grupo DC apresentou maior diversidade, sendo estatisticamente diferente dos grupos PR-2, PR-3 e MA-1. A diversidade beta mostrou que somente as amostras do grupo DC foram homogêneas. A abundância relativa de filos revelou oito diferentes filos, sendo *Firmicutes* o mais abundante em todos os grupos, *Proteobacteria* o segundo mais abundante nos grupos que estudaram fezes ileais normais e suas alterações. Já o filo *Bacteroidetes* foi o segundo mais abundante no grupo DC. A abundância relativa dos gêneros revelou 136 diferentes gêneros bacterianos. Nos grupos que estudaram fezes ileais normais e suas alterações, os gêneros mais abundantes

foram *Lactobacillus* e *Escherichia/Shigella*, com exceção do grupo PR-1 que teve essa ordem invertida. Diferente dos demais, o grupo DC teve maior abundância dos gêneros *Bacteroides* e *Faecalibacterium*. As análises estatísticas foram feitas com Teste t de *Student* ($P < 0,01$). Avaliar o aspecto morfológico de fezes de frangos é tarefa fundamental, que possibilita agir de modo rápido evitando perdas de desempenho e econômicas causadas por disbiose. Desse modo, esse trabalho identificou, através de análises de metagenômica, a existência de 61 diferentes gêneros bacterianos entre o grupo 7 (FIN) e o grupo 8 (DC), assim como, uma variação dos gêneros bacterianos conforme o tipo de alteração fecal, sendo essa mais significativa nos grupos 4, 5 e 6, que estudaram muco avermelhado, mostrando existir uma variação da microbiota intestinal ao longo do dia, devido à ausência de alimento e maior quantidade de muco no intestino, causado pelo período de escuro (jejum).

Palavras-chave: Morfologia fecal. Microbiota fecal. Metagenômica. Frangos de corte.

ABSTRACT

ALVARENGA, B. O. **Relationship between the morphological aspect of broiler feces and its bacterial composition**. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Analyzing the fecal aspect of chickens may reveal early changes that may be related to enteric problems, which in most cases occur due to intestinal microbiota imbalance (dysbiosis). Thus, the current study aimed to use metagenomic analyses to analyze the relationship between the morphological aspect of chicken feces and their respective bacterial composition. The study was composed by a total of eight groups, the groups 1, 2 and 3 analyzed feces with feed passage (FP), in scores 1, 2 and 3, respectively. The groups 4, 5 and 6 analyzed faeces with reddish mucus (RM), in the scores 1, 2 and 3, respectively. Group 7 analyzed normal ileal feces (NIF) and group 8 analyzed caecal discharges (CD). Each group was composed of six samples, totaling 48 samples. The samples had the total DNA extracted and in the sequence the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified. The sequencing was performed in the MiSeq system and the produced reads were 2x250 bp. The DADA2 program did the modeling and the correction of amplicons errors without the construction of OTUs. The alpha and beta diversities, as well as the relative abundance of the phylos and bacterial genus allowed to understand a little more about the behavior of bacterial communities in their respective fecal aspects. The alpha diversity showed through the rarefaction curves that the samples reached their maximum potential of gene revelation. And Shannon's index revealed that the CD group showed greater diversity, being statistically different from FP-2, FP-3 and RM-1 groups. The beta diversity showed that only the samples of the CD group were homogeneous. The relative abundance of phylos revealed eight different phylos, being *Firmicutes* the most abundant in all groups, *Proteobacteria* the second most abundant in the groups that studied normal ileal feces and their alterations. The phylos *Bacteroidetes* was the second most abundant in the CD group. The relative abundance of genus revealed 136 different bacterial genus. In the groups that studied normal ileal feces and their alterations, the most abundant genus were *Lactobacillus* and *Escherichia/Shigella*, with the exception of the FP-1 group, which had this order

reversed. Unlike the others, the CD group had more abundance of the genus *Bacteroides* and *Faecalibacterium*. The statistical analyses were done with Student's t test ($P < 0.01$). To evaluate the morphological aspect of chicken feces is a fundamental task, which makes it possible to act quickly avoiding performance and economic losses caused by dysbiosis. Thus, this work identified through metagenomic analyses the existence of 61 different bacterial genus between group 7 (NIF) and group 8 (CD), as well as, a variation of the bacterial genus according to the type of fecal alteration, being this variation more significant in groups 4, 5 and 6, that studied reddish mucus, showing to exist a variation of the intestinal microbiota throughout the day, due to the absence of feed and greater amount of mucus in the intestine, caused by the period of dark (fasting).

Keywords: Fecal morphology. Fecal microbiota. Metagenomics. Broilers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1)	27
Figura 2 - Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2)	27
Figura 3 - Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3)	27
Figura 4 - Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1)	28
Figura 5 - Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2)	28
Figura 6 - Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3)	28
Figura 7 - Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN)	28
Figura 8 - Grupo 8: Descarga Cecal (DC)	28
Figura 9 - Pôster Qualidade Fecal de Frangos de Corte	29
Figura 10 - Lote de frangos, aos 19 dias de idade (a)	30
Figura 11 - Lote de frangos, aos 19 dias de idade (b)	30
Figura 12 - Espátula de inox com colher estéril	33
Figura 13 - Coleta asséptica	33
Figura 14 - Microtubo estéril tipo <i>Eppendorf</i> , contendo amostra	33
Figura 15 - Amostras acondicionadas em gelo seco	33
Figura 16 - Amostras para início do processo de extração de DNA	35
Figura 17 - Início do processo de extração de DNA, lise mecânica com <i>beads</i> de vidro	35
Figura 18 - Termociclador KingFisher	35
Figura 19 - Placa com as 48 amostras, pronta para o preparo das bibliotecas de sequenciamento	35
Figura 20 - Protocolo padrão de preparo de bibliotecas para sequenciamento	36
Figura 21 - Curvas de rarefação de todas as amostras, separadas em grupos. Curvas geradas e visualizadas na função implementada no <i>Phyloseq</i> , ilustram que todas as amostras atingiram platôs absolutos	39
Figura 22 - <i>Boxplots</i> da diversidade alfa index Shannon dos grupos estudados ..	41
Figura 23 - Distância <i>weighted</i> UniFrac (MDS) ilustra as distâncias filogenéticas dentre as amostras e seus grupos	42
Figura 24 - Abundância relativa dos filos bacterianos, de acordo com os grupos estudados	43
Figura 25 - Abundância relativa de gêneros bacterianos, de acordo com os grupos estudados	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo dos resultados de dois lotes de frangos de corte. Lote 1 sem enterite (dados reais do lote, o qual as amostras de fezes foram coletadas, vide anexo G) e Lote 2 com enterite moderada (diagnosticada como disbiose)...	21
Tabela 2 - Horário de coleta das amostras de fezes frescas de frangos de corte.	31
Tabela 3 - Classificação do aspecto morfológico das amostras de fezes de frangos de corte, conforme Figura 9	34
Tabela 4 - Distribuição dos filos, de acordo com os grupos estudados	44
Tabela 5 - Abundância relativa dos gêneros, de acordo com os grupos estudados	46
Tabela 6 - Microrganismo significativamente diferente entre os grupos PR-1 e PR-2	46
Tabela 7 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos MA-1 e MA-2	47
Tabela 8 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos MA-1 e MA-3	47
Tabela 9 - Microrganismo significativamente diferente entre os grupos MA-2 e MA-3	47
Tabela 10 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e PR-1	47
Tabela 11 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e PR-2	47
Tabela 12 - Microrganismo significativamente diferente entre os grupos FIN e PR-3	48
Tabela 13 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e MA-1	48
Tabela 14 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e MA-2	48
Tabela 15 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e MA-3	48
Tabela 16 - Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e DC	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Dispersão das amostras de fezes de frangos coletadas ao longo do dia, conforme grupos estudados	32
---	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	OBJETIVOS	19
3.	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	As fezes de frangos de corte	20
3.1.1	Tipos de fezes de frangos de corte	20
3.1.2	Principais alterações presentes em fezes de frangos de corte.....	20
3.2	A microbiota intestinal de frangos de corte.....	22
3.2.1	Importância da microbiota intestinal	22
3.2.2	Formação da microbiota intestinal.....	23
3.2.3	Composição da microbiota intestinal	23
3.2.4	O bem-estar é fundamental para o equilíbrio da microbiota intestinal.....	25
3.2.5	Microbiota intestinal: o passado e o presente	26
3.2.6	Metagenômica para análise de fezes de frangos de corte	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Grupos.....	27
4.2	Informações de campo	29
4.2.1	Local de coleta das amostras.....	29
4.2.2	Programa nutricional	30
4.2.3	Coleta das amostras	31
4.3	Atividades laboratoriais.....	34
4.3.1	Extração de ácidos nucleicos (DNA)	34
4.3.2	Preparo das bibliotecas de sequenciamento.....	35
4.3.3	Análise dos dados	36
4.3.4	Análise de bioinformática e classificação taxonômica	37
5.	RESULTADOS.....	39
6.	DISCUSSÃO	50
6.1.	Abundância relativa dos filos e gêneros presentes em FIN e DC	50
6.2.	Abundância relativa dos filos e gêneros presentes em FIN e PR (1, 2 e 3)	51
6.3.	Abundância relativa dos filos e gêneros presentes em FIN e MA (1, 2 e 3).....	52
6.4.	Quanto à dispersão das amostras e respectivo horário de coleta	53
7.	CONCLUSÕES	54

8.	REFERÊNCIAS	55
9.	ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

Analisar o aspecto morfológico de fezes de frangos de corte é uma importante tarefa, que deve fazer parte da rotina das empresas avícolas. Esse hábito pode revelar, de modo precoce, alterações que poderão ser relacionadas a diversos problemas entéricos.

As fezes podem ser ileais ou cecais. Fezes ileais são eliminadas diversas vezes ao dia, não passam pelos cecos e podem conter uma porção de urina. Já as descargas cecais, são eliminadas pelos cecos uma ou duas vezes ao dia e sem a presença de urina (Ito et al., 2009).

Encontrar características indesejáveis em fezes de frangos de corte é algo relativamente simples, pois uma quantidade significativa apresenta uma ou mais alterações como: passagem de ração, muco avermelhado, presença de gases, presença de água, presença de muco e alteração da coloração (amareladas ou esverdeadas). Tais alterações podem ocorrer em diferentes intensidades. Podendo ter como causa fatores biológicos, metabólicos, físicos, nutricionais, etc.

O sistema digestório (SD) das aves é formado por: bico, boca, língua, faringe, esôfago, papo, proventrículo moela, intestino delgado, cecos, cólon e cloaca. O intestino delgado é um órgão longo, que se subdivide em três segmentos: duodeno, jejuno e íleo e, segundo Franzosa et al. (2015), é responsável pela digestão e absorção da maior parte dos nutrientes. Geralmente, as aves possuem dois cecos, que se localizam na junção entre o intestino delgado (íleo) e o intestino grosso (cólon), através das junções ileocecais. Além disso, na maioria das espécies de aves os cecos são bem desenvolvidos e funcionais, pois são câmaras de fermentação bacteriana, onde polissacarídeos não amiláceos dão origem a diversos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que serão importante fonte de energia para as aves (Franzosa et al., 2015). O cólon é pouco funcional no que diz respeito à absorção de nutrientes. Após o cólon se encontra a cloaca, nela se unem os sistemas digestório, urinário e reprodutivo. Ela se divide em quatro partes: coprodeo, urodeo (presença dos orifícios uretrais e ductos genitais ou oviduto esquerdo), proctodeo (presença da fenda de abertura da Bursa de Fabrícus) e abertura da cloaca (Denbow, 2000).

As diferenças funcionais do intestino estão ligadas ao processo de digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes, uma vez que, à medida que a digesta percorre o intestino ela se modifica, consequência do processo digestivo. As diferenças morfológicas entre os segmentos, também contribuem para maior eficiência do órgão. A mucosa intestinal é formada por vilosidades e criptas, essas por sua vez dão origem às células epiteliais que compõem as vilosidades (Denbow, 2000). As criptas possuem basicamente a mesma morfologia, já as vilosidades apresentam diferenças morfológicas entre os segmentos, sendo mais longas e afiladas no duodeno e mais curtas e largas no jejuno e íleo, por fim, os cecos e o cólon apresentam vilos curtos e achatados (Denbow, 2000).

Da mesma forma, a microbiota intestinal também se diferencia ao longo do sistema digestório (Franzosa et al., 2015). Isso acontece devido à influência de fatores como: oferta de oxigênio (aerobiose, microaerofilia e anaerobiose), quantidade e qualidade dos nutrientes, viscosidade, quantidade de muco, pH, tipo de substrato, etc. O intestino delgado é colonizado principalmente por bactérias lácticas e os cecos por uma gama maior de bactérias merecendo destaque comunidades de bactérias anaeróbias ou anaeróbias facultativas (Boleli e Thimotheo, 2017).

O estudo da microbiota intestinal, sempre despertou grande interesse da comunidade científica, uma vez que os microrganismos intestinais exercem relação direta com o hospedeiro. Entretanto, no passado, para estudar microrganismos era necessário cultivá-los em meios de cultura e isso limitava significativamente sua identificação. Felizmente, essa situação mudou com o advento da biologia molecular e das ciências ômicas como, por exemplo, a metagenômica. Esse progresso permitiu conhecer e catalogar uma enorme quantidade de novos microrganismos, principalmente os não cultiváveis (Franco-Duarte et al., 2019).

Diante disso, os gêneros bacterianos variam entre fezes ileais e descargas cecais? E na presença de alterações como: passagem de ração e muco avermelhado, em diferentes níveis de intensidades?

2. OBJETIVOS

Desta forma, esse trabalho tem como objetivo utilizar análises de metagenômica para estudar a relação entre o aspecto morfológico de fezes de frangos e sua respectiva composição bacteriana, comparando os filos e gêneros mais abundantes em fezes ileais normais (FIN) e descargas cecais (DC). Assim como, comparar os filos e gêneros mais abundantes em fezes ileais normais, com o de fezes ileais que apresentam alterações morfológicas como passagem de ração (PR) e muco avermelhado (MA).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 As fezes de frangos de corte

3.1.1 Tipos de fezes de frangos de corte

O intestino é o órgão responsável por conectar o meio externo ao interior do organismo. Ele é responsável por digerir e absorver os nutrientes dos alimentos nutrindo todo o corpo (Dias et al., 2014). Além dessas funções, o intestino, em especial o das aves possui uma grande quantidade de tecido linfoide chamado de GALT (do inglês *gut-associated lymphoid tissue*) que combate constantemente patógenos intraluminais, que colocam em risco sua integridade (Mittal e Coopersmith, 2014), através da exclusão imunológica (Everret et al., 2004, Kawamoto et al., 2012). Para Mendoza (2019), quando referirmos à integridade intestinal, fazemos referência a sua estrutura, funcionalidade e microbioma.

Um intestino saudável e íntegro realiza com maestria suas funções e o resultado final do processo digestivo é a eliminação das excretas ou fezes que não apresentam nenhum tipo de alteração morfológica.

Basicamente, dois tipos de fezes são eliminados pelas aves, cada um deles possui características distintas, que permitem diferenciá-las visualmente. O primeiro tipo de fezes tem como origem o intestino delgado e recebe o nome de fezes ileais. As fezes ileais são eliminadas entre sete e 12 vezes ao dia (Denbow, 2000), após um tempo de passagem pelo Trato Gastrointestinal (TGI) de duas horas (Warriss et al., 2004) geralmente, apresentam consistência firme, coloração que varia do marrom ao castanho (Ito et al., 2009) e podem ser ou não eliminadas juntamente com a urina (porção branca). O segundo tipo de fezes tem como origem os cecos e são chamadas de descargas cecais. As descargas cecais são eliminadas cerca de duas vezes por dia (Duke, 1989) e somente na presença de luz (Ito et al., 2009), após fermentarem por um período de oito a 12 horas (Hinton et al., 2000; Svihus et al., 2013), possuem consistência pastosa ou semilíquida, coloração amarronzada e odor *sui generis* (Ito et al., 2009). Vale lembrar que fezes ileais e descargas cecais podem ser eliminadas simultaneamente.

3.1.2 Principais alterações presentes em fezes de frangos de corte

Em situação de campo, diversos desafios infecciosos e não infecciosos (nutricionais, ambientais, falhas de manejo, etc.) podem afetar a integridade

intestinal (Longo e Figueiredo, 2017), resultando em alterações morfológicas das fezes e consequente perda de desempenho (Maiorka et al., 2000; Santin et al., 2001; Dias et al., 2014), devido à redução da capacidade digestiva e absorptiva, impactando negativamente a conversão alimentar dos animais, assim como, aumentando o gasto metabólico com renovação celular (Korver, 2006), vide Tabela 1.

Tabela 1 – Comparativo dos resultados de dois lotes de frangos de corte. Lote 1 sem enterite (dados reais do lote, o qual as amostras de fezes foram coletadas, vide anexo G) e Lote 2 com enterite moderada (diagnosticada como disbiose).

	Unidade	Lote 1 (Sem enterite)	Lote 2 (Com enterite)	Diferença
Data Alojamento		28/03/2019	-	
Aves Alojadas	Unid.	36.000	36.000	
Aves Abatidas	Unid.	35.313	34.770	544
Mortalidade	%	1,91	3,42	-1,51
Consumo de Ração	kg	4,279	4,296	-0,017
Consumo Total de Ração	kg	154.040	158.842	-4.802
Conversão Alimentar	kg ração/PV	1,568	1,618	-0,050
Peso Médio	kg	2,781	2,727	0,054
Peso Vivo Total	kg	98.206	94.816	3.389
Valor Frango Vivo	R\$/kg	R\$ 3,21	R\$ 3,21	-
Receita Total	R\$	R\$ 315.240,58	R\$ 304.360,90	R\$ 10.879,67
Custo Médio Ração	R\$/t	R\$ 878,38	R\$ 878,38	-
Custo Total com Ração	R\$	R\$ 135.305,66	R\$ 139.523,90	-R\$ 4.218,24
Demais Custos Fixos e Variáveis	R\$	R\$ 40.591,70	R\$ 41.857,17	-R\$ 1.265,47
Receita - Custos	R\$	R\$ 139.343,22	R\$ 122.979,84	R\$ 16.363,38
Diferença por Ave	R\$	R\$ 3,87	R\$ 3,42	R\$ 0,45
Diferença por kg carne	R\$	R\$ 1,42	R\$ 1,30	R\$ 0,12

Adaptado de Mendoza (2019).

Segundo López et al. (1999), alterações como passagem de ração, presença de gases, presença de água, presença de muco, presença de muco avermelhado e diferentes colorações, sinalizam que algo está diferente do normal, podendo colocar em risco a integridade intestinal.

A ocorrência de fezes com passagem de ração possui causas multifatoriais, como polissacarídeos não amiláceos, disfunções enzimáticas, micotoxinas, falhas de manejo (Teirlynck et al., 2011), síndrome do trânsito rápido, vírus entéricos

(Reovírus, Rotavírus, Astrovírus, etc.), falhas na digestão mecânica (moela com erosões, gastrites, refluxo gástrico, aumento da motilidade, etc.), gastroenteropatias com aumento do peristaltismo, diarreias do tipo osmótica, disbiose (Ito et al., 2009; Dias et al., 2014) ou disfunções pancreáticas (Coello et al., 2014). Por outro lado, fezes com presença de muco avermelhado podem ter como causa ausência de alimento no TGI, devido a fatores não infecciosos, como o não fornecimento de ração *ad libitum*, estresse calórico, ou até mesmo devido ao programa de luz com muitas horas consecutivas de escuro (Ito et al., 2009; Ito et al., 2014) ou devido a fatores infecciosos, que evoluem para enterites bacterianas (Dias et al., 2014), causadas por bactérias hemolíticas como *Escherichia* spp. e *Staphylococcus* spp. (Popova et al., 2017) que aumentam a inflamação intestinal e consequente perda da função epitelial (Wiengand et al., 2017), além de promoverem o desequilíbrio da microbiota intestinal, ou seja, à disbiose (Itani et al., 2018).

3.2 A microbiota intestinal de frangos de corte

3.2.1 Importância da microbiota intestinal

Uma microbiota intestinal equilibrada (eubiose) é essencial para o desenvolvimento saudável do hospedeiro. Ela é responsável pela manutenção da integridade intestinal (Kelly et al., 2015; Jakobsson et al., 2015) mantendo a estrutura normal das vilosidades, profundidade das criptas, proliferação celular, densidade de vasos sanguíneos, propriedades das camadas de muco e maturação dos tecidos linfoides associados à mucosa (Sommer e Backhed, 2013), além de favorecer a absorção dos nutrientes da ração, pois está ligada à fermentação de oligossacarídeos e polissacarídeos produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como lactato, propionato e butirato (Sergeant et al., 2014; Boleli e Thimotheo, 2017), que são absorvidos e utilizados como fonte de energia (McWhorter et al., 2009), representando entre 3,5 a 10% da energia metabolizável (Józefiak et al., 2004), vitaminas como B6 e K (Boleli e Thimotheo, 2017), que são essenciais para se obter lotes de alto rendimento.

3.2.2 Formação da microbiota intestinal

Até pouco tempo atrás, quando dependíamos restritamente de meios de cultivo bacteriano, acreditava-se que o embrião de frangos de corte possuía um trato digestório estéril (Kubena, et al., 1999; Amit-Romach et al., 2004), provavelmente isso tenha ocorrido, pois os meios de cultivo e/ou as condições de cultivo não ofereciam condições ideais para o desenvolvimento microbiano. Atualmente, essa situação mudou e foi graças ao advento e uso de técnicas moleculares, que permitiram encontrar e identificar microrganismos presentes no intestino de embriões de aves. Porém, se trata de uma colonização rudimentar, ou seja, pobre em diversidade e pequena em quantidade.

Há tempos, sabemos que agentes patogênicos como: *Salmonella*, *Escherichia coli* (APEC), *Mycoplasma*, *Campylobacter* podem ser transmitidos pela via vertical, ou seja, da matriz para progênie (Okamura et al., 2007). Em estudo recente, Lee et al. (2019) evidenciaram a transmissão da microbiota intestinal de reprodutoras para suas progênes, uma vez que, a microbiota do oviduto e cloaca colonizam a casca e a clara dos ovos, havendo uma similaridade evidente entre a microbiota intestinal dos embriões, com a microbiota presente na clara dos ovos. Revelando que a microbiota dos embriões é pobre em bactérias do gênero *Lactobacillus* e abundante em bactérias do gênero *Pseudomonas*.

3.2.3 Composição da microbiota intestinal

Conforme citado anteriormente, a colonização intestinal das aves tem início ainda na fase embrionária, mas é depois do nascimento que há um significativo aumento da abundância de microrganismos. Segundo Ocejó et al. (2019) e Jurburg et al. (2019) frangos de corte possuem três estágios de colonização distintos. O primeiro estágio é a fase de colonização intestinal. Ele é curto e acontece durante os três primeiros dias de vida. Nele a microbiota ainda é considerada imatura, devido ao aumento significativo da quantidade e diversidade, onde os microrganismos presentes na ração, na água e no ambiente são ingeridos e colonizam todos os segmentos intestinais. O segundo estágio é a fase de maturação da microbiota, que persiste até a segunda semana de vida. Nele ocorre a diferenciação da microbiota ao longo do intestino, juntamente com a maturação das funções intestinais que estabelecem diferentes pH, regulam a

produção de enzimas, criam ambientes com maior ou menor concentração de oxigênio, dentre outros fatores, que favorecerão a digestão do alimento e absorção dos nutrientes. Sendo assim, a microbiota intestinal de aves jovens passa por grande variação até o atingimento de seu equilíbrio (Stanley et al., 2015; Stanley et al., 2016; Willson et al., 2018). A partir da terceira semana de vida, tem início o terceiro estágio. Nele, a microbiota visa se manter em equilíbrio (eubiose). Nesse estágio há uma batalha constante entre microrganismos comensais e patogênicos, onde um grupo luta pela eubiose e o outro pela disbiose, respectivamente.

Em aves adultas existe uma grande diferença entre a microbiota que coloniza o intestino delgado e os cecos (Bae et al., 2017), sendo a microbiota cecal formada por uma maior quantidade e diversidade de microrganismos (Videnska et al., 2013; Shaufi et al., 2015; Borda-Molina et al., 2016; Munyaka et al., 2016; Ranjitkar et al., 2016; Siegerstetter et al., 2017; Wang et al., 2017; Rychlik, 2020), devido à retenção da digesta por maior tempo, favorecendo a fermentação da mesma (Apajalahti et al., 2004). O intestino delgado, possui 10^5 UFC/g de conteúdo onde 50% desse total é formado por apenas cinco gêneros (Kollarcikova et al., 2019), ou seja, a microbiota do intestino delgado apresenta menor diversidade (Videnska et al., 2013; Yan et al., 2019). Por outro lado, os cecos apresentam 10^{10} UFC/g de conteúdo, com uma população de aproximadamente 1.000 diferentes espécies (Nordentoft et al., 2011; Oakley et al., 2014).

O principal filo que coloniza o intestino delgado se chama *Firmicutes*, ele é composto por bactérias gram-positivas se destacando os gêneros: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto* e *Romboutsia* (Kollarcikova et al., 2019). Os cecos apresentam uma maior diversidade bacteriana, sendo colonizados por bactérias pertencentes aos filos *Firmicutes* que são bactérias gram-positivas e *Bacteroidetes* que são bactérias gram-negativas (Nordentoft et al., 2011; Oakley et al., 2014). Porém, há diferenças significativas entre a microbiota gram-positiva que coloniza o íleo e os cecos. Segundo estudo realizado por Kollarcikova et al. (2019), a microbiota ileal é formada por bactérias pertencentes às famílias *Peptostreptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Erysipelotrichaceae* e *Clostridiaceae* 1. Por outro lado, a microbiota cecal é composta principalmente pelas famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*. Mas essa composição pode variar conforme a idade das aves (Shaufi et al., 2015;

Bae et al., 2017; Chen et al., 2019; Glendinning et al., 2019; Kollarcikova et al., 2019; Ocejó et al., 2019), a genética (Zhao et al., 2013; Meng et al., 2014), a dieta (Scott et al., 2013; Borda-Molina et al., 2016; Park et al., 2017; Ocejó et al., 2019), o uso de medicamentos (Ladirat et al., 2013), assim como fatores ambientais como densidade e estresse calórico (Zhang et al., 2017; Wang et al., 2018b).

Estudos publicados por Singh et al. (2012) e Kollarcikova et al. (2019) relacionam piores índices zootécnicos com lotes com maior abundância do filo *Proteobacteria*. Talvez, tais afirmações foram feitas, pois gêneros tidos como prejudiciais como: *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Salmonella* pertençam ao filo *Proteobacteria*. Mas vale lembrar, que poucas espécies desses gêneros são patogênicas às aves e, mesmo assim, em situações de disbiose, o resultado zootécnico do lote, o qual as amostras foram coletadas foi excelente (Anexos C, D, E, F e G), com conversão alimentar real de 1,568 aos 40 dias de idade. Por outro lado, Ocejó et al. (2019), relataram que o filo *Proteobacteria* pode ser considerado como um biomarcador biológico para idade das aves, uma vez que, seu estudo demonstrou que a abundância desse filo é maior em aves jovens do que em frangos com mais de quatro semanas de vida.

3.2.4 O bem-estar é fundamental para o equilíbrio da microbiota intestinal

Uma vez estabelecida, o grande desafio da microbiota intestinal é se manter em eubiose. Diferentes tipos de estresse podem desequilibrá-la levando a um quadro prejudicial ao hospedeiro chamado disbiose (Bailey et al., 2011). A disbiose acontece devido ao aumento das comunidades de bactérias patogênicas frente à comunidade de bactérias benéficas, afetando o metabolismo (Turnbaugh et al., 2008; Stanley et al., 2013) e o sistema imune das aves (Peterson et al., 2007; Derrien et al., 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que o bem-estar pode influenciar a composição e respectivo equilíbrio da microbiota intestinal (Archie e Theis, 2011; Ezenwa et al., 2012; Lize et al., 2013; Shi et al., 2019). Por esse motivo, o ideal é que frangos de corte de alto desempenho sejam criados em aviários que ofereçam ótimas condições de ambiência.

3.2.5 Microbiota intestinal: o passado e o presente

Ao se comparar o momento atual, com o que se passava no ano de 1980, uma grande quantidade de microrganismos foi descoberta. Segundo Janda e Abbott (2007), naquele ano se conheciam apenas 1.800 espécies de bactérias, sendo que entre os anos de 2009 e 2013, mais de 500 novas espécies foram descobertas e registradas por ano. Isso só foi possível, graças à biologia molecular e a genômica, que revolucionaram a ciência ao desvendar características genéticas dos microrganismos cultiváveis e não cultiváveis.

3.2.6 Metagenômica para análise de fezes de frangos de corte

O uso de fezes de frangos de corte, para o estudo da microbiota intestinal, é bastante utilizado mundo afora, pois são fáceis de serem coletadas e, por não se tratar de um método invasivo, não é necessário sacrificar aves. Entretanto, o resultado das análises tem relação direta com a qualidade das amostras, sendo necessário adotar uma série de cuidados para que a microbiota presente no ambiente (cama, ar, materiais de coleta contaminados, etc.) não interfira no sequenciamento do material genético presente nas fezes. Afinal, segundo Dai et al. (2020), gêneros bacterianos como *Blautia*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Faecalibacterium*, *Jeotgalicoccus*, *Megamonas*, *Ruminococcus*, *Salinococcus*, *Staphylococcus* e *Parabacteroides* são comumente encontrados na poeira em suspensão dentro do aviário, que tem como origem primária as fezes dos frangos, mas que podem contaminar as amostras fecais. Isso reforça a importância em se adotar rigorosos cuidados de assepsia antes e durante a coleta. Deste modo, tecnologias como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) têm sido muito empregadas em estudos do microbioma intestinal de frangos de corte, através do sequenciamento do gene 16S do rRNA (Singh et al., 2012; Franzosa et al., 2015; Kollarikova et al., 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi composto por um total de oito grupos, os grupos 1, 2 e 3 analisaram fezes com passagem de ração (PR), nos escores 1, 2 e 3, respectivamente. Os grupos 4, 5 e 6 analisaram fezes com muco avermelhado (MA), nos escores 1, 2 e 3, respectivamente. O grupo 7 analisou fezes ileais normais (FIN) e o grupo 8 analisou descargas cecais (DC) , conforme descrito abaixo.

4.1 Grupos

Grupo 1: Fezes com Passagem de Ração escore 1 (PR-1)

Grupo 2: Fezes com Passagem de Ração escore 2 (PR-2)

Grupo 3: Fezes com Passagem de Ração escore 3 (PR-3)

Grupo 4: Fezes com Muco Avermelhado escore 1 (MA-1)

Grupo 5: Fezes com Muco Avermelhado escore 2 (MA-2)

Grupo 6: Fezes com Muco Avermelhado escore 3 (MA-3)

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN)

Grupo 8: Descargas Cecais (DC)

Cada grupo foi composto de seis amostras, totalizando 48 amostras.

As Figuras 1 a 7 representam cada um dos oito grupos e suas respectivas características.

Figura 1 – Grupo 1:
Passagem de Ração,
escore 1 (PR-1).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 2 – Grupo 2:
Passagem de Ração,
escore 2 (PR-2).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 3 – Grupo 3:
Passagem de Ração,
escore 3 (PR-3).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 4 – Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 5 – Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 6 – Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 7 – Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 8 – Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

Autor: Alvarenga, 2019

As variações do aspecto morfológico de fezes, estudadas nos grupos de 1 a 6, se dividem em três níveis: escore 1 para presença discreta; escore 2 para presença moderada e escore 3 para presença intensa, conforme pôster Qualidade Fecal de Frangos de Corte, desenvolvido pela Biocamp Laboratórios Ltda. (Figura 9), que se encontra disponível no *website* (<https://biocamp.com.br/artigos-tecnicos/avaliacao-da-qualidade-fecal-de-frangos-de-corte/>).

Figura 9 – Pôster Qualidade Fecal de Frangos de Corte.

Biocamp Laboratórios Ltda., disponível em (<https://biocamp.com.br/artigos-tecnicos/avaliacao-da-qualidade-fecal-de-frangos-de-corte/>).

4.2 Informações de campo

4.2.1 Local de coleta das amostras

As amostras de fezes frescas utilizadas neste trabalho foram coletadas de um lote de 36.000 frangos de corte, da linhagem Ross AP95, aos 19 dias de idade, alojado em um aviário tipo *Dark House*, situado em José Bonifácio – SP (Figuras 10 e 11).

A coleta das amostras de fezes foi previamente autorizada pelo proprietário da empresa (Anexo A), assim como o trabalho fora aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAX) da Universidade de São Paulo, número 8193090819, no dia 21 de março de 2020.

Esse modelo de aviário oferece adequado controle da ambiência interna. As paredes laterais são de tijolos, evitando a incidência direta de sol sobre as aves. Fatores internos como: iluminação, temperatura, umidade e ventilação são controlados automaticamente por um painel eletrônico. A fornalha de aquecimento

fornece calor durante os primeiros dias de criação, o sistema de *pad cooling* controla a entrada e temperatura do ar, o sistema de exaustão controla a velocidade e saída de ar, o sistema de iluminação é composto por lâmpadas de *led* dimerizáveis e o sistema de nebulização faz o controle da umidade. Tais mecanismos resultam em uma redução significativa de variáveis ambientais, permitindo maior controle das condições ambientais internas do aviário.

Figura 10 – Lote de frangos, aos 19 dias de idade (a).

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 11 – Lote de frangos, aos 19 dias de idade (b).

Autor: Alvarenga, 2019

4.2.2 Programa nutricional

As rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja atendendo às sugestões nutricionais adotadas pela empresa (Anexo B).

Nelas, também foram utilizados aditivos como adsorvente de micotoxinas, probiótico e prebiótico.

O probiótico Colostrum[®] Mix (Biocamp Laboratórios Ltda., Campinas, Brasil) foi utilizado nas duas primeiras fases de ração, ou seja, até o 21º dia de idade. Esse probiótico é classificado como *Normal Avian Gut Flora* (N.A.G.F.), pois é um produto de microbiota indefinida, composto por bactérias anaeróbias totais ($1,0 \times 10^{4,0}$ UFC/g), bactérias produtoras de ácido láctico ($1,0 \times 10^{4,0}$ UFC/g) e Mananoligossacarídeos (370 g/kg).

Visando o melhor desenvolvimento das aves, o programa alimentar adotado foi composto por quatro dietas. A dieta pré-inicial foi fornecida entre o primeiro e 7º dia, a dieta inicial entre o 8º e 21º dia, a dieta crescimento entre o 22º e 34º dia e a dieta final do 35º dia até o abate das aves.

4.2.3 Coleta das amostras

A coleta das 48 amostras de fezes frescas ocorreu em um único dia. A primeira foi coletada às 7h41min e a última às 17h11min, conforme Tabela 2 e Gráfico 1.

Tabela 2 – Horário de coleta das amostras de fezes frescas de frangos de corte.

Grupos	Amostras	Hora	Grupos	Amostras	Hora
PR-1	1	10:12	MA-2	25	7:41
	2	10:18		26	7:44
	3	10:24		27	8:07
	4	10:27		28	8:11
	5	10:37		29	8:34
	6	10:42		30	8:51
PR-2	7	9:02	MA-3	31	7:48
	8	10:21		32	7:48
	9	11:00		33	7:54
	10	11:08		34	8:04
	11	13:59		35	8:17
	12	14:35		36	8:21
PR-3	13	11:03	FIN	37	10:51
	14	14:19		38	10:57
	15	14:51		39	14:02
	16	15:06		40	14:07
	17	15:11		41	14:14
	18	16:43		42	14:27
MA-1	19	8:13	DC	43	14:41
	20	8:59		44	15:31
	21	9:14		45	15:35
	22	9:19		46	16:56
	23	9:23		47	17:02
	24	10:46		48	17:11

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

Gráfico 1 – Dispersão das amostras de fezes de frangos coletadas ao longo do dia, conforme grupos estudados.

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

A coleta ocorreu aos 19 dias de idade, ou seja, durante o consumo da dieta inicial. Cada amostra foi formada por uma fração fecal de um indivíduo e livre de conteúdo cecal, com exceção do grupo DC. As amostras foram coletadas com uma espátula de inox com colher estéril (Figura 12), tomando como alvo a superfície e o centro das fezes (Figura 13), evitando assim, o contato com a cama do aviário e/ou presença de ácido úrico.

Microtubos estéreis tipo *Eppendorf*, previamente identificados, foram utilizados para o recebimento das amostras, que não ultrapassaram a quantidade de 0,5 mL/amostra (Figura 14).

Imediatamente após coletadas, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica contendo gelo seco à temperatura de -78°C (Figura 15) e transportadas ao laboratório NGS Soluções Genômicas, onde foram processadas.

Figura 12 – Espátula de inox com colher estéril.

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 13 – Coleta asséptica.

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 14 – Microtubo estéril tipo *Eppendorf*, contendo amostra.

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 15 – Amostras acondicionadas em gelo seco.

Autor: Alvarenga, 2019

Após a coleta, as amostras foram classificadas individualmente conforme Figura 9. E o resultado está disponível na Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação do aspecto morfológico das amostras de fezes de frangos de corte, conforme Figura 9.

Grupos	Amostras	Escore	
		Passagem Ração	Muco Avermelhado
PR-1	1	1	0
	2	1	0
	3	1	0
	4	1	1
	5	1	0
	6	1	0
PR-2	7	2	1
	8	2	0
	9	2	0
	10	2	0
	11	2	0
	12	2	0
PR-3	13	3	0
	14	3	0
	15	3	1
	16	3	0
	17	3	0
	18	3	0
MA-1	19	2	1
	20	1	1
	21	1	1
	22	1	1
	23	1	1
	24	1	1
MA-2	25	1	2
	26	0	2
	27	1	2
	28	1	2
	29	1	2
	30	1	2
MA-3	31	0	3
	32	0	3
	33	1	3
	34	1	3
	35	1	3
	36	1	3
FIN	37	0	0
	38	0	0
	39	0	0
	40	0	0
	41	0	0
	42	0	0
DC	43	0	0
	44	0	0
	45	0	0
	46	0	0
	47	0	0
	48	0	0

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

4.3 Atividades laboratoriais

As atividades laboratoriais aconteceram no laboratório NGS Soluções Genômicas situado em Piracicaba-SP e todas as despesas foram custeadas pela empresa Biocamp Laboratórios Ltda.

4.3.1 Extração de ácidos nucleicos (DNA)

Antes do processamento com o kit, foi incluída uma etapa de lise mecânica realizada em um equipamento que trabalha em alta velocidade utilizando *beads* de vidro. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit MagMAX CORE, com o termociclador KingFisher, conforme protocolo do fabricante adaptado (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Figura 16 – Amostras para início do processo de extração de DNA.

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 17 – Início do processo de extração de DNA, lise mecânica com *beads* de vidro.

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 18 – Termociclador KingFisher.

Autor: Alvarenga, 2019

Figura 19 – Placa com as 48 amostras, pronta para o preparo das bibliotecas de sequenciamento.

Autor: Alvarenga, 2019

4.3.2 Preparo das bibliotecas de sequenciamento

O preparo das bibliotecas foi realizado seguindo as recomendações Illumina. Os *primers* utilizados para amplificação locus-específica de bactérias, flanquearam a região V4 do gene 16S RNA ribossômico. A sequência *overhang* de adaptadores está incluída nos *primers* locus-específicos. Os adaptadores Illumina, que foram hibridizados com as sequências imobilizadas na lâmina de sequenciamento são:

Forward overhang: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG [sequência locus-específica]

Reverse overhang: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG [sequência locus-específica]

O sequenciamento foi realizado no sistema MiSeq, conforme descrito na Figura 20, e as *reads* produzidas foram de 2x250 pb.

Figura 20 - Protocolo padrão de preparo de bibliotecas para sequenciamento.

A primeira PCR foi realizada para amplificação locus-específica. Após, *AMPure XP beads* magnéticas foram utilizadas para purificação da reação de PCR. Então, o tamanho dos fragmentos gerados na reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. A segunda PCR foi realizada para ligar os *barcodes* do kit Nextera XT, e outras etapas de purificação da PCR e validação das bibliotecas foram realizadas. Posteriormente, as bibliotecas foram quantificadas, para que todas as amostras/bibliotecas fossem unidas de maneira equimolar em um único *pool*. Para introduzir complexidade ao sequenciamento, um controle heterogêneo, o fago PhiX, foi combinado com o *pool* de *amplicons*. Por fim, a desnaturação das bibliotecas e do PhiX foi realizada para permitir o sequenciamento.

4.3.3 Análise dos dados

Os dados foram analisados conforme previamente publicado: <https://f1000research.com/articles/5-1492>.

Primeiramente, as *reads* multiplexadas foram atribuídas em amostras biológicas. O programa DADA2, um pacote aberto implementado na linguagem R (Callahan et al., 2015), foi utilizado para modelagem e correção de erros de *amplicons*, sem a construção de OTUs (*Operational Taxonomic Units*). Estudos mostram que em várias comunidades simuladas, DADA2 identificou variantes mais reais e produziu menos sequências espúrias que outros métodos (Callahan et al., 2015). O pacote DADA2 tem um *pipeline* completo implementado para transformar os arquivos

fastq do sequenciador em sequências de amostras inferidas, desmembradas, sem quimera. A filtragem de arquivos *fastq* foi realizada para cortar as sequências dos *primers*, filtrar as extremidades devido à queda da qualidade ($Q < 30$). A filtragem removeu apenas 5 pb de cada extremidade das *reads forward* e *reverse*, mantendo a sobreposição para posterior junção das *reads* e remontagem do fragmento da região V4. O algoritmo DADA2 faz uso de um modelo de erro paramétrico e cada conjunto de dados de *amplicon* tem um conjunto diferente de taxas de erro. O método *learnErrors* aprende esse modelo de erros a partir dos dados, alternando a estimativa das taxas de erro e a inferência da composição da amostra, até que eles converjam em uma solução consistente. Como em muitos problemas de aprendizado de máquina, o algoritmo deve começar com um palpite inicial, para o qual são usadas as taxas de erros máximos possíveis nesses dados. Dando continuidade, a etapa de desreplicação (*denoising*) é realizada para se obter uma lista detalhada de sequências únicas e suas abundâncias e produzir pontuação de qualidade de posição do consenso para cada sequência única, tomando a média das qualidades posicionais das leituras componentes. DADA2 não cria OTUs e diferencia as variáveis de sequência relacionadas. Diferentemente de outros, esse *pipeline* realiza a fusão de *paired-end reads* após a etapa *denoising*. Isso ocorre porque o algoritmo de *denoising* do núcleo usa a relação empírica entre o índice de qualidade e as taxas de erro, atingindo maior precisão através do desmembramento antes da fusão, embora com algum custo computacional. Como a fusão ocorre após a etapa *denoising*, é necessária sobreposição exata, sem *mismatches*, uma vez que, se espera que quase todos os erros de substituição e as quimeras já tenham sido removidos.

4.3.4 Análise de bioinformática e classificação taxonômica

Após o processamento inicial dos dados, as taxonomias foram atribuídas a cada ASV (*Amplicon Sequencing Variant*) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificação bayesiano ingênuo para essa finalidade. A função *assignTaxonomy* toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida, atribuindo as taxonomias. O banco de dados Silva 132 foi utilizado como referência.

Os dados gerados pelo programa DADA2 foram importados para o programa *Phyloseq* (Murdie & Holmes, 2013), também implementado no R. O pacote *Phyloseq* é uma ferramenta para importar, armazenar, analisar e exibir graficamente dados complexos de sequenciamento filogenético que serão agrupados em ASVs. Este pacote aproveita muitas das ferramentas disponíveis em R para ecologia e análise filogenética (*vegan*, *ade4*, *ape*, *picante*), enquanto também usa sistemas gráficos avançados/flexíveis (*ggplot2*) para produzir gráficos. As análises de diversidade alfa e beta foram realizadas no pacote *Phyloseq*, conforme descrito em: <https://f1000research.com/articles/5-1492>.

Na sequência, foram filtradas as ASVs que não foram classificadas até o nível de família. ASVs assinaladas como a mesma espécie foram aglomeradas.

O arquivo *Phyloseq* com as contagens das taxonomias foi importado para o programa *edgeR* (Robinson et al., 2010), um pacote do *R/Bioconductor* (Gentleman et al., 2004). Para análise de abundância diferencial entre grupos e a análise dos dados contínuos, os pacotes *limma* *voom* foram utilizados para normalização, juntamente com o *edgeR*. Essa abordagem reúne simultaneamente os problemas de bibliotecas de sequenciamento de DNA de tamanhos amplamente diferentes e proporções de contagem de ASVs que variam mais do que o esperado em um modelo de *Poisson*. Por isso, foram utilizadas as implementações mais populares desta abordagem, atualmente usada na análise de RNA-Seq, nomeadamente *edgeR*, adaptadas para dados de microbiomas. Essa abordagem permite uma comparação válida entre as ASVs, melhorando substancialmente tanto a potência quanto a precisão na detecção da abundância diferencial. Como no *edgeR User Guide*, o modelo linear (*lmFit*) foi utilizado para testar abundância diferencial entre os grupos. A visualização dos dados foi realizada em um programa BioinfoNGS, desenvolvido pela empresa NGS Soluções Genômicas.

5. RESULTADOS

A diversidade de espécies contida em cada uma das amostras pode ser medida através da diversidade alfa e está representada através das curvas de rarefação e da diversidade alfa index Shannon.

As curvas de rarefação têm o objetivo de verificar se as amostras atingiram o máximo potencial de revelação gênica (Figura 21), verificando se foi alcançada a cobertura plena da sequência.

Figura 21 - Curvas de rarefação de todas as amostras, separadas em grupos. Curvas geradas e visualizadas na função implementada no *Phyloseq*, ilustram que todas as amostras atingiram platôs absolutos.

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

Espera-se que haja uma variação da diversidade bacteriana em cada uma das amostras. Mas, para se ter certeza disso, é importante certificar previamente se

os procedimentos de extração e amplificação do DNA foram eficientes, pois isso pode comprometer o resultado final. As curvas de rarefação possuem a função de checar se a qualidade do material extraído das amostras atingiu sua estabilidade e máximo potencial. Isso é medido através do comportamento de cada amostra, onde inicialmente se inicia uma fase exponencial até atingir a máxima diversidade bacteriana, em seguida estabelece um platô de estabilidade ou platô absoluto, concluindo se houve efetividade no processo de extração e amplificação do DNA e consequente máxima cobertura.

Dentre os grupos analisados, houve um comportamento singular para cada um deles. Somente o grupo DC apresentou amostras homogêneas (Figura 21). Nesse grupo, a amostra que obteve menor diversidade de espécies foi a 45 e a amostra com maior diversidade foi a 46. Ao contrário de DC, MA-3, apresentou a maior heterogeneidade entre as amostras. Nele, a menor diversidade foi encontrada na amostra 34 e a maior diversidade foi encontrada na amostra 32. Algumas amostras apresentaram maior diversidade de espécies, que as demais amostras dos seus grupos, como por exemplo, a amostra 10 pertencente ao grupo PR-2 e a amostra 42 pertencente ao grupo FIN. Quanto à cobertura das amostras, a média geral foi de 72.997 *reads*, a menor cobertura foi encontrada na amostra 20, que pertence ao grupo MA-1 com 44.039 *reads*. Já a maior cobertura foi encontrada na amostra 26, que pertence ao grupo MA-2 com 97.502 *reads*. A diversidade alfa index Shannon revela diferenças estatísticas dentre os grupos analisados, mostrando que existe variação das diversidades bacterianas, conforme Figura 22.

Figura 22 – *Boxplots* da diversidade alfa index Shannon dos grupos estudados.

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).
Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA e Teste F).

De acordo com os dados encontrados neste estudo, DC foi o grupo que apresentou a maior diversidade alfa e foi estatisticamente diferente de PR-2, PR-3 e MA-1. Já PR-1, MA-2, MA-2 e FIN não foram estatisticamente diferentes dos demais grupos.

A diversidade beta é uma medida da heterogeneidade das comunidades bacterianas das amostras, e está representada pelo gráfico do escalonamento

multidimensional (MDS, do inglês *Multidimensional Scaling*) como o representado pela Figura 23 que mostra a métrica da distância UniFrac ponderada. Essa métrica é usada para comparar comunidades biológicas, e difere de outras medidas de dissimilaridade, como a dissimilaridade de Bray-Curtis, uma vez que incorpora informações de distâncias filogenéticas entre os microrganismos observados.

Segundo Lozupone et al. (2007), as variantes ponderadas (quantitativas) e não ponderadas (qualitativas) do UniFrac são amplamente utilizadas na ecologia microbiana, onde a primeira é responsável pela abundância de organismos observados, enquanto a última considera apenas sua presença ou ausência.

Figura 23 - Distância *weighted* UniFrac (MDS) ilustra as distâncias filogenéticas dentre as amostras e seus grupos.

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

A Figura 23 ilustra a diversidade beta, através da distância *weighted* UniFrac (MDS), que visa medir a heterogeneidade de comunidades bacterianas, através

das distâncias filogenéticas das amostras analisadas. É possível notar uma grande dissimilaridade entre os grupos, com exceção do grupo DC que foi mais homogêneo.

As abundâncias relativas de filo e gênero estão representadas nas Figuras 24 e 25, onde se observa variações nas comunidades bacterianas entre os grupos.

Figura 24- Abundância relativa dos filos bacterianos, de acordo com os grupos estudados.

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

A abundância relativa dos grupos revelou a presença de um filo do Reino *Archaea* (*Euryarchaeota*) e sete filos do Reino *Bacteria* (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Epsilonbacteraeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Tenericutes*).

O filo *Firmicutes*, representado na cor vinho, foi mais abundante em todos os grupos, *Proteobacteria*, representado em rosa claro, foi o segundo mais abundante dentre os grupos de 1 a 7 e *Bacteroidetes*, representado em rosa

escuro, no grupo DC. *Actinobacteria*, representado na cor cinza, foi o terceiro filo mais abundante, com exceção dos grupos MA-2 e DC, neles *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* formaram a terceira maior abundância, respectivamente. Os demais filios apareceram aleatoriamente e em menor abundância dentre as amostras analisadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Abundância relativa dos filios, de acordo com os grupos estudados.

Filos	PR-1	PR-2	PR-3	MA-1	MA-2	MA-3	FIN	DC
<i>Actinobacteria</i>	0,52%	0,75%	1,87%	1,32%	1,90%	2,57%	3,50%	0,05%
<i>Bacteroidetes</i>	0,29%	0,15%	0,23%	0,30%	4,60%	0,84%	1,80%	46,74%
<i>Euryarchaeota</i>	0,04%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Epsilonbacteraeota</i>	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Firmicutes</i>	51,06%	76,93%	75,54%	85,81%	54,15%	70,20%	78,02%	51,62%
<i>Fusobacteria</i>	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Proteobacteria</i>	48,07%	22,09%	22,33%	12,56%	39,35%	26,38%	16,65%	1,16%
<i>Tenericutes</i>	0,02%	0,04%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,44%
Total	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

Figura 25 - Abundância relativa de gêneros bacterianos, de acordo com os grupos estudados.

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

A Figura 25 representa a abundância dos gêneros. Ela revela a presença de 136 gêneros bacterianos dentre as 48 amostras analisadas. Para os grupos 1 a 7 os gêneros mais abundantes foram *Lactobacillus* e *Escherichia/Shigella*, representados em verde e lilás, respectivamente. Entretanto, em PR-1 houve uma inversão de abundância entre esses dois gêneros, sendo *Escherichia/Shigella* o mais abundante. O grupo DC apresentou um comportamento distinto dos demais. Nele os gêneros mais abundantes foram *Bacteroides* e *Faecalibacterium*, representados em azul escuro e preto, respectivamente. A Tabela 5 apresenta os dois gêneros mais abundantes em cada um dos grupos estudados.

Tabela 5 – Abundância relativa dos gêneros, de acordo com os grupos estudados.

Gêneros	PR-1	PR-2	PR-3	MA-1	MA-2	MA-3	FIN	DC
<i>Bacteroides</i>	0,30%	0,10%	0,20%	0,04%	4,20%	0,80%	1,60%	42,90%
<i>Escherichia/Shigella</i>	46,30%	21,10%	21,80%	2,70%	38,10%	26,00%	15,60%	1,00%
<i>Faecalibacterium</i>	0,10%	0,10%	1,00%	0,02%	0,70%	0,90%	1,60%	14,80%
<i>Lactobacillus</i>	44,30%	73,10%	66,00%	83,50%	37,90%	53,30%	59,90%	0,60%
Outros	9,00%	5,60%	11,00%	13,74%	19,10%	19,00%	21,30%	40,70%
Total	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3); Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN) e Grupo 8: Descarga Cecal (DC).

A análise estatística das abundâncias dos gêneros entre os grupos foi feita com o Teste t de *Student* ($P < 0,01$). A comparação entre os grupos PR-1, PR-2 e PR-3, revelou apenas um gênero com diferença significativa entre PR-1 e PR-2 (Tabela 6). Entretanto, ao comparar os grupos MA-1, MA-2 e MA-3 foi possível encontrar três gêneros diferentes entre MA-1 e MA-2, 12 gêneros diferentes entre MA-1 e MA-3, e um gênero diferente entre MA-2 e MA-3 (Tabelas 7, 8 e 9).

Ao comparar FIN, com PR-1, PR-2 e PR-3 foi possível observar diferença significativa entre todos os grupos, sendo quatro entre FIN e PR-1 (Tabela 10), quatro entre FIN e PR-2 (Tabela 11) e apenas uma entre FIN e PR-3 (Tabela 12). E ao comparar FIN com MA-1, MA-2 e MA-3, um maior número de gêneros apresentou diferenças significativas. Foram nove gêneros em relação ao grupo MA-1 (Tabela 13), seis gêneros em relação ao grupo MA-2 (Tabela 14) e seis gêneros em relação ao grupo MA-3 (Tabela 15).

Entretanto, a maior diferenciação entre gêneros foi encontrada ao comparar FIN e DC, 61 gêneros apresentaram diferenças significativas (Tabela 16).

Tabela 6 – Microrganismo significativamente diferente entre os grupos PR-1 e PR-2.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Pediococcus	164.731.073.110.841	0,0092

Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2), Teste de t *Student* ($P < 0,01$).

Tabela 7 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos MA-1 e MA-2.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	-392.365.602.170.899	0.0005
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Butyrivibrio	-503.492.173.601.261	0.0007
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Dermabacteraceae	Brachybacterium	-418.188.733.397.555	0.0008

Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2), Teste de t *Student* ($P < 0,01$).

Tabela 8 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos MA-1 e MA-3.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia/Shigella	-393.602.343.838.278	0.0023
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	341.283.729.107.065	0.0033
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteraceae	Caulobacter	350.455.793.536.553	0.0036
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Caproiciproducens	-24.899.850.494.153	0.0039
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	3.235.407.807.436	0.0056
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Elizabethkingia	219.552.244.732.337	0.0063
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Achromobacter	28.276.311.461.357	0.0064
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	269.818.328.446.598	0.0067
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Delftia	231.030.458.211.489	0.0072
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	Dialister	193.341.195.670.231	0.0075
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	NA	173.618.548.211.534	0.0089
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Dermabacteraceae	Brachybacterium	-31.965.839.560.586	0.0095

Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3), Teste de t *Student* ($P < 0,01$).

Tabela 9 – Microrganismo significativamente diferente entre os grupos MA-2 e MA-3.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	-185.015.407.120.271	0.0098

Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3), Teste de t *Student* ($P < 0,01$).

Tabela 10 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e PR-1.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	238.561.016.783.835	0.0029
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Facklamia	309.557.953.228.142	0.0063
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Globicatella	241.382.179.660.352	0.0068
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Candidatus_Arthromitus	-413.581.536.897.696	0.0074

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN); Grupo 1: Passagem de Ração, escore 1 (PR-1), Teste de t *Student* ($P < 0,01$).

Tabela 11 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e PR-2.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium_1	436.855.636.944.741	0.0011
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	435.406.100.201.013	0.0021
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Globicatella	242.995.625.344.459	0.0064
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	217.277.274.245.482	0.0065

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN); Grupo 2: Passagem de Ração, escore 2 (PR-2), Teste de t *Student* ($P < 0,01$).

Tabela 12 – Microrganismo significativamente diferente entre os grupos FIN e PR-3.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	230.202.433.931.811	0.0039

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN); Grupo 3: Passagem de Ração, escore 3 (PR-3), Teste de t Student (P<0,01).

Tabela 13 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e MA-1.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	66.190.103.403.794	1,95E+09
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Mitochondria	NA	502.676.245.618.143	0.0006
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto_1	336.577.243.235.381	0.0010
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	423.915.201.693.891	0.0012
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Dermabacteraceae	Brachybacterium	356.719.350.659.315	0.0040
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium_1	379.142.840.625.466	0.0041
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	275.947.620.605.471	0.0056
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	212.871.475.447.178	0.0074
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	-300.449.099.708.308	0.0098

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN); Grupo 4: Muco Avermelhado, escore 1 (MA-1), Teste de t Student (P<0,01).

Tabela 14 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e MA-2.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	-400.649.748.138.595	0.0004
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	260.714.535.621.945	0.0012
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto_1	327.733.427.477.228	0.0021
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Caproiciproducens	-251.586.564.639.376	0.0037
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	282.730.154.916.408	0.0058

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN); Grupo 5: Muco Avermelhado, escore 2 (MA-2), Teste de t Student (P<0,01).

Tabela 15 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e MA-3.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	672.026.415.934.395	1,54E+09
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Candidatus_Arthromitus	-521.859.073.864.715	0.0006
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	307.323.447.608.459	0.0022
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Caproiciproducens	-257.282.650.909.226	0.0029
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto_1	294.020.782.488.166	0.0059

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN); Grupo 6: Muco Avermelhado, escore 3 (MA-3), Teste de t Student (P<0,01).

Tabela 16 – Microrganismos significativamente diferentes entre os grupos FIN e DC.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	logFC	Valor de P
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Caproiciproducens	-6,794401519	2,48E-11
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_vadinBB60_group	NA	-9,372828321	4,39E-10
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	7,088914083	1,06E-09
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	7,453580762	1,30E-09
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Flavonifractor	-7,678121621	6,79E-08
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Shuttleworthia	-6,946125984	1,28E-07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Fournierella	-7,577940688	1,71E-07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-007	-6,357247823	2,87E-07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Pseudoflavonifractor	-5,713373584	3,44E-07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Oscillospira	-4,599461262	4,50E-07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-014	-8,168097116	6,17E-07
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Butyrivibrio	-7,971216674	6,44E-07
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	-8,441908476	6,78E-07
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium_1	6,855489854	7,92E-07
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Tannerellaceae	Parabacteroides	-7,591674021	1,24E-06
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	5,639711892	1,99E-06
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Negativibacillus	-6,542161199	4,14E-06
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	NA	-7,412941495	5,86E-06
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-005	-6,492364383	7,81E-06
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	NA	-4,62307852	8,11E-06
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	GCA-900066225	-6,051842064	8,20E-06
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Intestinimonas	-6,741776272	8,40E-06
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium	-7,026899074	9,83E-06
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	6,315817644	1,26E-05
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	DTU089	-4,715836347	1,53E-05
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes	-5,544395869	2,08E-05
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium_9	-6,666022741	2,92E-05
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	NA	-7,656013729	3,23E-05
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	6,819317376	4,03E-05
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Anaerotruncus	-6,25003673	4,36E-05
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Erysipelatoclostridium	-5,314112348	6,93E-05
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium	-5,98000457	8,48E-05
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	Anaeroplasmatales	Anaeroplasmataceae	Anaeroplasma	-5,4734186	9,67E-05
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Eisenbergiella	-5,163704415	9,95E-05
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Tyzzerella_3	-3,94019266	0,0001
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Tyzzerella	-5,05507195	0,0001
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_UCG-010	-4,624648156	0,0002
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	6,006807708	0,0002
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family_XIII	Family_XIII_UCG-001	-3,043970539	0,0002
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Subdoligranulum	-6,473266908	0,0003
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	CAG-352	-3,486235157	0,0003
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Pygmalobacter	-5,585634937	0,0003
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Oscillibacter	-4,899928106	0,0004
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium_5	-6,362214679	0,0005
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	Clostridium_sensu_stricto_1	3,494217737	0,0006
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Sellimonas	-5,515037654	0,0008
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Candidatus_Soleaferrea	-2,727108624	0,0008
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	NA	-5,154885718	0,0008
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobibrionales	Desulfobibrionaceae	Bilophila	-3,319808703	0,0011
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	GCA-900066575	-4,278840906	0,0024
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_NK4A214_group	-4,121076961	0,0026
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Dermabacteriaceae	Brachybacterium	3,642275848	0,0034
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	2,887921511	0,0038
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-004	-3,826528738	0,0043
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	Weissella	3,438510055	0,0044
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	2,257160059	0,0046
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Jeotgaliococcus	3,754333398	0,0064
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Marvinbryantia	-3,272871824	0,0073
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	UBA1819	-3,948092429	0,0083
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-010	-2,591023096	0,0085
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	Christensenellaceae_R-7_group	-3,996107899	0,0089

Grupo 7: Fezes Ileais Normais (FIN); Grupo 8: Descarga Cecal (DC), Teste de t *Student* (P<0,01).

6. DISCUSSÃO

6.1. Abundância relativa dos filos e gêneros presentes em FIN e DC

Ao comparar os grupos FIN e DC, os filos mais abundantes foram *Firmicutes* (78,0%) e *Proteobacteria* (16,6%), no grupo FIN. Já no grupo DC, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* apresentaram abundância de 51,6% e 46,7%, respectivamente. Os dados encontrados em nosso estudo corroboram com diversos estudos antecedentes (Nordentoft et al., 2011; Oakley et al., 2014; Bae et al., 2017; Siegerstetter et al., 2018; Glendinnig et al., 2019; Hong, et al., 2019; Kollarcikova et al., 2019; Shah et al., 2019; Shi et al. 2019). Por outro lado, dois estudos apresentaram dados diferentes. No primeiro deles, os pesquisadores Yan et al. (2017) analisaram conteúdo intestinal (duodeno e cecos) e fezes de frangos de corte e encontraram que, em ambos os casos, os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram os mais abundantes. No segundo, Chen et al. (2019), estudaram conteúdo cecal de frangos com 28 dias de idade e os filos mais abundantes foram *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, respectivamente. Isso mostra uma inversão da abundância entre os principais filos que compõem a microbiota cecal das aves.

Quanto à abundância dos gêneros, *Lactobacillus* e *Escherichia/Shigella* foram os mais abundantes em FIN, enquanto que *Bacteroides* e *Faecalibacterium* foram os que apresentaram maior abundância em DC. Além disso, foi possível identificar que 61 deles apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$). Tamanha diferença pode ser visualizada nas análises de diversidade alfa (Figuras 21 e 22) e beta (Figura 23). As distâncias filogenéticas entre os grupos foram apresentadas de forma clara, uma vez que, as amostras do grupo DC foram homogêneas, corroborando com Glendinnig et al. (2019), além de terem apresentado maior diversidade de gêneros que o grupo FIN, corroborando com estudos previamente publicados (Videnska et al., 2013; Shaufi et al., 2015; Borda-Molina et al., 2016; Munyaka et al., 2016; Ranjitkar et al., 2016; Siegerstetter et al., 2017; Wang et al., 2017; Rychlik, 2020).

Embora *Firmicutes* tenha sido o filo mais abundante em ambos os grupos, é possível observar uma variação dos gêneros mais abundantes entre eles. Dados similares foram encontrados por Kollarcikova et al. (2019).

A abundância relativa dos gêneros está ilustrada na Figura 25. Diante dela é possível notar uma diferença marcante entre grupos que representam as amostras de fezes ileais (normais ou com alterações) e o grupo DC. Os gêneros *Lactobacillus* e *Escherichia/Shigella* foram os mais abundantes nos grupos PR-1, PR-2, PR-3, MA-1, MA-2, MA-3 e FIN. Enquanto que *Bacteroides* e *Faecalibacterium* foram os mais abundantes no grupo DC. Esses dados corroboram com estudos previamente publicados (Singh et al., 2012; Oakley et al., 2014; Bae et al., 2017).

Dados encontrados por Yan et al. (2017) corroboram parcialmente com os nossos, afinal, eles encontraram maior abundância dos gêneros *Lactobacillus* (14,9%) e *Clostridium* (4,9%) em fezes ileais de frangos com melhor conversão alimentar. Nesse trabalho o ponto mais interessante é que foi estabelecida uma similaridade, entre as abundâncias de gêneros bacterianos de amostras coletadas do conteúdo duodenal e de fezes ileais, situação muito questionada em estudos anteriores (Gong et al., 2007; Gu et al., 2013; Stanley et al., 2015).

6.2. Abundância relativa dos filos e gêneros presentes em FIN e PR (1, 2 e 3)

Ao comparar os grupos FIN e PR (1, 2 e 3), os filos mais abundantes continuaram sendo *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Porém, no grupo PR-1 houve um aumento da abundância do filo *Proteobacteria* (48,1%), contra 22,1 e 22,3% em PR-2 e PR-3, respectivamente (Tabela 4).

Quanto à abundância relativa dos gêneros, apenas cinco gêneros tiveram suas abundâncias significativamente afetadas ($P < 0,01$), sendo quatro no grupo FIN e apenas *Candidatus Arthromitus* no grupo PR-1. Isso mostra que, mesmo que em menor intensidade, a presença de passagem de ração afeta a microbiota fecal. Segundo Liao et al. (2012) o gênero *Candidatus Arthromitus* está presente apenas na mucosa ileal, não podendo ser detectado nos cecos. Informação que corrobora com nosso estudo, uma vez que *Candidatus Arthromitus* não fora detectado nas amostras pertencentes ao grupo DC.

Entretanto, a presença de maior abundância de gêneros com potencial patogênico em FIN, não permite afirmar a existência de um quadro de disbiose, até porque o gênero com maior abundância em FIN foi *Lactobacillus* (59,9%).

Vale lembrar que somente em PR-1, o gênero *Escherichia/Shigella* apresentou abundância um pouco maior que *Firmicutes*, conforme consta na Tabela 5.

Ao analisar a abundância relativa entre os três grupos, que avaliaram passagem de ração, somente o gênero *Pedococcus* que possui características probióticas (Torok et al., 2009; Satheesh et al., 2012; Kim et al., 2016), foi mais abundante em PR-1, quando comparado com PR-2. Sendo assim, é possível dizer que não foi encontrada uma relação progressiva entre os níveis de intensidade desse tipo de alteração fecal, com suas respectivas microbiotas.

6.3. Abundância relativa dos filos e gêneros presentes em FIN e MA (1, 2 e 3)

O último critério de comparação entre as abundâncias relativas envolveu os grupos FIN e MA (1, 2 e 3), em todos eles, os filos com maior abundância foram *Firmicutes* e *Proteobacteria*.

Quanto à abundância relativa dos gêneros, foi possível identificar que 10 gêneros tiveram suas abundâncias significativamente alteradas ($P < 0,01$), sendo sete em FIN, *Stenotrophomonas* em MA-1 e *Anaerostipes* e *Caproiciproducens* em MA-2 e MA-3.

O aumento da abundância relativa de gêneros produtores de AGCC (acetato, butirato e cáprico) como *Anaerostipes* e *Caproiciproducens* nos grupos MA-2 e MA-3 é sugestivo de um processo mais intenso de reparação do epitélio intestinal, uma vez que, ambos os grupos apresentaram menor abundância relativa do gênero *Lactobacillus* (37,9 e 53,3%, respectivamente), quando comparados com FIN que apresentou uma abundância de 59,9%. Por outro lado, *Escherichia/Shigella* foi mais abundante e isso pode ter relação com a maior intensidade de muco avermelhado, conforme ratificado por Conway e Cohen (2015), que mostraram que bactérias dos gêneros *Escherichia/Shigella* possuem capacidade metabólica de colonizar e utilizar mucinas intestinais como fonte de carbono, proteína e energia.

Em contrapartida, gêneros benéficos como *Anaerostipes*, *Butyricicoccus* e *Caproiciproducens* também apresentaram maior abundância. Isso pode estar relacionado à síntese de butirato, que, segundo a literatura (Le Gall et al., 2009; Ahmed et al., 2014; Ritzi et al., 2014; Kim et al., 2015; Bengelsdorf et al., 2019; Shetty et al., 2020), é responsável por estimular a proliferação e diferenciação das

células da mucosa intestinal. Além disso, o gênero *Caproiciproducens* também sintetiza ácido cáprico, que possui espectro de ação contra bactérias patogênicas gram-negativas (Hinton Jr e Ingram, 2011). Essa variação da abundância pode ser uma tentativa para reestabelecer a eubiose e a integridade intestinal.

6.4. Quanto à dispersão das amostras e respectivo horário de coleta

Aos 19 dias de idade, o programa de luz adotado forneceu 18 horas de luz com iluminância de 10 lux e 06 horas de escuro (Anexo H). O período de escuro teve início às 00h00 finalizando às 06h00. Desse modo, a primeira amostra foi coletada 1h41 minutos após o acendimento das luzes. Sabe-se que, durante o período de escuro, as aves diminuem sua atividade e consomem menos alimento (Schwean-Lardner e Classen, 2010), deixando seu trato digestivo com menor quantidade de ração (Ortigue e Doreau, 1995).

Após coleta das amostras, foi possível observar uma relação, entre alguns grupos e o horário da coleta, que pode ser resultado do programa de luz adotado.

Os grupos MA-1, MA-2 e MA-3, foram os primeiros a terem suas amostras coletadas, todas foram obtidas no período da manhã, entre às 7h41 e 10h46. Situação ratificada nos estudos apresentados por Thaiss et al. (2016); Wang et al. (2018a) e Metzler-Zebeli et al. (2019), que mostram que maiores períodos de escuro, resultam em menor quantidade de alimento no TGI, aumentando a produção de muco e, como consequência, modificação da microbiota. Os grupos PR-1, PR-2 e PR-3 tiveram suas amostras coletadas ao longo do dia entre às 9h02 e 16h43. As seis amostras do grupo FIN foram coletadas entre o final da manhã e o início da tarde (10h51 às 14h27). Sugerindo que após a regularização do consumo de alimento, o trânsito intestinal foi normalizado e as aves passaram a eliminar fezes de melhor qualidade, em sua maioria sem nenhum tipo de alteração (fezes ileais normais), porém, algumas delas apresentaram presença de alimento mal digerido, ou seja, com pequenos pedaços de grãos de milho/soja, caracterizando a passagem de ração.

Por último, o grupo DC, teve suas amostras coletadas somente no período da tarde, entre 14h41 e 17h11, vide Tabela 2 e Gráfico 1, dados que corroboram com Ito et al. (2009), que publicaram que descargas cecais, geralmente são eliminadas duas vezes ao dia e sempre na presença de luz.

7. CONCLUSÕES

Diante das condições expostas nesse trabalho é possível concluir que, fezes ileais normais (FIN) e descarga cecal (DC) foram estatisticamente iguais quanto à diversidade, mas DC apresentou maior abundância relativa de populações bacterianas.

Ambos os aspectos morfológicos de fezes estudados afetaram a microbiota fecal, mas somente quanto à abundância relativa dos gêneros. E Muco Avermelhado (MA) afetou de modo mais significativo que Passagem de Ração (PR).

Também foi possível observar que, morfologia e microbiota fecal variaram ao longo do dia, devido à ausência de alimento e maior quantidade de muco na luz intestinal, em virtude do período de escuro de seis horas consecutivas e respectivo jejum.

Garantir condições ideais de criação evitando a ocorrência de fatores, que influenciam negativamente a morfologia fecal e o equilíbrio da microbiota intestinal é essencial para atingir o máximo potencial de produtividade. Assim como, avaliar a morfologia fecal é tarefa fundamental que possibilita agir de modo rápido e assertivo, com uso de aditivos como probióticos, que são capazes de modular a microbiota intestinal favorecendo a eubiose e evitando perdas de desempenho e econômicas.

8. REFERÊNCIAS

AHMED, S. T., ISLAM, M. M., MUN, H. S., SIM, H. J., KIM, Y. J., YANG, C. J.. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 1963-1971, 2014.

ARCHIE, E. A., THEIS, K. R. Animal behaviour meets microbial ecology. **Animal Behaviour**, v. 82, n. 3, p. 425-436, 2011.

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. 1093-8, 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. 2, p. 223-232, 2004.

BAE, Y., KOO, B., LEE, S., MO, J., OH, K., MO, I. P. Bacterial diversity and its relationship to growth performance of broilers. **Korean Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 3, p. 159-167, 2017.

BAILEY, M. T., DOWD, S. E., GALLEY, J. D., HUFNAGLE, A. R., ALLEN, R. G. and LYTE, M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 397-407, 2011.

BENGELSDORF, F. R., POEHLEIN, A., DANIEL, R., DÜRRE, P. Genome sequence of the caproic acid-producing bacterium *Caproiciproducens galactitolivorans* BS-1T (JCM 30532). **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 31, p. e00346-19, 2019.

BIOCAMP LABORATÓRIOS LTDA. **Pôster Qualidade Fecal de Frangos de Corte**. Disponível em: <<https://biocamp.com.br/artigos-tecnicos/avaliacao-da-qualidade-fecal-de-frangos-de-corte/>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

BOLELI, I. C., THIMOTHEO, M. Estrutura funcional do trato gastrintestinal: da percepção à absorção. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Funep, 2017, p. 137-170.

BORDA-MOLINA, D., VITAL, M., SOMMERFELD, V., RODEHUTSCORD, M., CAMARINHA-SILVA, A. Insights into broilers' gut microbiota fed with phosphorus, calcium, and phytase supplemented diets. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2033, 2016.

CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., ROSEN, M. J., HAN, A. W., JOHNSON, A. J., HOLMES, S. P. DADA2: High resolution sample inference from amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2015.

CHEN, W., TANG, S., JAHROMI, M. F., CANDYRINE, S. C., IDRUS, Z.; ABDULLAH, N., LIANG, J. B. Metagenomics analysis reveals significant

modulation of cecal microbiota of broilers fed palm kernel expeller diets. **Poultry Science**, v. 98, n. 1, p. 56–68, 2019.

COELLO, C. L., FEHÉRVARI, T., MENOCAL, J. A., GONZÁLEZ, E. A. El síndrome de tránsito rápido en pollos de engorde. In: XIII International Seminar in Avian Pathology and Production., 2014, AMEVEA University of Georgia. Athens, GA. **Anais ...** Athens, GA, March 24-28, 2014, p. 1-29.

CONWAY, T., COHEN, P. S. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the gut. **Microbiol. Spectr.** v. 3, 2015.

DAI, P., SHEN, D., TANG, Q., HUANG, K., LI, C. PM2. 5 from a broiler breeding production system: The characteristics and microbial community analysis. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113368, 2020.

DENBOW, D. M. Gastrointestinal anatomy and physiology. **Sturkie's avian physiology**, 5th edition, New York, Ed. by Whittow, GC Academic press, 2000. Chapter 12, p. 299-325.

DERRIEN, M., VAN BAARLEN, P., HOOIVELD, G., NORIN, E., MÜLLER, M., DE VOS, W. M. Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader *Akkermansia muciniphila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 166, 2011.

DIAS, F. E., SCHWARZ, A., GUSSEM, M., MEIRHAEGHE, H. V. Dysbacteriosis in broilers: how to asses and find solutions. In: Curso FACTA: Saúde e Integridade Intestinal. 2014, Campinas. **Resumos ...** Campinas, 2014.

DUKE, G. E. Relationship of cecal and colonic motility to diet, habitat, and cecal anatomy in several avian species. **Journal of Experimental Zoology**, v. 252, n. S3, p. 38-47, 1989.

EVETETT, M. L., PALESTRANT, D., MILLER, S. E. Immune exclusion and immune inclusion: A new mode of host-bacterial interactions in the gut. **Clinical Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. S3, p. 321-332, 2004.

EZENWA, V. O., GERARDO, N. M., INOUE, D. W., MEDINA, M., XAVIER, J. B. Animal behavior and the microbiome. **Science**, New York, N.Y., v. 338, n. 6104, p. 198-199, 2012.

FRANCO-DUARTE, R., ČERNÁKOVÁ, L., KADAM, S., KAUSHIK, K., SALEHI, B., BEVILACQUA, A., CORBO, M. R., ANTOLAK, H., DYBKA-STEPIEN, K., LESZCZEWICZ, M., RELISON TINTINO, S., ALEXANDRINO, V. C., SHARIFIRAD, J., MELO COUTINHO, H. D., MARTINS, N., RODRIGUES, C. F. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms - From Past to Present. **Microorganisms**. v. 7, n. 5, p. 130, 2019.

FRANZOSA, E. A., HSU, T., SIROTA-MADI, A., SHAFQUAT, A., ABU-ALI, G., MORGAN, X. C., HUTTENHOWER, C. Sequencing and beyond: integrating

molecular omics for microbial community profiling. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 360-372, 2015.

GENTLEMAN, R. C., CAREY, V. J., BATES, D. M., BOLSTAD, B., DETTLING, M., DUDOIT, S., HORNIK, K. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GLENDINNING, L., WATSON, K. A., WATSON, M. Development of the duodenal, ileal, jejunal and caecal microbiota in chickens. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 17, 2019.

GONG, J., SI, W., FOSTER, R. J., HUANG, R., YU, H., YIN, Y., HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 1, p. 147-157, 2007.

GU, S., CHEN, D., ZHANG, J. N., LV, X., WANG, K., DUAN, L. P., WU, X. L. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e74957, 2013.

HILTON, A. Jr., BUHR, R. J., INGRAM, K. D. Physical, chemical, and microbiological changes in the ceca of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. **Poultry Science**, v. 79, n. 4, p. 483–488, 2000.

HILTON Jr, A., INGRAM, K. D. Use of the agar diffusion assay to evaluate bactericidal activity of formulations of alkaline salts of fatty acids against bacteria associated with poultry processing. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 3, p. 357-364, 2011.

HONG, Y., CHENG, Y., LI, Y., LI, X., ZHOU, Z., SHI, D., LI, Z., XIAO, Y.. Preliminary study on the effect of *Bacillus amyloliquefaciens* TL on cecal bacterial community structure of broiler chickens. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

ITANI, T., MOUBARECK, C. A., MELKI, I., ROUSSEAU, C., MANGIN, I., BUTEL, M. J., KARAM-SARKIS, D. Preterm infants with necrotising enterocolitis demonstrate an unbalanced gut microbiota. **Acta Paediatrica**, v. 107, n. 1, p. 40-47, 2018.

ITO, N. M. K., MIYAJI, C. I., MIYAJI, S. O. Fatores predisponentes para enterite e fatores que interferem com a integridade morfológica, funcional e defensiva do intestino. In: Curso FACTA: Saúde e Integridade Intestinal. 2014, Campinas. **Resumos ...** Campinas, 2014.

ITO, N. M. K., MIYAJI, C. I., MIYAJI, S. O., LIMA, E. A. Fisiopatologia do sistema digestório e anexos. In: BERCHIERI Jr, A., SILVA, E. N., FÁBIO, J. D., SESTE, L., ZUANASE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 215-266.

JAKOBSSON, H. E., RODRIGUEZ-PINEIRO, A. M., SCHUTTE, A., ERMUND, A., BOYSEN, P., BEMARK, M., SOMMER, F., BACKHED, F., HANSSON, G. C., JOHANSSON, M. E. V. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. **Embo Reports**, v. 16, n. 2, p. 164-177, 2015.

JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JÓZEFIK, D., RUTKOWSKI, A., MARTIN, S. A. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. **Animal Feed Science Technology**, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2004.

JURBURG, S. D., BROUWER, M. S., CECCARELLI, D., VAN DER GOOT, J., JANSMAN, A. J., BOSSERS, A. Patterns of community assembly in the developing chicken microbiome reveal rapid primary succession. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 9, p. e00821, 2019.

KAWAMOTO, S., TRAN, T. H., MARUYA, M., SUZUKI, K., DOI, Y., TSUTUI, Y., KATO, L. M., FAGARASAN, S. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. **Science**, v. 336, n. 6080, p. 485-489, 2012.

KELLY, J. R., KENNEDY, P. J., CRYAN, J. F., DINAN, T. G., CLARKE, G., HYLAND, N. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 392, 2015.

KIM, B. C., JEON, B. S., KIM, S., KIM, H., UM, Y., SANG, B. I. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4902-4908, 2015.

KIM, H. W., YAN, F. F., HU, J. Y., CHENG, H. W., KIM, Y. H. B. Effects of probiotics feeding on meat quality of chicken breast during postmortem storage. **Poultry science**, v. 95, n. 6, p. 1457-1464, 2016.

KOLLARCIKOVA, M., KUBASOVA, T., KARASOVA, D., CRHANOVA, M., CEJKOVA, D., SISAK, F., RYCHLIK, I. Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota. **Poultry Science**, v. 98, n. 6, p. 2347-2353, 2019.

KORVER, D. R. Overview of the immune dynamics of the digestive system. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n. 1, p. 123, 2006.

KUBENA, L.F., HARVEY, R. B., BUCKLEY, S. A., BAILEY, R. H., ROTTINGHAUS, G. E. Effects of long-term feeding of diets containing moniliformin, supplied by *Fusarium fujikuroi* culture material, and fumonisin, supplied by *Fusarium moniliforme* culture material, to laying hens. **Poultry Science**, v. 78, n. 11, p. 1499-505, 1999.

LADIRAT, S. E., SCHOLS, H. A., NAUTA, A., SCHOTERMAN, M. H. C., KEIJSER, B. J. F., MONTIJN, R. C., GRUPPEN, H., SCHUREN, F. H. J. High-throughput analysis of the impact of antibiotics on the human intestinal microbiota composition. **Journal of Microbiology and Methods**, v. 92, n. 3, p. 387–397, 2013.

LEE, S., LA, T., LEE, H., CHOI, I. S., SONG, C. S., PARK, S. Y., LEE, S. W. Characterization of microbial communities in the chicken oviduct and the origin of chicken embryo gut microbiota. **Scientific Report**, v. 9, n.1, p.1-11, 2019.

LE GALL, M., GALLOIS, M., SEVE, B., LOUVEAU, I., HOLST, J. J., OSWALD, I. P., GUILLOTEAU, P. Comparative effect of orally administered sodium butyrate before or after weaning on growth and several indices of gastrointestinal biology of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 9, p. 1285-1296, 2009.

LIAO, N., YIN, Y., SUN, G., XIANG, C., LIU, D., YU, H. D., WANG, X. Colonization and distribution of segmented filamentous bacteria (SFB) in chicken gastrointestinal tract and their relationship with host immunity. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 2, p. 395-406, 2012.

LIZE, A., MCKAY, R., LEWIS, Z. Gut microbiota and kin recognition. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 6, p. 325-326, 2013.

LONGO, F. A., FIGUEIREDO, A. N. Impacto da qualidade da matéria-prima na saúde intestinal. In: CONFERÊNCIA FACTA, 2017, SP. **Resumos ...** Campinas, SP: FACTA, 2017.

LÓPEZ, C. C., FEHERVARI, T. L., GÓMEZ, C. D. **Manual fotográfico de las deyecciones de los pollos de engorda**. México, D.F., 1999. p. 45.

LOZUPONE, C.A., HAMADY, M., KELLEY, S.T., KNIGHT, R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1576-1585, 2007.

MAIORKA, A., SANTIN, E., SILVA, A. V. F., BRUNO, L. D. G., BOLELI, I. C., MACARI, M. Desenvolvimento do trato gastrointestinal de embriões oriundos de matrizes pesadas de 30 e 60 semanas de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 141-148, 2000.

MCWHORTER, T. J., CAVIEDES, E. V., KARASOV, W. H. The integration of digestion and osmoregulation in the avian gut. **Biological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 533-565, 2009.

MENDOZA, O. M., Fisiopatologia e impactos sobre a resposta do sistema digestivo. In: XX Simpósio Brasil Sul de Avicultura e XI Brasil Sul Poultry Fair, 2019, Chapecó, SC. **Anais ...** Nucleovet, p. 86-96, 2019.

MENG, H., ZHANG, Y., ZHAO, L., ZHAO, W., HE, C., HONAKER, C. F., ZHAI, Z., SUN, Z., SIEGEL, P. B. Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e89862, 2014.

METZLER-ZEBELI, B. U., SIEGERSTETTER, S. C., MAGOWAN, E., LAWLOR, P. G., PETRI, R. M., ZEBELI, Q. Feed restriction modifies intestinal microbiota-host mucosal networking in chickens divergent in residual feed intake. **Msystems**, v. 4, n. 1, 2019.

MITTAL, R., COOPERSMITH, C. Redefining the gut as the motor of critical illness. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 4, p. 214-223, 2014.

MUNYAKA, P. M., NANDHA, N. K., KIARIE, E., NYACHITI, C. M., KHAFIPOUR, E. Impact of combined β -glucanase and xylanase enzymes on growth performance, nutrients utilization and gut microbiota in broiler chickens fed corn or wheat-based diets. **Poultry Science**, v. 95, n. 3, p. 528-540, 2016.

MURDIE P.J., HOLMES S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

NORDENTOFT, S., MOLBAK, L., BJERRUM, L., DE VYLDER, J., VAN IMMERSEEL, F., PEDERSEN, K. The influence of the cage system and colonisation of *Salmonella* Enteritidis on the microbial gut flora of laying hens studied by T-RFLP and 454 pyrosequencing. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 187, 2011.

OAKLEY, B. B., LILLEHOJ, H. S., KOGUT, M. H., KIM, W. K., MAURER, J. J., PEDROSO, A., LEE, M. D., COLLETT, S. R., JOHNSON, T. J., COX, N. A. The chicken gastrointestinal microbiome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 360, n. 2, p. 100–112, 2014.

OCEJO, M., OPORTO, B., Hurtado, A. 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

OKAMURA, M., TACHIZAKI, H., KUBO, T., KIKUCHI, S., SUZUKI, A., TAKEHARA, K., NAKAMURA, M. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. **Vaccine**, v. 25, n. 25, p. 4837-44, 2007.

ORTIGUES, I., DOREAU, M. Responses of the splanchnic tissues of ruminants to changes in intake: absorption of digestion end products, tissue mass, metabolic activity and implications to whole animal energy metabolism. **Ann. Zootech.**, v. 44, p. 321–346, 1995.

PARK, S. H., PERROTTA, A., HANNING, I., DIAZ-SANCHEZ, S., PENDLETON, S., ALM, E., RICKE, S. C. Pasture flock chicken cecal microbiome responses to

prebiotics and plum fiber feed amendments. **Poultry Science**, v. 96, n. 6, p. 1820-1830, 2017.

PETERSON, D. A., MCNULTY, N. P., GURUGE, J. L., GORDON, J. I. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. **Cell Host Microbe**, v. 2, n. 5, p. 328–339, 2007.

POPOVA, A. Y., KAFTYREVA, L. A., SUZHAIEVA, L. V., VOITENKOVA, E. V., ZABROVSKAIA, A. V., EGOROVA, S. A., MAKAROVA, M. A., MATVEEVA, Z. N., ZUEVA, E. V., PORIN, A. A., BOIRO, M. Y., KONSTANTINOV, O. K., TOTOLIAN, A. A. Comparative characteristics of intestine microbiome of Republic of Guinea and Russian Federation residents. **Infektsiya Immunitet**, v. 7, n. 4, p. 375-382, 2017.

RANJITKAR, S., LAWLEY, B., TANNOCK, G., ENGBERG, R. M. Bacterial succession in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2399–2410, 2016.

ROBINSON, M. D., MCCARTHY, D. J., SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

RITZI, M. M., ABDELRAHMAN, W., MOHNL, M., DALLOUL, R. A. Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an Eimeria challenge. **Poultry Science**, v. 93, n. 11, p. 2772-2778, 2014.

RYCHLIK, I. Composition and function of chicken gut microbiota. **Animals**, v. 8, n. 10, p. 103, 2020.

SANTIN, E., MAIORKA, A., MACARI, M., GRECCO, M., SANCHEZ, J. C., OKADA, T. M., MYASAKA, A. M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, n. 3, p. 236–244, 2001.

SATHEESH, Y., REDDY, K. K., GUPTA, P. S. P., MALLIKARJUNA, P. V. R., REDDY, Y. R., KUMAR, M. K. Effect of feeding *Pediococcus acidilactici* on performance of broiler chicken and microstructures of intestinal villus. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 47, n. 3, p. 357-362, 2012.

SCHWEAN-LARDNER, K., CLASSEN, H. L. **Programa de luz para frangos de corte**. Campinas: Aviagen, 2010.

SCOTT, K. P., GRATZ, S. W., SHERIDAN, P. O., FLINT, H. J., DUNCAN, S. H. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 52–60, 2013.

SERGEANT, M. J., CONSTANTINIDOU, C., COGAN, T. A., BEDFORD, M. R., PENN, C. W., PALLAN, M. J. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91941, 2014.

SHAH, T. M., PATEL, J. G., GOHIL, T. P., BLAKE, D. P., JOSHI, C. G. Host transcriptome and microbiome interaction modulates physiology of full-sibs broilers with divergent feed conversion ratio. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2019.

SHAUFI, M. A. M., SIEO, C. C., CHONG, C. W., GAN, H. M., HO, Y. W. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 4, 2015.

SHETTY, S. A., BOEREN, S., BUI, T. P. N., SMIDT, H., DE VOS, W. M. Unravelling lactate-acetate conversion to butyrate by intestinal *Anaerobutyricum* and *Anaerostipes* species. **bioRxiv**, 2020.

SHI, D., BAI, L., QU, Q., ZHOU, S., YANG, M., GUO, S., LI, Q., LIU, C. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. **Poultry Science**, v. 1, n. 98, p. 2405-2413, 2019.

SIEGERSTETTER, S. C., SCHMITZ-ESSER, S., MAGOWAN, E., WETZELS, S. U., ZEBELI, Q., LAWLOR, P. G., O'CONNELL, N. E., METZLER-ZEBELI, B. U. Intestinal microbiota profiles associated with low and high residual feed intake in chickens across two geographical locations. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187766, 2017.

SIEGERSTETTER, S. C., PETRI, R. M., MAGOWAN, E., LAWLOR, P. G., ZEBELI, Q., O'CONNELL, N. E., METZLER-ZEBELI, B. U. Feed restriction modulates the fecal microbiota composition, nutrient retention, and feed efficiency in chickens divergent in residual feed intake. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2698, 2018.

SINGH, K. M., SHAH, T., DESHPANDE, S., JAKHESARA, S. J., KORINGA, P. G., RANK, D. N., JOSHI, C. G. High through put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 12, p. 10595-10602, 2012.

SOMMER, F., BÄCKHED, F. The gut microbiota masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227-238, 2013.

STANLEY, D., GEIER, M. S., CHEN, H., HUGHES, R. J., MOORE, R. J. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 51, 2015.

STANLEY, D., GEIER, M. S., DENMAN, S. E., HARING, V. R., CROWLEY, T. M., HUGHES, R. J., MOORE, R. J. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 164, p. 85-92, 2013.

STANLEY, D., HUGHES, R. J., GEIER, M. S., MOORE, R. J. Bacteria within the Gastrointestinal Tract Microbiota Correlated with Improved Growth and Feed

Conversion: Challenges Presented for the Identification of Performance Enhancing Probiotic Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 187, 2016.

SVIHUS, B., CHOCT, M., CLASSEN, H. L. Function and nutritional roles of the avian caeca: A review. **World Poultry Science Journal**, v. 69, n. 2, p. 249–263, 2013.

THAISS, C. A., LEVY, M., KOREM, T., DOHNALOVÁ, L., SHAPIRO, H., JAITIN, D. A., TUGANVAEV, T. Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1495–1510, 2016.

TEIRLYNCK, E., DE GUSSEM, M., DEWULF, J., HAESEBROUCK, F., DUCATELLE, R., VAN IMMERSEL, F. Morphometric evaluation of “dysbacteriosis” in broilers. **Avian Pathology** v. 40, n. 2, p. 139–144, 2011.

TOROK, V. A., HUGHES, R. J., OPHEL-KELLER, K., ALI, M., MACALPINE, R. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 12, p. 2474–2481, 2009.

TURNBAUGH, P. J., BÄCKHED, F., FULTON, L., GORDON, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 4, p. 213–223, 2008.

VIDENSKA, P., FALDYNOVA, M., JURICOVA, H., BABAK, V., SISAK, F., HAVLICKOVA, H., RYCHLIK, I. Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n.1, p. 30, 2013.

WARRISS, P. D., WILKINS, L. J., BROWN, S. N., PHILLIPS, A. J., ALLEN, V. Defaecation and weight of the gastrointestinal tract contents after feed and water withdrawal in broilers. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 61–66, 2004.

WANG, J., FAN, H., HAN, Y., WEI, J. P., ZHAO, J. Z., ZHOU, Z. J. Pyrosequencing of the broiler chicken gastrointestinal tract reveals the regional similarity and dissimilarity of microbial community. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 97, n. 2, p. 302–313, 2017.

WANG, J., NESENGANI, L. T., GONG, Y., YANG, Y., LU, W. 16S rRNA gene sequencing reveals effects of photoperiod on cecal microbiota of broiler roosters. **PeerJ**, v. 6, p. e4390, 2018a.

WANG, X. J., FENG, J. H., ZHANG, M. H., LI, X. M., MA, D. D., CHANG, S. S. Effects of high ambient temperature on the community structure and composition of ileal microbiome of broilers. **Poultry Science**, v. 97, n. 6, p. 2153–2158, 2018b.

WIEGAND, S., ZAKRZEWSKI, S. S., EICHNER, M., SCHULZ, E., GUNZEL, D., PIEPER, R., ROSENTHAL, R., BARMAYER, C., BLEICH, A., DOBRINNDT, U., SCHULZKE, J. D., BUCKER, R. Zinc treatment is efficient against *Escherichia coli* alpha-haemolysin-induced intestinal leakage in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

WILLSON, N. L., NATTRASS, G. S., HUGHES, R. J., MOORE, R. J., STANLEY, D., HUND, P. I., FORDER, R. E. A. Correlations between intestinal innate immune genes and cecal microbiota highlight potential for probiotic development for immune modulation in poultry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9317–9329, 2018.

YAN, W., SUN, C., YUAN, J., YANG, N. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45308, 2017.

YAN, W., SUN, C., ZHENG, J., WEN, C., JI, C., ZHANG, D., CHEN, Y., HOU, Z., YANG, N. Efficacy of fecal sampling as a gut proxy in the study of chicken gut microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2126, 2019.

ZHANG, C., ZHAO, X. H., YANG, L., CHEN, X. Y., JIANG, R. S., JIN, S. H., GENG, Z. Y. Resveratrol alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, microflora, and barrier integrity in broilers. **Poultry Science**, v. 96, n. 12, p. 4325-4332, 2017.

ZHAO, L., WANG, G., SIEGEL, P., HE, C., WANG, H., ZHAO, W., ZHAI, Z., TIAN, F., ZHAO, J., ZHANG, H., SUN, Z., CHEN, W., ZHANG, Y., MENG, H. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1163, 2013.

9. ANEXOS

Termo de autorização de coleta

Eu, **Carlos Toshihiro Mizusaki** portador do CPF 013.093.978-13 e proprietário do Sítio São José, situado no Bairro Rancho Queimado, do município de José Bonifácio – SP, autorizo para devidos fins, que **Bauer Oliveira e Alvarenga**, portador do CPF 047.049.646-04 está autorizado a coletar fezes de frangos de corte, com objetivo de utilizá-las em seu trabalho de mestrado em Patologia Experimental e Comparada, junto à Universidade de São Paulo.

Nova Aliança, 31 de Maio de 2019.

Carlos Toshihiro Mizusaki

ANEXO A – Termo de autorização de coleta

INGREDIENTES		Custo (\$/Kg)	FC Pré-Inicial	FC Inicial	FC Cresc	FC Final
Macro Ingredientes						
8006	Milho	R\$534,0000	1.083,2300	1.191,6900	1.391,7990	1.448,3170
8301	Farelo de soja	1.180,0000	737,0000	641,0000	360,0000	314,0000
8457	Farinha de carne	900,0000	85,2000	73,3000	50,9000	41,4000
8552	Farinha de pena	1.200,0000			40,0000	40,0000
8556	Fa. Vísceras	1.450,0000			60,0000	60,0000
8681	Oleo Vegetal	2.470,0000	43,5700	45,6600	49,9510	51,5830
8815	Calcário Calc. 38%	210,0000	9,2000	8,2000	7,5000	5,6000
Micro Ingredientes						
8701	Sal Moido	300,0000	6,0000	7,6000	5,1000	4,6000
8764	AdSodium	1.681,0000	3,8000	2,0000	1,8000	2,6000
8922	Ajilys 64	3.848,0000	7,2500	7,8000	11,8500	11,5500
8925	L-Treonina	6.200,0000	2,6000	2,4000	1,9000	1,7000
8952	Colostrum	58.870,0000	1,0000	0,2000		
8961	Betaina HCL 95%	8.182,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
8998	Adsorvente	4.000,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000
9342	MaxiMOS	4.150,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
ALIMET	Alimet	7.920,0000	8,1500	7,1500	6,2000	5,6500
T15963	PX VM FC INI 4KG/T R	21.027,0000	8,0000	8,0000		
T15964	PX VM FC CRE 4KG/T R	14.560,0000			8,0000	
T15965	PX VM FC ABA 4KG/T R	10.530,0000				8,0000
Batida Total (Kg)						
			2.000,0000	2.000,0000	2.000,0000	2.000,0000
Custo (\$/Ton)						
			1.001.253,26	942.350,53	862.817,62	829.411,14

NÍVEIS NUTRICIONAIS						
		Unidade	FC Pré-Inicial	FC Inicial	FC Cresc	FC Final
001	UMID.	%	11,4042	11,4590	11,3435	11,37
006	P.B.	%	24,4981	22,4200	19,7860	18,68
025	E.E.	%	5,2447	5,3986	6,1941	6,28
030	F.B.	%	2,6884	2,5600	2,0913	2,04
040	M.M.	%	5,2243	4,8348	4,1098	3,75
045	Ca	%	0,9500	0,8500	0,7740	0,68
050	Pt	%	0,6228	0,5703	0,5271	0,48
051	Pd	%	0,5000	0,4595	0,4300	0,40
070	E.M.A.AV.JOV.	KCAL/KG	3.050,0000	3.120,0000	3.279,3044	3.319,27
071	E.M.A.AV.AD.	KCAL/KG	3.050,5419	3.120,5957	3.280,0000	3.320,00
150	LIS. DIG AVES	%	1,3500	1,2400	1,1200	1,05
351	Na	%	0,2200	0,2200	0,1800	0,18

ANEXO B – Formulação das dietas fornecidas ao longo da criação das aves.

CARLOS AP. D. T. R. R.

CARLOS TOSHIHIRO MIZUSAKI E OUTROS**FAZENDA BOCAINA**

Rodovia BR-153, Km116,5 - Cabeceira de Ubarana - Ubarana - SP - CEP 15.225-000

Fábrica de Ração: (17) 99723-6760

REGISTRO DE PRODUÇÃO

6084

Granja: <u>São José</u>	Nutrição: <u>DSM</u>
Galpão: <u>01</u> N.º de Aves: <u>36.000</u>	Data de Alojamento: <u>28/03/2019</u>

Mortalidade e Eliminações

Idade	Data	Mortos	Eliminados			Idade	Data	Mortos	Eliminados		
			Refugos	Aleijados	Ascite				Refugos	Aleijados	Ascite
1	29/03	28				29	26/04	13			
2	30	54				30	27	13			
3	31/03	23				31	28	08			
4	01/04	20				32	29	18			
5	02	17				33	30/04	17			
6	03	16				34	01/05	20			
7	04/04	12				35	02/05	18			
Totais 1.º Sem.		130				Totais 5.º Sem.		109			
8	05/04	12				Acum.		491			
9	06	07				36	03/05	20			
10	07	09				37	04	25			
11	08	08				38	05	27			
12	09	11				39	06	21			
13	10	15				40*	07	36 + 87			
14	11/04	07				41	08				
Totais 2.º Sem.		69				42	09/05				
Acum.		199				Totais 6.º Sem.		216			
15	12/04	15				Acum.		687			
16	13	10				43					
17	14	05				44					
18	15	14				45					
19	16	10				46					
20	17	15				47					
21	18/04	16				48					
Totais 3.º Sem.		85				49					
Acum.		284				Totais 7.º Sem.					
22	19/04	04				Acum.					
23	20	09				50					
24	21	12				51					
25	22	12				52					
26	23	16				53					
27	24	09				54					
28	25/04	16				55					
Totais 4.º Sem.		78				56					
Acum.		362				Totais 8.º Sem.					

ALOJAMENTO

Incubatório: <u>ZK</u>	Nota Fiscal: <u>27727</u>	GTA pintos: <u>733241</u>
Linhagem: <u>Rosa = AP595</u>	Peso: <u>43</u>	Uniformidade: <u>OK</u>
Idade da Matriz: <u>47</u>	Lote: <u>200</u>	
Mortalidade de Viagem: <u>7</u>	Horário de Chegada: <u>6:00</u>	
Temperatura do Pinteiro: <u>31°C</u>	N.º de Pessoas: <u>6</u>	
Outros: _____		

PESAGENS REALIZADAS

Data	Idade	P.E.	P.M.	Peso %	Dia(s) ↑↓
04.04.19	07 dias	0,183	0,223	115%	1,0 df
11-04-19	14 dias	0,528	0,561	106%	0,5 df
18-04-19	21 dias	1,018	1,049	103%	1,0 df
25-04-19	28 dias	1,615	1,698	105%	0,9 df
02-05-19	35 dias	2,273	2,421	106%	1,4 df

VACINAS

Data	Idade	Vacina	Partida	Laboratório
04/04/19	7 dias	Inter gumigoro		Bio Vet
13/04/19	16 dias	Forte gumigoro		1111
13/04/19	16 dias	H 120		1111

ANEXO D – Ficha técnica do lote – Dados de alojamento, pesagens e programa vacinal de granja.
As aves foram vacinadas no incubatório de origem contra Doença de Marek, via ovo, aos 19 dias de incubação.

OBSERVAÇÕES: 20/03/2019 O lote chega de bom aspecto.
04/04 = O lote está bom, porém com aspecto bem uniforme.
12/04 = O lote está normal e com bom aspecto.
27/04 = O lote está normal.
28/04 = O lote está normal e com bom aspecto.
01/05/19 O lote está normal.

CONTROLE DE RAÇÃO

DATA	FASE	Kg.	ACUMULADO	DATA	FASE	Kg.	ACUMULADO
25-03-19	PRÉ	6.880	6.880	29-04-19	ABATE	7.226	
				02-05-19	ABATE	9.700	
03-04-19	Inicial	2.040		02-05-19	ABATE	6.940	
08-04-19	Inicial	6.780		03-05-19	ABATE	10.300	
10-04-19	Inicial	6.960		03-05-19	ABATE	6.900	41.460
18-04-19	Inicial	7.100					
02-05-19	Inicial	5.640	35.520			total -	154.540kg
16-04-19	Engorda	6.940					
17-04-19	Engorda	10.860					
20-04-19	Engorda	10.660					
22-04-19	Engorda	10.520					
24-04-19	Engorda	10.340					
25-04-19	Engorda	7.180					
26-04-19	Engorda	7.040					
27-04-19	Engorda	7.140	70.680				

SOBRA: TEM hiltom vai buscar.

OBS.:

CARREGAMENTO DE FRANGO

DATA	CAMINHÃO	N.º DE AVES	DESTINO
07-05-19	BXE-2476 11540	3.888-3888	NUTRI BEM
11-05-19	RPA-1587 11480	3.888-3888	" " " "
11-05-19	BWT-2479 10500	3.888-3888	" " " "
11-05-19	BWM-2223 11000	3.888-3888	" " " "
11-05-19		10.552 CBS	
11-05-19	BVD-3386 10580	3.888-3888	NUTRI BEM
11-05-19	BUD-3795 10880	3.888-3888	" " " "
11-05-19	BIS-4356 10640	3.888-3888	" " " "
11-05-19	BWIN-1780 9120	3.402-3402	" " " "
11-05-19	BXE-2476 9080	3.402-3402	" " " "
11-05-19	RPA-1584 3400	7.217-1011	" " " "
		19.679 CBS	
35.313	Arroz		
		Pape: 35.231 CBS	
		Mist: 687	
		total: 35.918	
		82 aves o menos (-)	

OBS.: Este lote deu 82 Aves a menos.

Arroz - 1000

Risco - 304 = 30,40%

Polos - 97 = 9,70%

Dados Zootécnicos		
Procedência dos Pintos		Zk (Ross)
Premix utilizado		DSM
Nome da Granja		São José 1
Data entrada do lote		28/03/2019
Data saída do lote		07/05/2019
Nº pintos (inicial)	Unid.	36.000
Nº pintos (mortos)	Unid.	687
Nº pintos (inicial - mortos)	Unid.	35.313
Nº frangos vendidos	Unid.	35.313
Nº aves faltando	Unid.	0
Quantidade ração consumida	kg	154.040
Cons. Ração (pré-inicial)	kg/ave	0,191
Cons. Ração (inicial)	kg/ave	1,007
Cons. Ração (crescimento)	kg/ave	2,024
Cons. Ração (final)	kg/ave	1,160
Peso total do lote	kg	98.220
Peso médio frango	kg	2,781
Mortalidade	%	1,91
Viabilidade	%	98,09
Idade média ponderada	dias	40,00
Conversão Alimentar (CA)		1,568
Conversão Alimentar Corrigida (CAC)	2,400	1,441
Ganho peso diário (GPD)		69,54
Índice de eficiência produtiva (IEP)		434,91

ANEXO G – Dados zootécnicos do lote.

	Idade (Semanas)					
	1*	2	3	4	5	6
Fotoperíodo (h)	23	18	18	18	18	18
Escuro (h)	1	6	6	6	6	6
Iluminância (lux)	25	15	10	5	5	5
00:00h	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro
01:00h	Luz	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro
02:00h	Luz	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro
03:00h	Luz	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro
04:00h	Luz	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro
05:00h	Luz	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro	Escuro
06:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
07:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
08:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
09:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
10:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
11:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
12:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
13:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
14:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
15:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
16:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
17:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
18:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
19:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
20:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
21:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
22:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz
23:00h	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz	Luz

* 1º dia de vida = 24 horas de luz

ANEXO H – Programa de luz adotado durante toda criação do lote.