

Relatório dos Projetos Concluídos 2009



ISSN 0101- 6245
Versão Eletrônica
Dezembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 138

Relatório dos Projetos Concluídos 2009

*Arlei Coldebella
Gerson Neudi Scheuermann
Editor*

Embrapa Suínos e Aves
Concórdia, SC
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Rodovia BR 153 - KM 110

89.700-000, Concórdia-SC

Caixa Postal 21

Fone: (49) 3441 0400

Fax: (49) 3441 0497

<http://www.cnpsa.embrapa.br>

sac@cnpsa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Suínos e Aves

Presidente: Gilberto S. Schmidt

Secretária: Tânia M.B. Celant

Membros: Gerson N. Scheuermann

Jean C.P.V.B. Souza

Helenice Mazzuco

Nelson Morés

Rejane Schaefer

Suplentes: Mônica C. Ledur

Antônio L. Guidoni

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant

Revisão técnica: Elsie A.P. de Figueiredo, Fátima R.F. Jaenisch, Jalusa D. Kich, João B. Ribeiro, Juliano C. Córrea, Liana Brentano, Martha M. Higarashi, Paulo S. Rosa, Teresinha M. Bertol, Valdir S. de Avila, Virginia S. Silva

Revisão gramatical: Jean C.P.V.B. Souza

Normalização bibliográfica: Claudia A. Arrieche

Editoração eletrônica: Vivian Fracasso e Roberto C. Marca

Ilustração da capa: Única Propaganda

1ª edição

Versão eletrônica (2009)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Suínos e Aves

Relatório dos projetos concluídos em 2009 / editado por Arlei Coldebella e Gerson Neudi Scheuermann. – Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2009.

100p.; 21cm. (Documentos/Embrapa Suínos e Aves, ISSN 01016245; 138).

1. Instituição de pesquisa (Embrapa Suínos e Aves), - Relatório. I. Scheuermann, Gerson Neudi. II. Coldebella, Arlei. III. Série.

CDD 630.72

© Embrapa 2009

Autores

Airton Kunz

Químico Industrial, D.Sc. em Química,
pesquisador da Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC, airton@cnpsa.embrapa.br

Alexandre Rodrigues Caetano

Zootecnista, Ph.D. em Genética e Melhoramento
Animal, pesquisador da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF,
caetano@cenargen.embrapa.br

Aline Viancelli

Bióloga, M.Sc. em Ecologia, bolsista do
CNPq/DTI, Concórdia, SC

Allan Durigon

Médico Veterinário, funcionário da Sadia S.A.,
Concórdia, SC

Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura

Zootecnista, Ph.D. em Genética e Melhoramento
Animal, professora assistente Doutora do
Departamento de Produção Animal, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP,
Botucatu, SP, anamoura@fca.unesp.br

Arlei Coldebella

Médico Veterinário, D.Sc. em Ciência animal e pastagens, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, arlei@cnpasa.embrapa.br

Benito Guimarães de Brito

Médico Veterinário, D.Sc. em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador CNPq - DT – II, FEPAGRO-IPVDF, Laboratório Saúde das Aves, www.ipvdf.rs.gov.br

Carlos Alberto Fagonde Costa

Médico Veterinário, D.Sc em Ciências Biológicas, pesquisador aposentado da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Clarissa Boschiero

Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, clarissaboschi@yahoo.com

Clarissa Silveira Luiz Vaz

Médica Veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, clarissa@cnpasa.embrapa.br

Claudio Bellaver

Médico Veterinário, Ph.D. em Nutrição de monogástricos, pesquisador aposentado da Embrapa Suínos e Aves e Diretor da Qualityfoco Consultoria Ltda, Concórdia, SC, bellaver@netcon.com.br

Daiane Voss Rech

Bióloga, B.Sc. em Ciências Biológicas, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, daiane@cnpasa.embrapa.br

Deborah Clea Ruy

Medica Veterinária, D.Sc. em Agronomia,
professora da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária - UNB, Brasília, DF, dcruy@unb.br

Dirceu Luís Zanotto

Biólogo, M.Sc. em Zootecnia, pesquisador da
Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC,
zanotto@cnpesa.embrapa.br

Douglas Bayer Vieira

Biomédico, M.Sc., Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, PE

Elsio Antonio Perreira de Figueiredo

Zootecnista, Ph.D. em Melhoramento Animal,
pesquisador da Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC, elsio@cnpesa.embrapa.br

Eraldo Lourenso Zanella

Médico Veterinário, Ph.D. em Produção Animal,
professor Adjunto da Faculdade de Medicina
Veterinária e Agronomia da Universidade de Passo
Fundo, Passo Fundo, RS, ezanella@upf.br

Erica Elias Baron

Zootecnista, D.Sc. em Agronomia, pesquisadora
da University of Azores, Department of
Agricultural Sciences, Terra-Chã, 9701-851,
Angra do Heroísmo, Terceira, Azores, Portugal,
ebaron@uac.pt

Erik Amazonas de Almeida

Médico Veterinário, M.Sc. em Ciência Animal e
Pastagem, doutorando do Departamento de
Genética da Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, PE

Fátima Regina Ferreira Jaenisch

Médica Veterinária, M.Sc Patologia Animal,
pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC, fatima@cnpa.embrapa.br

Francisco Emanuel Alves Gonçalves

Graduando Biomedicina pela Universidade Federal
de Pernambuco, Recife, PE

Giovani Rota Bertani

Médico Veterinário, Ph.D. Genômica Animal,
professor do Departamento de Bioquímica e LIKA,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE,
gbertani@ gmail.com

Helenice Mazzuco

Zootecnista, D.Sc. em Fisiologia Avícola,
pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC, hmazzuco@cnpa.embrapa.br

Hugo Moreira Soares

Engenheiro Químico, D.Sc. em Engenharia
Ambiental, professor da Universidade Federal de
Santa Catarina, Florianópolis, SC

Iara Maria Trevisol

Médica Veterinária, M.Sc. em Medicina
Veterinária, pesquisadora da Embrapa Suínos e
Aves, Concórdia, SC, iara@cnpa.embrapa.br

Jalusa Deon Kich

Médica Veterinária, D.Sc. em Ciências
Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e
Aves, Concórdia, SC, jalusa@cnpa.embrapa.br

Jane de Oliveira Peixoto

Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia, pesquisadora da
Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC,
jane@cnpa.embrapa.br

Jorge Vitor Ludke

Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Zootecnia,
pesquisador da Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC, jorge@cnpesa.embrapa.br

Jakeline França Azevedo

Graduanda em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Recife, PE

Kátia Nones

Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Agronomia,
gerente da Microarray Facility, Queensland Centre
for Medical Genomics, Queensland University,
Brisbane, Australia, k.nones@uq.edu.au

Kelly Cristina Tagliari de Brito

Bióloga, D.Sc. em Biotecnologia, Laboratório de
Pesquisa e Diagnóstico Ecolvet,
kelly@ecolvet.com.br

Kerli Ninov

Bióloga, M.Sc. em Agronomia, doutoranda em
Ciências na ESALQ/USP, Piracicaba, SP,
kerli.ninov@gmail.com

Laura Helena Vega Gonzales Gil

Médica Veterinária, Ph.D. em Virologia Molecular
e Imunidade Inata, pesquisadora da
Fiocruz/CPOAM, Recife, PE,
laura@cpqam.fiocruz.br

Liana Brentano

Médica Veterinária, Ph.D. em Medicina
Veterinária, pesquisadora da Embrapa Suínos e
Aves, Concórdia, SC, liana@cnpesa.embrapa.br

Luana Alves

Acadêmica de Ciências Biológicas, bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq, Concórdia, SC

Luís Fernando Batista Pinto

Zootecnista, D.Sc. em Agronomia, professor da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, luisfbp@gmail.com

Luiz Carlos Ajala

Técnico agrícola, assistente da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, lajala@cnpesa.embrapa.br

Luiz Lehmann Coutinho

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Ciência Animal, professor titular do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, llcoutin@esalq.usp.br

Luziane Franciscon

Estatística, M.Sc em Estatística e experimentação Agronômica, analista da Embrapa Florestas, Curitiba, PR, luziane@cnpf.embrapa.br

Marcel Ambo

Biólogo, M.Sc. em Agronomia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, marcel.ambo@gmail.com

Márcia Regina Franke Kavalli

Médica Veterinária, Fiscal Federal Agropecuário, Serviço de Inspeção Federal, márcia.franke@agricultura.gov.br

Martha Mayumi Higarashi

Química, D.Sc. Química, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, martha@cnpesa.embrapa.br

Mônica Corrêa Ledur

Zootecnista, Ph.D. em Genética e Melhoramento Animal, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, mledur@cnpsa.embrapa.br

Paulo Augusto Esteves

Biólogo, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, pesteves@cnpsa.embrapa.br

Paulo Giovanni de Abreu

Engenheiro Agrícola, D.Sc. em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, pabreu@cnpsa.embrapa.br

Raquel de Lello Rocha Campos

Bióloga, M.Sc. em Agronomia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, raquel.lello@gmail.com

Ricardo Alfredo Soncini

Médico Veterinário, D.Sc. em Ciências Veterinárias, consultor em Patologia e Produção Animal, ricardo.soncini@uol.com.br

Ricardo Luis Radis Steinmetz

Químico Industrial, M.Sc. em Química, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, ricardo@cnpsa@embrapa.com

Russolina Benedeta Zingali

Farmacêutica e Bioquímica, D.Sc. em Química Biológica, professora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

Sílvia Neto Jardim Belicuas

Bióloga, D.Sc. em Genética, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, silvia@cnpms.embrapa.br

Teresinha Marisa Bertol

Zootecnista, Ph.D. em Zootecnia, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC,
tbertol@cnpsa.embrapa.br

Valéria Maria Nascimento Abreu

Zootecnista, D.Sc. em Genética e Melhoramento,
pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC, valeria@cnpsa.embrapa.br

Waldomiro Barioni Júnior

Estatístico. M.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudoeste, São Paulo, SP

Sumário

Capítulo 1

Utilização do flotado industrial de frigorífico na produção de farinha mista suína destinada ao uso em rações para frangos de corte e suínos..... 17

Capítulo 2

Utilização de bacteriófagos no controle biológico de *Salmonella* Enteritidis em frangos..... 29

Capítulo 3

Desenvolvimento de novos sistemas para remoção de nitrogênio em resíduos com alta carga de nutrientes visando sua aplicação a dejetos de suínos..... 41

Capítulo 4

Mapeamento de regiões genômicas associadas a características de produção e qualidade da carcaça em aves..... 51

Capítulo 4.1

Análise de genes candidatos para características de produção e qualidade da carcaça em aves..... 55

Capítulo 4.2

Mapeamento de QTL para características de produção e qualidade da carcaça em aves..... 65

Capítulo 5

Coccidiose: caracterização fenotípica e molecular de linhagens de aves com vistas a estudar os mecanismos de resistência genética e desenvolver linhagens resistentes..... 79

Capítulo 6

Estudo dos fatores de risco associados a problemas tegumentares, com ênfase em Dermatite Necrótica (*Celulite*) e dermatoses dos frangos..... 89

Apresentação

A presente publicação visa relatar os principais resultados de projetos de pesquisa da Embrapa Suínos e Aves, finalizados no ano de 2008. O objetivo desta publicação é prestar contas das nossas ações de pesquisa e de construir uma memória técnica desta Unidade.

No caso específico desta publicação, são apresentados resultados de seis projetos, os quais atendem demandas do setor produtivo em diversas áreas: aproveitamento de resíduos agroindustriais; remoção de nitrogênio visando o tratamento de dejetos suínos; genômica para características de produção, qualidade de carcaça e resistência à coccidiose em aves; controle biológico de *Salmonella* enteritidis em frangos e controle de celulite em frangos.

Os relatórios dos projetos estão subdivididos em introdução, objetivos, resultados e discussão, tecnologias geradas e considerações finais, a fim de facilitar a compreensão e o entendimento dos resultados dos projetos executados pela Embrapa Suínos e Aves.

Arlei Coldebella
Editor

Capítulo 1

Utilização do flotado industrial de frigorífico na produção de farinha mista suína destinada ao uso em rações para frangos de corte e suínos

Dirceu Luís Zanotto
Claudio Bellaver
Arlei Coldebella
Jalusa Deon Kich
Luiz Carlos Ajala

Introdução

No Brasil as cadeias de frango de corte e de suínos são bem organizadas, promovendo uma produção em torno de 12 milhões de toneladas de carne por ano, sendo 9 milhões de carne de frango e 3 milhões de carne suína.

Nos frigoríficos, em decorrência dos procedimentos utilizados no abate animal, processamento da carcaça e produção de derivados alimentícios, verifica-se a produção e descarte de grande quantidade de resíduos. Apresentando elevado grau de perecibilidade, esses resíduos necessitam de cuidados especiais quanto ao destino final, a fim de prevenir sua decomposição e, desta forma, a geração e proliferação de agentes contaminantes, os quais se constituem numa ameaça à preservação da biossegurança e do meio ambiente.

Os resíduos da atividade frigorífica de aves e suínos podem ser classificados da seguinte forma:

1. **Subprodutos não comestíveis:** esta categoria de resíduos inclui, principalmente vísceras, órgãos, sangue, ossos, penas, aparas de carne e de gordura. Em conformidade com a Instrução Normativa N^o 34, de 28 de maio de 2008 – MAPA, os “subprodutos não comestíveis”, por meio de processamento térmico, são transformados em farinha animal, destinada à produção de ração. No Brasil, estima-se uma produção em torno de 4 milhões de toneladas de farinha animal por ano, representando uma importante fonte de proteína e energia para a indústria de ração, em complemento ao milho e farelo de soja.
2. **Efluentes líquidos:** são constituídos basicamente pela água remanescente da utilização na atividade frigorífica (abate animal, processamento de carcaça e derivados alimentícios), que carrega os resíduos de sangue, aparas de carne e de gordura, fragmentos de vísceras e de ossos, entre outros. No Brasil, considerando apenas os frigoríficos de aves e suínos, estima-se uma produção em torno de 160 milhões de m³ de “efluentes

líquidos” /ano. Estes efluentes, paralelamente a sua geração, são conduzidos através de tubulação até uma central de processamento, onde, por meio de floculação e flotação, são separados em duas fases: a fase que contém os sólidos flotados, sob forma de “lodo” e, a fase líquida propriamente dita.

A fase líquida, segue para tratamento complementar em lagoas facultativas, sendo após liberada ao meio ambiente, via corpos d’água perene, com observância na legislação ambiental vigente.

Por outro lado, a fase dos sólidos flotados carece de destino adequado, se opondo a prática usual de despejo em aterro sanitário, predispondo biomas à contaminações química e microbiológica, o que compromete a preservação da saúde pública e do meio ambiente como um todo. Uma alternativa reside na centrifugação dos sólidos flotados, eliminando o excesso de água e concentrando nutrientes, o que resulta num composto orgânico com valor nutricional à ser investigado, sendo denominado de Flotado Industrial de Frigorífico. Estima-se potencial para uma produção em torno de um milhão de toneladas de Flotado Industrial de Frigorífico por ano.

Considerando que, tanto os “subprodutos não comestíveis”, como o Flotado Industrial de Frigorífico, são derivados da atividade frigorífica e que, o processamento dos “subprodutos não comestíveis” resulta na produção de farinha animal, então, pressupõe-se que o Flotado Industrial de Frigorífico pode ser incorporado aos “subprodutos não comestíveis” no processo de produção de farinha animal.

Ressalta-se que a indústria de ração necessita de ingredientes em complementação ao milho e ao farelo de soja, principalmente nos períodos de entressafra, de modo que a farinha animal representa uma excelente opção.

Objetivo geral

Avaliar a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico na produção de Farinha Mista Suína e subsequente utilização nas rações para aves e suínos, considerando o desempenho zootécnico e a segurança da carne.

Objetivos específicos

- a) Determinar a composição em nutrientes do Flotado Industrial de Frigorífico e da Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico;
- b) Verificar a presença de contaminantes químicos (metais pesados, resíduos de pesticidas e bifenilas policloradas) no Flotado Industrial de Frigorífico e na Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico;
- c) Verificar a presença de contaminantes microbiológicos no Flotado Industrial de Frigorífico e na Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico;
- d) Determinar o valor da energia metabolizável da Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, para aves e suínos;
- e) Verificar o efeito da utilização de ração contendo Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, sobre o desempenho e características de carcaça de aves e suínos;
- f) Verificar a presença de resíduos de contaminantes químicos na carne de aves e de suínos, alimentados com ração contendo Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico.

Resultados e discussão

Composição em nutrientes do flotado industrial de frigorífico

Observou-se no Flotado Industrial de Frigorífico um considerável valor em nutrientes (1), expresso, principalmente, por proteína bruta (44,03%), extrato etéreo (32,74%), cálcio (1,03%), fósforo (1,03%), além de um excelente perfil de aminoácidos essenciais, sendo comparável ao perfil de aminoácidos do farelo de soja com 45% de proteína bruta. Estes resultados evidenciaram o potencial para a inclusão do Flotado Industrial de Frigorífico no processo de produção de Farinha Mista Suína. Observou-se, ainda, um elevado teor de ferro (2.511 mg/kg). Porém, considerando uma inclusão de 10% do Flotado Industrial de Frigorífico na produção de Farinha Mista Suína, com igual nível de inclusão da Farinha na ração, o Flotado Industrial de Frigorífico estaria contribuindo com apenas 25,1 mg/kg no teor de ferro da ração.

Sendo o nível dietético tolerável de ferro para suínos de 3.000 mg/kg, descarta-se qualquer possibilidade de intoxicação devido ao ferro proveniente do Flotado Industrial de Frigorífico. Além disso, não foi detectado efeito significativo ($p > 0,05$) de lote de produção (dia e turno), sobre a composição de nutrientes do Flotado Industrial de Frigorífico, indicando a eficácia do controle da qualidade do processo de produção.

Contaminantes químicos no flotado industrial de frigorífico e na farinha mista suína produzida com e sem flotado industrial de frigorífico

No Flotado Industrial de Frigorífico e na Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, foi avaliado a presença dos seguintes contaminantes:

1. **Metais pesados:** arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio.

2. **Pesticidas:** hexaclorobenzeno, alfa-BHC, beta-BHC, lindano, heptaclor, aldrin, dieldrin, endrin, 4,4-DDT (p,p-DDT), metoxichlor, methylparathion, parathion, clordano, mirex, ethion análogos O₂ e etil malation.
3. **Bifenilas policloradas (PCBs):** tricloro bz 28, tetracloro bz 52, pentacloro bz 101, pentacloro bz 118, hexacloro bz 153, hexacloro bz 138, heptacloro bz 180 e PCBs total. Não foi detectada presença destes contaminantes no Flotado Industrial de Frigorífico, nem na Farinha Mista Suína com e sem Flotado Industrial de Frigorífico (3).

Pondera-se, para qualquer situação considerada, que o limite de detecção do método analítico utilizado foi inferior ao limite máximo de resíduo permitido, para o respectivo contaminante, conforme consta na legislação. Concluiu-se que o Flotado Industrial de Frigorífico e a Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, são inócuos com relação aos contaminantes estudados.

Contaminantes microbiológicos no flotado industrial de frigorífico e na farinha mista suína produzida com e sem flotado industrial de frigorífico

No Flotado Industrial de Frigorífico e na Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, foi avaliado a presença de contaminação microbiológica por *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens* e *Enterobacteriaceas*. Considerando o Flotado Industrial de Frigorífico "in natura", foi detectado nível de contaminação acima do limite tolerável apenas para *Clostridium perfringens*. Entretanto, quando o Flotado Industrial de Frigorífico foi incluído nos "subprodutos não comestíveis" e esta mistura foi processada termicamente para produção da Farinha Mista Suína com Flotado Industrial de Frigorífico, a referida contaminação deixou de existir. Ademais, não foi observada qualquer contaminação microbiológica da Farinha Mista Suína, independente da inclusão do

Flotado Industrial de Frigorífico (2). Sob o ponto de vista de contaminação por *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens* e *Enterobacteriaceas*, evidenciou-se a inocuidade da Farinha Mista Suína produzida sem e com Flotado Industrial de Frigorífico.

Composição em nutrientes da farinha mista suína produzida com e sem flotado industrial de frigorífico

Por meio de análises laboratorial foi determinada a composição em nutrientes da Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico. Foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas farinhas apenas para proteína bruta, arginina e ferro (4, 5), sendo que a Farinha Mista Suína sem Flotado Industrial de Frigorífico apresentou maior teor de proteína bruta (48,96 vs 47,23%) e arginina (3,32 vs 3,22%) e menor teor de ferro (678 vs 929 mg/kg). Estas diferenças foram devidas ao desbalanceamento dos referidos nutrientes no produto final, em função de seus diferentes teores no Flotado Industrial de Frigorífico e na Farinha Mista Suína convencional (sem Flotado Industrial de Frigorífico). Contudo, a composição de nutrientes da Farinha Mista Suína, independente da inclusão do Flotado Industrial de Frigorífico, foi semelhante a composição que se verifica na literatura para uma farinha convencional.

Energia metabolizável da farinha mista suína produzida com e sem flotado industrial de frigorífico, para aves

O valor de energia metabolizável aparente corrigida (EMAc) da Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, para aves, foi determinado através de experimento de metabolismo "*in vivo*" com frangos de corte, sendo utilizado o método de coleta total de excretas. Os valores de EMAc para a Farinha Mista Suína produzida com e sem Flotado Industrial de Frigorífico, foram de 2.564 e 2.578 kcal/kg, respectivamente, não

sendo detectada diferença significativa ($p=0,7883$) (4). Desta forma, pode-se considerar como EMAC, para ambas as Farinhas, o valor médio de 2.571 kcal/kg.

Energia metabolizável da farinha mista suína produzida com e sem flotado industrial de frigorífico, para suínos

O valor de energia metabolizável aparente corrigida (EMAC) da Farinha Mista Suína produzida com e sem a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, para suínos, foi determinado através de experimento de metabolismo "*in vivo*" com suínos na fase de crescimento-terminação, sendo utilizado o método de coleta total de fezes e urina e óxido férrico como marcador fecal. Os valores de EMAC para a Farinha Mista Suína produzida com e sem Flotado Industrial de Frigorífico, foram de 2.849 e 2.781 kcal/kg, respectivamente, não sendo detectada diferença significativa ($p=0,5785$) (5). Desta forma, pode-se considerar como EMAC, para ambas as farinhas, o valor médio de 2.815 kcal/kg.

Utilização da farinha mista suína produzida com e sem flotado industrial de frigorífico em dietas para frangos de corte: efeito sobre o desempenho, característica de carcaça e resíduos na carne

Foi conduzido um experimento com frangos de corte de 1 a 42 dias de idade, para avaliar o efeito da utilização de dietas contendo Farinha Mista Suína produzida com e sem Flotado Industrial de Frigorífico, sobre o desempenho, característica de carcaça e resíduos químicos na carne das aves. Foram avaliadas três dietas (D) com oito repetições de 30 aves por boxe, sendo: D1 = Testemunha, a base de milho e farelo de soja, suplementada com minerais e vitaminas; D2 = Idem D1, com 10% de Farinha Mista Suína sem Flotado Industrial de Frigorífico; D3 = Idem D1, com 10% de FCO com Flotado Industrial de Frigorífico.

Não foi detectado efeito significativo ($p > 0,05$) das dietas experimentais, sobre o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar (6). Exceto pelo rendimento de peito que foi maior ($p < 0,05$) para as aves que receberam a dieta testemunha, não foi detectado efeito significativo ($p > 0,05$) das dietas experimentais, sobre as demais características de carcaça: pesos de carcaça, de pés, de gordura abdominal, de coração, de fígado, de moela, além dos rendimentos de carcaça, de peito, de coxa + sobrecoxa, de asas e de dorso (8). Também não foi detectada presença de qualquer resíduo químico no fígado, músculo e gordura abdominal dos frangos (7), considerando:

1. **Metais pesados:** arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio;
2. **Pesticidas:** hexaclorobenzeno, alfa-BHC, beta-BHC, lindano, heptaclor, aldrin, dieldrin, endrin, 4,4-DDT (p,p-DDT), metoxichlor, methylparathion, parathion, clordano, mirex, ethion análogos O₂ e etil malation);
3. **PCBs:** tricloro bz 28, tetracloro bz 52, pentacloro bz 101, pentacloro bz 118, hexacloro bz 153, hexacloro bz 138, heptacloro bz 180 e PCBs totais.

Concluiu-se que a Farinha Mista Suína produzida com a inclusão de 10% de Flotado Industrial de frigorífico, pode ser utilizada nas rações para frangos de corte, mantendo otimizados o desempenho zootécnico, a segurança da carne e as características de carcaça das aves, comparados com a utilização da Farinha Mista Suína sem Flotado Industrial de Frigorífico.

Utilização da farinha mista suína produzida com e sem flotado industrial de frigorífico em dietas para suínos: efeito sobre o desempenho, característica de carcaça e resíduos na carne

Foi realizado um experimento com suínos na fase de crescimento-terminação (29,53 aos 99,11 kg), para avaliar o efeito da utilização de

dietas contendo Farinha Mista Suína produzida com e sem Flotado Industrial de Frigorífico, sobre o desempenho, característica de carcaça e resíduos químicos na carne dos animais. Foram avaliadas três dietas (D) com 10 repetições de um animal na baía, sendo: D1 = Testemunha, a base de milho e farelo de soja, suplementada com minerais e vitaminas; D2 = Idem D1, com 10% de Farinha Mista Suína sem Flotado Industrial de Frigorífico; D3 = Idem D1, com 10% de Farinha Mista Suína com Flotado Industrial de Frigorífico.

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) das dietas experimentais, sobre o consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar, peso da carcaça, rendimento de carcaça, profundidade de lombo, espessura de toucinho e rendimento de carne (9). Também não foi detectada presença de qualquer resíduo químico no fígado, músculo e gordura intrabdômica dos animais, considerando: metais pesados, pesticidas e PCBs (10).

Concluiu-se que a Farinha Mista Suína, independente da inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, pode ser utilizada nas rações de suínos na fase de crescimento-terminação, sem prejudicar o desempenho, características de carcaça e segurança da carne.

Tecnologias geradas

Conhecimento sobre a composição de nutrientes e valor energético da Farinha Mista Suína produzida com a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, para aves e suínos.

Viabilidade da utilização da Farinha Mista Suína produzida com a inclusão de 10% de Flotado Industrial de Frigorífico, nas rações para frangos de corte e suínos na fase de crescimento-terminação.

Considerações finais

A efetiva utilização das referidas tecnologias pelo setor produtivo, fica na dependência de reconhecimento oficial, por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Neste contexto, o Flotado Industrial de Frigorífico passaria a integrar as matérias primas (subprodutos não comestíveis) para a produção de farinha animal, com observância no Regulamento Técnico da Inspeção Higiênico-Sanitário e Tecnológica do Processamento de Resíduos de Animais”, que constam da Instrução Normativa nº 34, de 28 de maio de 2008 do MAPA.

Desta forma, além de se agregar valor às cadeias de frangos de corte e suínos, se estaria contribuindo para a preservação da biossegurança e do meio ambiente.

Referências

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; BRUM, P.A.R. de; COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; CUNHA JUNIOR, A; AJALA, L. C. Flotado de efluentes de frigorífico de suínos e de aves. 1. Composição química para usos comerciais alternativos. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3., 2006, Foz do Iguaçu. *Anais e trabalhos científicos*. S.l.: s.n., 2006. 1 CD-ROM.

ZANOTTO, D.L.; KICH, J.D.; BELLAVER, C.; SANTIANI, M.J.; LOCATELLI, C.; TRIQUES, N. Farinha de carne e ossos com resíduo flotado de efluentes: Avaliação da presença de contaminantes microbiológicos. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS., 13., 2007, Florianópolis. *Anais*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. 1 CD-ROM.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G.N.; LUDKE, J. V.; SANTIANI, M.J.; AJALA, L.C. Farinha de carne e ossos com resíduo flotado de efluentes: avaliação da presença de contaminantes químicos. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS., 13., 2007, Florianópolis. *Anais*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. 1 CD-ROM.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; BRUM, P.A.R. de; COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G.N.; CUNHA JUNIOR, A. Inclusão de flotado de efluente de frigorífico na produção de farinha de carne e osso suína (FCO). 1. Composição centesimal e energia metabolizável para frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola - Suplemento 9*, p149, 2007.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; BRUM, P.A.R. de; COLDEBELLA, A.; LIMA, G.J.M.M. de; AJALA, L.C. Farinha de carne e ossos com resíduo flotado de efluentes: Teor de aminoácidos e energia metabolizável para suínos. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS., 13., 2007, Florianópolis. *Anais*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. 1 CD-ROM.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; BRUM, P.A.R. de; COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G.N.; SANTIANI, M.J. Desempenho de frangos de corte submetidos a ração contendo farinha de carne e ossos com flotado industrial de frigorífico. *Revista Brasileira de Ciência Avícola - Suplemento 10*, p159, 2008.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; BRUM, P.A.R. de; COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G.N.; SANTIANI, M.J. Resíduos químicos em frangos submetidos a ração contendo farinha de carne e ossos com flotado industrial de frigorífico. *Revista Brasileira de Ciência Avícola - Suplemento 10*, p158, 2008.

ZANOTTO, D.L.; SCHMIDT, G.S.; COLDEBELLA, A.; MAZZUCO, H.; BRUM, P.A.R. de. Características de carcaça de frangos de corte alimentados com ração contendo farinha de carne e ossos com flotado industrial de frigorífico. In: ZOOTEC 2008 - CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 18.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 10., 2008, João Pessoa. *Perfil profissional e demanda de mercado: Anais*. João Pessoa: UFPB; Embrapa Caprinos: ABZ, 2008. 1 CD-ROM.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; COLDEBELLA, A.; LUDKE, J.V.; AJALA, L.C.; FRANCISCON, L. Desempenho de suínos submetidos a ração contendo farinha de carne e ossos com flotado industrial de frigorífico. In: FÓRUM INTERNACIONAL DA SUINOCULTURA, 4; 2008. Curitiba, PR. *Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves*, 2008. p.193-194. 1 CD-ROM.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C.; LUDKE, J.V.; AJALA, L.C. Resíduos químicos em suínos submetidos a ração contendo farinha de carne e ossos com flotado industrial de frigorífico. In: FÓRUM INTERNACIONAL DA SUINOCULTURA, 4; 2008. Curitiba, PR. *Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves*, 2008. p.195-196. 1 CD-ROM.

Capítulo 2

Utilização de bacteriófagos no controle biológico de *Salmonella* Enteritidis em frangos

Clarissa Silveira Luiz Vaz
Daiane Voss-Rech
Luana Alves
Arlei Coldebella
Luziane Franciscan
Iara Maria Trevisol

Introdução

No Brasil a maioria dos casos de salmonelose em humanos são causados por *Salmonella* (S.) Enteritidis fagotipo (PT) 4, cuja principal forma de transmissão é o consumo de carne de frango e ovos contaminados pela bactéria. Apesar dos contínuos esforços com biossegurança nas granjas de aves, a prevalência de S. Enteritidis PT4 ainda é elevada em frangos de corte. Com a tendência mundial de reduzir o uso de antimicrobianos em animais de produção há um aumento no interesse por métodos alternativos de controle da bactéria na avicultura, dentre os quais se incluem os bacteriófagos líticos (BL), que podem ser viáveis para controle biológico de S. Enteritidis.

Três BL previamente isolados pela Embrapa Suínos e Aves, denominados CNPSA 1, CNPSA 3 e CNPSA 4, apresentaram ação sobre S. Enteritidis PT4 e reduziram a bactéria no intestino de frangos infectados em condições experimentais (Fiorentin et al., 2005). Estes BL possuem morfologia de cabeça e cauda, genoma DNA dupla fita e são genotipicamente distintos entre si (Fiorentin et al., 2004). Para aprimorar a tecnologia de uso destes BL é necessário aprofundar os estudos de atuação *in-vivo*, bem como obter maior caracterização visando a segurança do produto que é administrado de forma terapêutica às aves. Este projeto teve o objetivo de contribuir para viabilizar uma tecnologia de uso desses BL para controle biológico de S. Enteritidis PT4 em frangos de corte.

Objetivos

- Determinar a eficiência dos bacteriófagos líticos na redução da contagem de UFC (unidades formadoras de colônias) de S. Enteritidis PT4 no ceco de frangos de corte infectados.
- Ampliar a caracterização genotípica e fenotípica dos bacteriófagos líticos.

Resultados e discussão

A eficiência do tratamento com BL na redução de *S. Enteritidis* PT4 no ceco de frangos de corte foi avaliada em diferentes fases de crescimento de aves SPF infectadas pela via oral no primeiro dia de vida com uma amostra de referência da bactéria. Para avaliação do tratamento na fase inicial de crescimento, foi realizada a contagem inicial de UFC/g de conteúdo cecal no 5º dia de vida (-6 pós-tratamento, pt), seguida da separação das aves em grupo controle (infectado) e tratado (infectado e tratado com BL). O grupo tratado recebeu a dose de 10^9 unidades formadoras de placa (UFP) de cada BL diluída na água de beber, administrada do 6º ao 10º dia de vida. A contagem de UFC no conteúdo cecal foi realizada nas aves de ambos os grupos nos dias 1, 4, 7 e 10 pt. O tratamento com BL na fase final de crescimento dos frangos foi também avaliado em aves infectadas no 1º dia de vida, as quais foram mantidas em contato até o 31º dia de vida, quando foi realizada a contagem inicial de UFC/g de conteúdo cecal, seguida da separação das aves em grupo controle (infectado) e tratado. O grupo tratado recebeu o tratamento com BL entre o 31º e 35º dia de vida. A avaliação da contaminação por *S. Enteritidis* PT4 no ceco foi procedida nos dias 1, 4, 7 e 10 pt.

Os resultados da avaliação quantitativa de *S. Enteritidis* PT4 no ceco das aves dos grupos controle e tratado na fase inicial de crescimento, transformada em escala logarítmica, mostraram diferença estatística entre a contagem inicial de UFC de *S. Enteritidis* PT4 no dia -6 pt em relação aos demais dias pt ($P < 0,0001$). Os BL foram efetivos na redução de UFC/g de conteúdo cecal, havendo menores contagens no grupo tratado em relação ao grupo controle em todos os dias pt avaliados (Figura 1). No tratamento com BL aplicado na fase final de crescimento dos frangos, houve diferença significativa entre a contagem inicial de UFC/g em relação aos dias 4, 7 e 10 pt ($P < 0,05$), contudo não ocorreu efeito de grupo, indicando que não há diferença entre o grupo tratado e controle (Figura 2). Na fase final de

crescimento, a ação dos BL parece ser desfavorecida pela diminuição da concentração de *S. Enteritidis* no ceco que ocorre nas semanas seguintes à inoculação das aves, sugerindo que os BL pesquisados pela Embrapa Suínos e Aves atuam melhor frente a altas concentrações da bactéria.

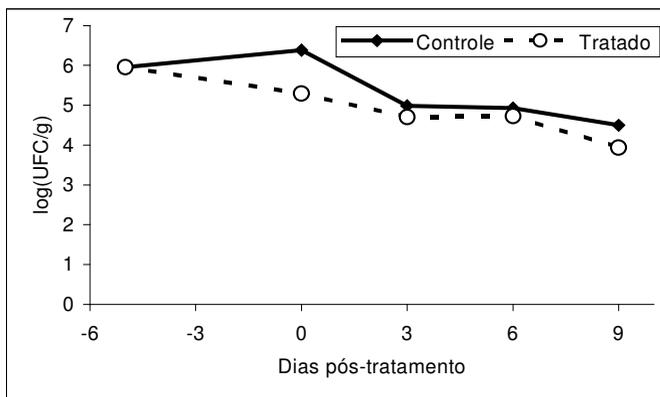


Figura 1. Médias de UFC de *S. Enteritidis* PT4/ g de conteúdo cecal em frangos do grupo controle (*S. Enteritidis*) e tratado (*S. Enteritidis* + BL na fase inicial de crescimento).

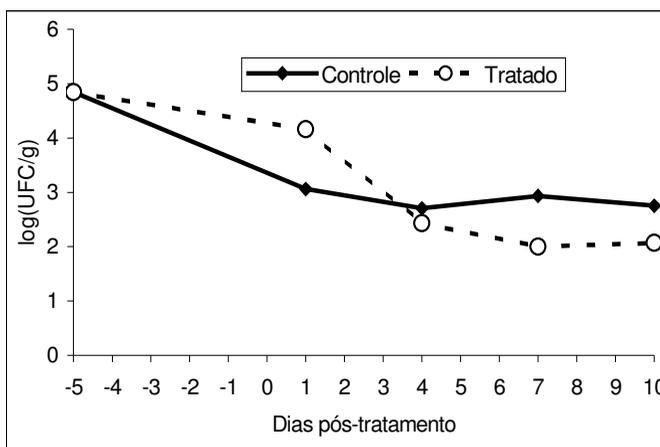


Figura 2. Médias de UFC de *S. Enteritidis* PT4/ g de conteúdo cecal em frangos do grupo controle (*S. Enteritidis*) e tratado (*S. Enteritidis* + BL na fase final de crescimento).

Com o objetivo de ampliar a caracterização genotípica e fenotípica dos bacteriófagos líticos, fragmentos de DNA amplificados por RAPD que foram específicos de cada BL (Figura 3) foram purificados, clonados e sequenciados. Foram identificados 375, 499 e 435 nucleotídeos dos BL CNPSA 1, CNPSA 3 e CNPSA 4, respectivamente, os quais foram comparados a sequências de DNA de bacteriófagos disponíveis no *GenBank*. As sequências obtidas dos BL CNPSA não apresentaram homologias significativas com sequências de DNA de outros fagos. Contudo, as maiores similaridades foram identificadas frente a sequências de bacteriófagos da ordem *Caudovirales* de genoma DNA dupla fita (Tabela 1), confirmando que os BL isolados pela Embrapa Suínos e Aves pertencem à ordem *Caudovirales*. Este resultado também sugere que estes BL não foram previamente descritos.

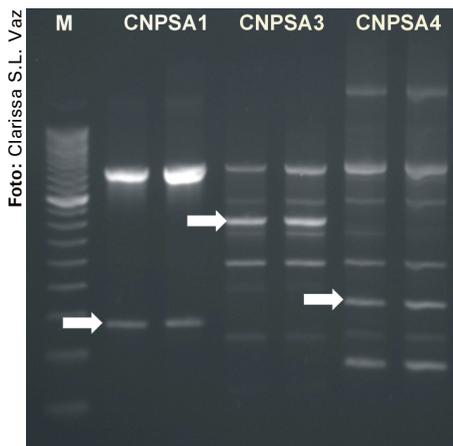
Tabela 1. Principais similaridades identificadas entre sequências de DNA dos bacteriófagos líticos CNPSA e de outros bacteriófagos.

Fago	Bacteriófago, família e bactéria hospedeira	Número de acesso	Similaridade (%)
CNPSA 1	Fago cs-t <i>Myoviridae</i> <i>Clostridium botulinum</i> tipo C	EMBL: AP008983	66,7
	Fago Lv-1 <i>Siphoviridae</i> <i>Lactobacillus jensenii</i>	EMBL: EU871039	65,4
	Bacteriófago K1F <i>Podoviridae</i> <i>Escherichia coli</i>	EMBL: DQ111067	61,8
CNPSA 3	Bacteriófago 187 <i>Siphoviridae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	EMBL: AY954950	65,9
	Profago de <i>Campylobacter</i> <i>Campylobacter jejuni</i>	EMBL: EF694684	60,8
	Fago P-SSM2 <i>Myoviridae</i> <i>Prochlorococcus</i>	EMBL: AY939844	59,8

Continua...

Tabela 1. Continuação...

Fago	Bacteriófago, família e bactéria hospedeira	Número de acesso	Similaridade (%)
CNPSA 4	Gene <i>alt</i> do Fago T4 <i>Myoviridae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	EMBL: X15811	78,6
	Fago Xop411 <i>Siphoviridae</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	EMBL: DQ777876	75,0
	Fago EL <i>Myoviridae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EMBL: AJ697969	72,9
	Fago phiEco32 <i>Podoviridae</i> <i>Escherichia coli</i>	EMBL: EU330206	72,3



Os fragmentos de DNA selecionados de cada BL para sequenciamento são indicados. M, marcador de tamanho molecular (*ladder* 100 pb).

Figura 3. Perfis de RAPD obtidos dos BL (CNPSA 1, 3 e 4).

Por outro lado, a investigação da estabilidade *in vivo* dos BL é fundamental para garantir a eficiência e a segurança de uso dessa tecnologia de controle biológico. Peptídeos e DNA obtidos do *pool*

contendo os 3 BL foram analisado por SDS-PAGE e AFLP modificado, respectivamente, antes do fornecimento às aves e após a passagem pelo trato gastrointestinal dos frangos. O *pool* contendo 3×10^7 UFP/mL de cada BL foi administrado na água de beber do 3º ao 6º dia de vida das aves e suabes de cloaca foram coletados de todas as aves nos 7º, 10º, 13º e 16º dias de vida para reisolamento dos BL. Foram identificados peptídeos predominantes, cujo principal apresentou 50 KDa, os quais provavelmente correspondem a proteínas estruturais dos BL (Figura 4). O perfil de peptídeos dos BL não apresentou alterações após a passagem pelo trato intestinal das aves. A análise genotípica por AFLP também não identificou alterações nos BL durante a permanência no trato gastrointestinal das aves (Figura 5), e confirmou a identidade dos fagos administrados às aves e reisolados dos suabes de cloaca. Embora os BL analisados individualmente apresentem genótipos distintos, os perfis de SDS-PAGE foram semelhantes entre os BL, confirmando que as principais proteínas estruturais de bacteriófagos tendem a ser conservadas. Alterações sofridas pelos BL durante a passagem pelo trato gastrointestinal das aves podem interferir na capacidade de lise, o que poderia ter sido detectado por alterações no perfil de SDS-PAGE. A conservação dos perfis genotípico e fenotípico dos BL após a passagem pelo trato intestinal sugere não haver alterações estruturais significativas nos BL durante sua permanência no organismo das aves.

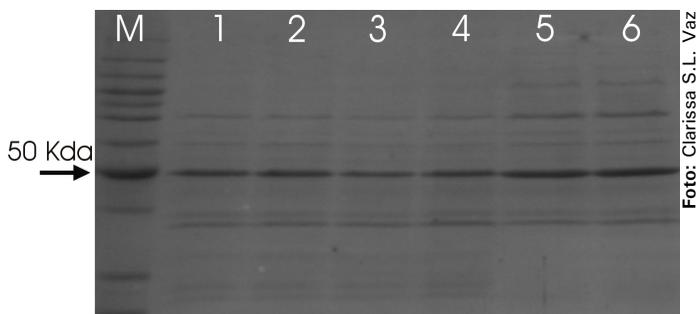
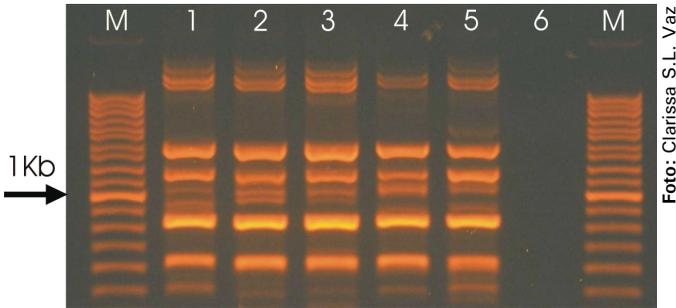


Figura 4. Análise por SDS-PAGE de peptídeos dos BL após passagem pelo trato gastrointestinal dos frangos.



M, marcador (*ladder* 100 pb); 1, *mix* de BL antes da administração às aves; 2-5, *mix* de BL após passagem pelo trato intestinal das aves; 6, controle negativo (sem DNA).

Figura 5. Perfis de AFLP modificado obtidos do *pool* de BL antes e após passagem pelo trato gastrointestinal de frangos.

Um dos requisitos para o uso terapêutico dos BL é apresentar ação específica sobre diferentes linhagens da bactéria-alvo que circulam no campo, sem no entanto afetar a flora normal das aves tratadas. O efeito dos BL CNPSA foi analisado frente a *S. Enteritidis* PT4 isoladas no Brasil, assim como outros fagotipos de *S. Enteritidis* que ocorrem no país e sorovares de *Salmonella* de diferentes sorogrupos isolados de aves. A especificidade foi também avaliada frente a outras espécies de bactérias de importância na avicultura, como *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Escherichia coli*. Dentre os sorovares analisados, os BL apresentaram ação sobre *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (controle positivo), tendo efeito sobre *S. Enteritidis* PT1, PT4a, PT6a, PT9, PT11 e sobre a maioria dos isolados PT4 testados, exceto sobre o PT6 (Alves et al., 2009). Não houve efeito sobre outras espécies de bactérias testadas, dentre as quais *Lactobacillus*. Considerando a importância de *Lactobacillus* na flora das aves e sendo um gênero que muitas vezes compõe formulações de exclusão competitiva, o uso desses bacteriófagos líticos associado à exclusão competitiva pode ser uma opção para potencializar a redução de *S. Enteritidis* no trato intestinal de frangos.

Tecnologias geradas

A execução deste projeto resultou na padronização das metodologias para manutenção e amplificação laboratorial dos BL, e de uso terapêutico do *pool* de BL em frangos infectados por *S. Enteritidis*.

Considerações finais

Os resultados obtidos até o momento comprovam que os bacteriófagos líticos isolados pela Embrapa têm ação específica sobre *Salmonella* e são capazes de reduzir o número de UFC mas não a um nível satisfatório para a indústria, o que não inviabiliza o aperfeiçoamento da tecnologia por meio de novas iniciativas de pesquisa, buscando melhorar sua eficiência. Contudo, uma tecnologia de uso de BL que apresente índices satisfatórios de redução de *S. Enteritidis* em aves, de forma segura, e cuja produção seja industrialmente e financeiramente viável, não deve ser esperada a curto prazo. Apesar disso, o uso de bacteriófagos para controle biológico da bactéria vem sendo recebido com interesse, tendo sido desenvolvido neste projeto o trabalho vencedor do Prêmio Lamas 2009 de Ciência e Tecnologia Avícolas na área de sanidade, o que é um estímulo à continuidade da pesquisa.

Referências

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI JUNIOR, W. BARROS, S. *In vitro* characterization and *in vivo* properties of *Salmonellae* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, n.2, p.121-128, 2004.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI JUNIOR, W. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in the caecal contents of broiler. **Avian Pathology**, v.34, p.258-263, 2005.

ALVES, L.; VOSS, D.; VAZ, C.S.L. Ação *in-vitro* de bacteriófagos sobre bactérias de interesse na avicultura. In: Conferência APINCO de Ciência e Pesquisa Avícola, 2009, Porto Alegre, RS. **Anais...**, 2010. Publicado em CD-ROM.

Capítulo 3

Desenvolvimento de novos sistemas para remoção de nitrogênio em resíduos com alta carga de nutrientes visando sua aplicação a dejetos de suínos

Airton Kunz
Martha Mayumi Higarashi
Ricardo Luis Radis Steinmetz
Aline Viancelli
Hugo Moreira Soares
Paulo Augusto Esteves

Introdução

A temática ambiental tem ganhado corpo nas últimas décadas em nossa sociedade face ao alto impacto que as mais distintas atividades humanas têm causado sobre o ambiente, trazendo como consequência a exaustão de recursos naturais obrigando-nos a repensar o modelo de desenvolvimento adotado. Daí, o conceito de sustentabilidade (social, econômica e ambiental) das mais diversas atividades estar ganhando importância no setor produtivo.

A Embrapa, que sempre se mostrou muito atenta e tem contribuído substancialmente para a evolução do agronegócio no Brasil, acredita que a temática ambiental deve estar sempre presente nas discussões referentes à evolução das atividades agropecuárias sendo inclusive uma de suas metas de pesquisa, desenvolvimento e inovação.

Dentro deste contexto, a criação intensiva de suínos tem causado grandes problemas ambientais em algumas regiões do Brasil. Isto se deve a alta concentração de matéria orgânica e nutrientes nesta matriz que, quando não corretamente manejados e tratados, podem causar um grande impacto sobre a biota do solo e água. A produção e disposição destes dejetos em áreas onde não se tem uma demanda por nutrientes suficiente, têm causado a lixiviação e percolação de dejetos resultando em determinadas regiões altos índices de contaminação de nossos recursos hídricos.

Um dos elementos de grande preocupação no tratamento de efluentes da suinocultura é o nitrogênio. Em fase aquosa, o nitrogênio está presente em várias formas e estados de oxidação sendo as espécies de maior relevância, o nitrogênio orgânico dissolvido e particulado, o nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). O nitrogênio amoniacal apresenta-se tóxico para peixes e sua oxidação apresenta uma alta demanda de oxigênio (1 mg de NH_3 necessita de 4,6 mg de O_2). Sob o ponto de vista de saúde pública o nitrato pode causar metahemoglobinemia fruto da redução do NO_3^- a NO_2^- (por

bactérias do trato intestinal) e consequente oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} da hemoglobina, formando metahemoglobina que é incapaz de se ligar ao O_2 , impedindo assim as trocas gasosas no organismo humano. O nitrito ainda pode se combinar com aminas secundárias, provenientes da dieta alimentar, formando nitrosaminas que apresentam sabido poder mutagênico e carcinogênico.

Atualmente, o manejo mais comum aplicado aos efluentes produzidos pela suinocultura consiste no armazenamento dos dejetos em esterqueiras, eventualmente seguido de lagoas de estabilização, e posterior distribuição no solo. Apesar das lagoas apresentarem uma remoção razoável de carbono orgânico carbonáceo, o nitrogênio permanece no efluente em concentrações bastante elevadas, necessitando de um pós-tratamento para atender aos padrões de emissão de efluentes líquidos previstos na legislação ambiental brasileira (resolução Conama 357, março 2005).

Por muito tempo o limite de emissão de nitrogênio em corpos receptores previsto na legislação ambiental foi ignorado, tanto pelas empresas poluidoras quanto pelos órgãos fiscalizadores, os quais limitavam-se à observação dos parâmetros relacionados com a concentração da matéria orgânica, como a DBO e DQO. Retrato dessa postura é a atual lacuna tecnológica existente no país na área de remoção de nutrientes de efluentes.

Particularmente, para remoção de nitrogênio, as dificuldades que se colocam referem-se a tratamento biológico de altas concentrações deste nutriente, tipicamente acima de 200 mg/L. Considerando que a concentração média de nitrogênio no efluente de dejetos suínos, após o tratamento anaeróbio, permaneça em torno de 1.000 mg N total/L, uma eficiência de 90 % de remoção de nitrogênio total ainda representa um valor de 100 mg N/L no efluente final, muito acima dos exigidos pelas leis ambientais.

Atualmente, novos processos estão sendo desenvolvidos justamente para atender ao tratamento de efluentes com elevada concentração

deste poluente. Em alguns países (Japão, Estados Unidos, França) estes novos processos já estão sendo utilizados para o tratamento de efluentes gerados pela criação de animais, caracteristicamente com elevadas cargas de nutrientes.

Com base nas questões acima abordadas, pode-se afirmar que o único caminho para se chegar a níveis de nitrogênio compatíveis com os exigidos na legislação ambiental é o estudo e o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para o tratamento terciário de efluentes desta natureza.

Objetivos

- Gerar tecnologias e práticas para a remoção de nitrogênio em resíduos com alta carga deste nutriente visando sua aplicação aos efluentes de suinocultura.
- Estudar, em testes cinéticos em batelada, a possibilidade de aplicação dos processos de remoção biológica de nitrogênio em efluentes de dejetos suínos.
- Estudar o estabelecimento do processo da oxidação anaeróbia do íon amônio (Anammox) em reatores de bio-discos rotatórios com efluentes sintéticos com composição semelhante ao de dejetos suínos previamente tratados em reatores anaeróbios (UASB).
- Estudar o estabelecimento do processo *Sharon* em reator de batelada em seqüência em efluentes sintéticos com composição semelhante ao de dejetos suínos previamente tratados em reatores anaeróbios.
- Caracterizar os processos microbiológicos envolvidos na remoção de nitrogênio pela identificação dos microrganismos por técnicas de biologia molecular.
- Estabelecimento de parâmetros dos processos de remoção de nitrogênio para a utilização destes em escala semi-piloto e/ou piloto em dejetos de suínos previamente estabilizados.

Resultados e discussão

Foram testadas várias tecnologias e configurações de reatores (biodiscos, nitrificação/desnitrificação, anammox), para tratamento e remoção de nitrogênio em efluentes da suinocultura.

Os estudos realizados com reatores com biodisco se mostraram eficientes para remoção de matéria orgânica. No entanto, os biodiscos tiveram um crescimento excessivo de biomassa que causou o entumescimento e deslocamento do material aderido ao meio suporte (Figura 1). Isto causou problemas na remoção de nitrogênio pelo excesso de carbono e falta de alcalinidade do sistema.



Figura 1. Biodiscos utilizados no estudo sem crescimento (esquerda) e após o crescimento da biomassa (direita).

A remoção de nitrogênio via nitrificação/desnitrificação apresentou resultados bastante satisfatórios e estáveis para remoção de nitrogênio em efluentes da suinocultura com eficiências de remoção superiores a 70 % (Figura 2).

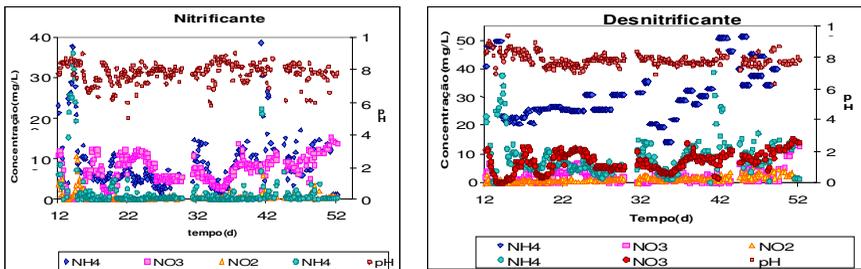


Figura 2. Remoção de nitrogênio via nitrificação (RN) desnitrificação (RD) em efluentes da suinocultura em um reator operado em escala de bancada.

O processo Anammox (do inglês *anaerobic ammonium oxidation*) foi estabelecido no laboratório de experimentação e análise ambiental (LEAA) da Embrapa Suínos e Aves a partir da aclimação de um lodo proveniente de uma lagoa desativada. O reator (figura 3) passou a

desenvolver atividade Anammox após cerca de 60 dias, sendo possível remover altas cargas de nitrogênio (cerca de $2 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ de N). A microbiota do reator em operação no LEAA foi caracterizada por seqüenciamento (figura 4), ampliação da região 16s rRNA sendo identificada uma nova espécie de microorganismo com atividade Anammox e caracterizada como *Brasiliis concordiensis*.



Foto: Airtton Kunz

Figura 3. Reator ANAMMOX em escala piloto (2 L) com meio suporte sólido, aclimatado com lodo de uma lagoa anaeróbia, em operação na Embrapa Suínos e Aves.

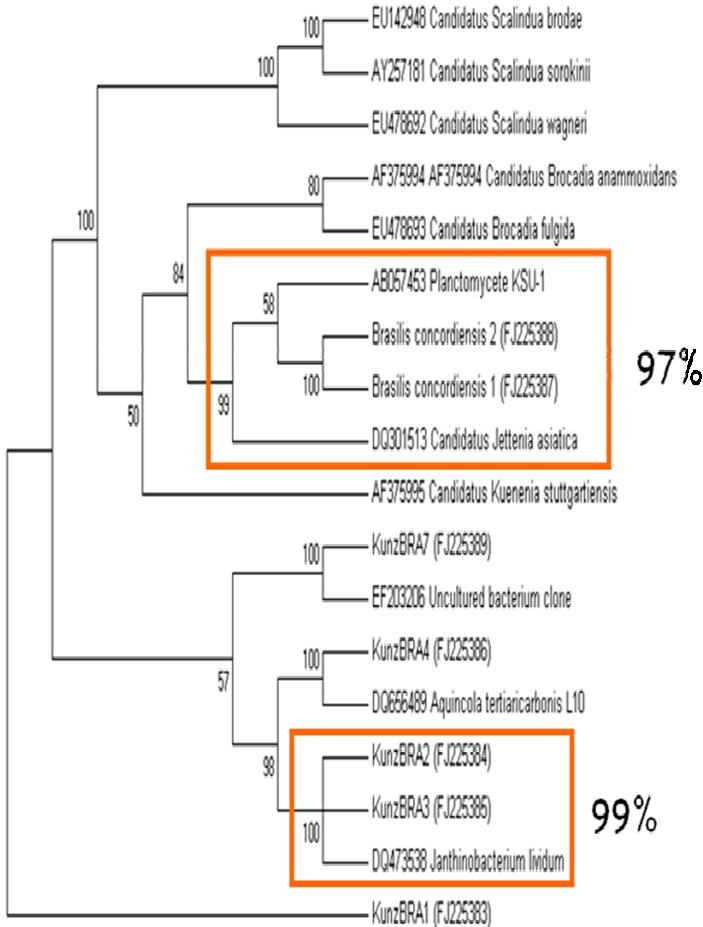


Figura 4. Dendrograma da análise filogenética realizada de amostras do lodo com atividade ANAMMOX, utilizando-se o programa MEGA 3.1. Sequências depositadas no GenBank utilizando-se o programa ClustalW (versão 1.83).

Considerações Finais

Este projeto permitiu o desenvolvimento de competências e experiências no tratamento avançado de efluentes da suinocultura. Dos processos testados o que se revelou bastante robusto foi a remoção de nitrogênio via nitrificação e desnitrificação com possibilidade de rápido aumento de escala (*scale up*).

O processo Anammox é bastante promissor com altas taxas de remoção de nitrogênio o que permite traçar cenários de sistemas de tratamento menores e mais eficientes, necessitando ainda de estudos (em execução) envolvendo a controlabilidade de processos em escala real.

Referências

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19o. ed. Washington. U.S.A, 1995.

CAMPOS, J. L.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. M.; MÉNDEZ R.; LEMA J. M.; Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. **Bioresource Technology**, v. 68, p 141-148, 1999.

JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; SCHALK, J.; VAN DONGEN, L.; VAN DE GRAAF, A.A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.. The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS Microbiology Review.**, n. 22, p. 421-437, 1999.

PYNAERT, K.; SPRENGERS, R.; LAENEN, J. VERSTRAETE, W.; Oxygen limited nitrification and denitrification in a lab-scale rotating biological contactor. **Environmental Technology**, v. 23, p. 353-362, 2002.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R.; Advanced Swine Manure Treatment and Utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, 100, 5485-5489, 2009.

KUNZ, A.; HIGARASHI, M. M.; OLIVEIRA, P.A.; Redução da carga poluente: A questão dos nutrientes. In: Milton Antônio Segnfredo. (Org.). **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007, p. 105-118.

Capítulo 4

Mapeamento de regiões genômicas associadas a características de produção e qualidade da carcaça em aves

Mônica Corrêa Ledur

Apresentação

O desenvolvimento deste projeto envolveu a execução de dois Planos de Ação em um período de três anos: a Análise de genes candidatos para características de produção e qualidade da carcaça, coordenado pela Embrapa Suínos e Aves e o Mapeamento de QTL para características de produção e qualidade da carcaça em aves, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, da ESALQ/USP. Nestes planos de ação, utilizaram-se estratégias distintas, que se complementam, para atingir o objetivo fim do projeto, de identificar e localizar no genoma da galinha, regiões que contenham genes que influenciam características de importância para a avicultura. Essas regiões do genoma são denominadas de QTLs, do inglês, *Quantitative Trait Loci*, ou *loci* que controlam características quantitativas, que são controladas por muitos genes. A maioria das características de produção, como por exemplo, ganho de peso, produção de ovos, consumo alimentar e rendimento de peito são características controladas por muitos genes. A maioria dos genes que influenciam essas características não são conhecidos e as estratégias utilizadas neste projeto contribuem para a descoberta dos mesmos.

O primeiro plano de ação abrangeu diretamente o estudo de dois genes envolvidos no metabolismo da gordura e no crescimento, visando a caracterização desses genes, a identificação de polimorfismos (variações no genoma) e a associação de polimorfismos com características de interesse na avicultura. Além da geração de conhecimento, este PA objetivou identificar marcadores moleculares¹ nos genes estudados com potencial de uso na seleção genética, de forma a complementar os métodos convencionais de melhoramento. Esta estratégia parte de genes conhecidos com base na fisiologia para testar a associação entre polimorfismo e característica. O segundo plano de ação consistiu de uma estratégia que utiliza o genótipo de

¹ **Marcadores moleculares:** variações no genoma que podem ou não causar efeito no fenótipo e servem para diferenciar indivíduos. Dentre os marcadores moleculares mais úteis no melhoramento animal estão os SNPs (alterações de única base), os microssatélites, as inserções e as deleções.

marcadores moleculares microssatélites² posicionados ao longo do genoma e os fenótipos mensurados em um grande número de animais para identificar, por meio de análises estatísticas específicas, regiões de QTL associadas a características de interesse. A partir dessas regiões é então possível reduzir o intervalo de busca por genes de interesse.

Cada um dos Planos de Ação desenvolvidos são abordados separadamente nos capítulos a seguir. A execução deste projeto envolveu a participação de instituições vinculadas à Rede de Genômica de Aves, principalmente a ESALQ/USP, a UNESP de Botucatu, a Universidade de Passo Fundo e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). Além da contribuição para o avanço do conhecimento, este projeto também possibilitou a formação de quatro Mestres e um Doutor junto as Universidades parceiras.

² **Microssatélites:** tipo de marcador molecular constituído por uma seqüência repetida de pares de base. São altamente polimórficos e abundantes no genoma, podendo ser utilizados para distinguir indivíduos de uma mesma espécie.

Capítulo 4.1

Análise de genes candidatos para características de produção e qualidade da carcaça em aves¹

Kerli Ninov
Mônica Corrêa Ledur
Kátia Nones
Arlei Coldebella
Teresinha Marisa Bertol
Alexandre Rodrigues Caetano
Sílvia Neto Jardim Belicuas
Jane de Oliveira Peixoto
Luiz Lehmann Coutinho

¹ Este projeto recebeu apoio financeiro do PRODETAB, Embrapa e FAPESP.

Introdução

A geração de conhecimentos que contribuam para decifrar o controle genético de características de interesse econômico em aves serão imprescindíveis para uma seleção genética mais efetiva, principalmente para características cuja avaliação seja difícil ou de alto custo. Enquadram-se neste grupo características como consumo de ração, conversão alimentar e deposição de gordura corporal. A identificação de marcadores moleculares associados a essas e outras características possibilitará seu uso como complemento em programas de melhoramento genético através da seleção assistida, visando eliminar algumas limitações da seleção baseada no fenótipo. Uma das estratégias utilizadas para a identificação de marcadores genéticos é o estudo de genes candidatos, que são genes de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma determinada característica (Bryne e McMullen, 1996). Alguns exemplos bem sucedidos de identificação de *loci* que controlam características quantitativas (QTL) em espécies domésticas por meio da análise de genes candidatos já foram descritos para o gene halotano em suínos (Fujii *et al.*, 1991) e o gene da miostatina em raças bovinas, com o fenótipo de musculatura dupla (Grobet *et al.*, 1997). Em aves, alguns marcadores para características de produção já foram identificados utilizando essa metodologia, porém, estudos para validação destes resultados ainda são necessários.

O hormônio leptina vem sendo objeto de intensa investigação nos últimos anos. A leptina apresenta efeito direto em vários tecidos, inclusive o muscular. Além de desempenhar papel importante na ingestão de alimento, também atua no metabolismo de energia e na eficiência biológica dos animais. Regula o metabolismo de lipídeos e carboidratos, desempenhando papel importante na proliferação celular e no desenvolvimento embrionário (Hossner, 1998). A composição de carcaça, deposição de gordura e ingestão de nutrientes são características de grande importância na avicultura. O desenvolvimento

exagerado do tecido adiposo afeta negativamente o metabolismo corporal, a eficiência de produção, reprodução e a qualidade da carne (Taouis *et al.*, 2001). Dessa forma, fica evidente o potencial envolvimento da leptina na regulação da quantidade de gordura corporal e da qualidade da carcaça, sendo o gene da leptina (*lep*) e seu receptor (*lepR*) excelentes candidatos a serem investigados como potenciais marcadores genéticos para melhorar essas características.

Objetivos

- Detectar polimorfismos nos genes candidatos leptina e seu receptor entre uma linhagem de galinhas de corte e uma de postura da Embrapa;
- Investigar a associação dos polimorfismos identificados com características de produção e qualidade da carcaça de galinhas, visando seu emprego em programas de seleção assistida por marcadores moleculares.

Resultados e discussão

Foram estudados dois genes candidatos selecionados devido ao seu envolvimento fisiológico no metabolismo da gordura e crescimento: o gene da leptina e seu receptor. Foi realizada uma busca no GenBank (Benson *et al.*, 2007) para a identificação da sequência destes dois genes em aves, e a partir das mesmas foram elaborados iniciadores para realizar o seu sequenciamento e a identificação de polimorfismos entre as aves de corte e postura. O sequenciamento do gene da leptina não foi possível, pois após várias tentativas de amplificar partes do gene da leptina a partir de amostras de DNA e cDNA, não foram detectados os fragmentos esperados utilizando-se diferentes iniciadores. Foram realizadas buscas empregando a sequência de nucleotídeos do gene da leptina da galinha (AF012727) obtida no

GenBank no genoma de *Gallus gallus* utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; identificação da solicitação JR9BTN5E012), porém não foi detectada similaridade entre ambas. Esses resultados indicam que a sequência do gene da leptina depositada no GenBank possivelmente não seja parte da sequência do gene da leptina de galinhas (Ninov *et al.*, 2008a). Já, para o gene receptor da leptina foram realizados o sequenciamento, análises das sequências e identificação de polimorfismos de base única (SNP) de dois fragmentos (Ninov *et al.*, 2005 e Ninov *et al.*, 2006), bem como a genotipagem de dois SNPs (352C>T e 915G>A das sequências do GenBank AF222783 e AY348717, respectivamente) desse gene nos animais da população F₂ da Embrapa. As análises de associação destes SNPs com características de interesse econômico evidenciaram associação significativa com várias características de desempenho e carcaça. O gene do receptor da leptina foi também localizado no mapa de ligação do cromossomo da população F₂ da Embrapa e seus SNPs serão utilizados como marcadores na varredura genômica com microssatélites.

Verificou-se, por meio da análise de associação, que o rendimento de carcaça foi influenciado pelo genótipo do SNP 352C>T do receptor da leptina apenas nos machos, com um efeito aditivo de 0,58% a cada alelo T adicionado ao genótipo (Figura 1a). Da mesma maneira, o rendimento de peito foi influenciado pelo genótipo desse SNP nos machos, associados a um efeito aditivo de 0,45% a cada alelo T adicionado ao genótipo (Figura 1b). Os machos com alelo T também apresentaram mais gramas de proteína bruta e cinza na carcaça quando comparados a machos com o alelo C. O alelo T provém da linhagem de corte enquanto que o alelo C provém da linhagem de postura. Com base nesses resultados pode-se inferir que o alelo T está ligado a um efeito específico no crescimento do tecido muscular de machos, com aumento no peso do peito que resulta em maior rendimento de carcaça.

Animais com o alelo C tiveram rendimento de fígado maior do que animais com o alelo T (Ninov *et al.*, 2008b). O rendimento de coxas e sobrecoxas foi influenciado pelo genótipo do SNP 915G > A. Animais com o genótipo homozigoto GG e AA apresentaram rendimento de coxas e sobrecoxas semelhantes, porém superior em relação ao genótipo GA. Quando em heterozigose a combinação destes alelos foi associada a um rendimento de coxas e sobrecoxas inferior aos homozigotos. O alelo A provém da linhagem de postura e o alelo G da linhagem de corte. O alelo A foi associado ao maior consumo de ração, o alelo G ao maior rendimento de pulmão. Por ocorrerem em região de íntron, provavelmente esses SNPs não estão envolvidos diretamente com as características associadas, mas podem estar ligados a outra mutação localizada na região regulatória do gene do receptor da leptina ou próximo a ele (Ninov, 2007).

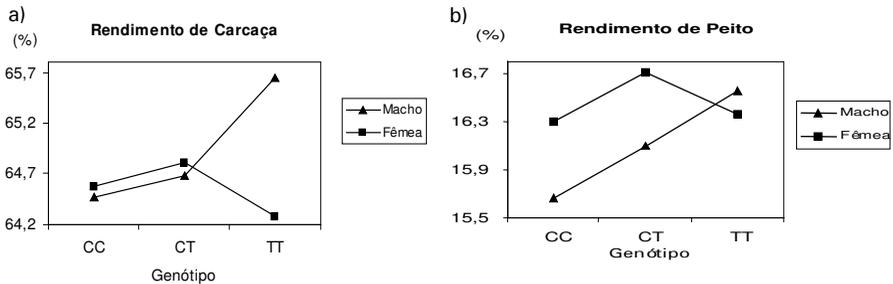


Figura 1. a) Médias estimadas para rendimento de carcaça e (b) rendimento de peito para o SNP 352C>T do gene receptor da leptina.

Tecnologias geradas

Produto pré-tecnológico

Marcador genético potencial para melhoria de rendimento de partes da carcaça de galinhas

Polimorfismos de base única (SNP) no gene do receptor da leptina foram associados com características de rendimento de carcaça, de

peito e de coxa em galinhas da população F2 da Embrapa. Estes são marcadores genéticos potenciais, que deverão ser validados em linha pura antes de seu uso em programas de melhoramento genético, principalmente para rendimento de cortes nobres como peito e coxa (Ninov *et al.*, 2008b).

Público alvo: programas de melhoramento genético de aves nacionais e internacionais.

Considerações finais

Marcadores genéticos potenciais no gene receptor da leptina foram identificados para características de grande relevância na avicultura. A validação desses resultados está sendo conduzida visando seu uso na seleção genética. Nossos estudos indicaram que a sequência do gene da leptina depositada no GenBank possivelmente não represente a sequência do gene da leptina de galinhas.

Referências

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. *Nucleic Acids Res.* Jan;36 (Database issue):D25-30. GenBank, 2008.

BRYNE, P.F.; MCMULLEN, M.D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. *Probe*, v. 7, p. 24-27, 1996.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.L. O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253: 448-451, 1991.

GROBET, L.; MARTIN, L. J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.. GEORGES, M. deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*, v. 17, p. 71-74, 1997.

HOSSNER, K.L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: potential application in animal production. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 78, p. 463-72, 1998.

NINOV, K.; LEDUR, M. C.; BERTOL, T. M.; COUTINHO, L. L. Investigação de polimorfismos no gene receptor da leptina entre duas linhagens de aves (*Gallus gallus*). In: Congresso Brasileiro de Genética, 51., 2005, Aguas de Lindóia. Resumos. Aguas de Lindóia: SBG, 2005.

NINOV, K.; LEDUR, M. C.; NONES, K.; CAETANO, A. R.; COLDEBELLA, A.; BERTOL, T. M.; COUTINHO, L. L. Mining of polymorphisms in the leptin receptor gene in two chicken lines and their association with performance and carcass traits. In: International Conference on Animal Genetics, ISAG, 30, Section C, Porto Seguro, BA, 2006.

NINOV, K. 2007. Identificação de polimorfismos no gene da leptina e de seu receptor em duas linhagens de aves e associação com características de desempenho e carcaça. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP. 91p.

NINOV, K.; LEDUR, M. C.; ALVES, H. J.; ROSÁRIO, M. F.; NONES, K.; COUTINHO, L. L. Investigation of leptin gene in broiler and layer chicken lines. *Scientiae Agrícola*, v.65, n.2, p.214-219, 2008a.

NINOV, K.; LEDUR, M. C.; NONES, K.; COLDEBELLA, A.; BERTOL, T. M.; CAETANO, A. R.; COUTINHO, L. L. Polimorfismo de base única (SNP) no gene do receptor da leptina associado com características de rendimento e composição de carcaça de galinhas. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 7., 2008, São Carlos, SP. Anais... São Carlos: SBMA, 2008b.

TOUIS M.; DRIDI, S.; CASSY, S.; BENOMAR, Y.; RAVER, N.; RIDEAU, N., PICARD, M.; WILLIAMS, J.; GERTLER, A. Chicken leptin: properties and actions. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 21, p. 319–327, 2001.

Capítulo 4.2

Mapeamento de QTL para características de produção e qualidade da carcaça em aves¹

Kátia Nones
Mônica Corrêa Ledur
Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura
Clarissa Boschiero
Luís Fernando Batista Pinto
Débora Clea Ruy
Erica Elias Baron
Raquel de Lello Rocha Campos
Marcel Ambo
Eraldo Lourenso Zanella
Luiz Lehmann Coutinho

¹ Este projeto recebeu apoio financeiro do PRODETAB, Embrapa, FAPESP e CNPq.

Introdução

Um grande esforço da pesquisa genômica em várias espécies tem sido a identificação e o mapeamento de *loci* que controlam características quantitativas (QTLs). Estas informações são extremamente valiosas por facilitar a identificação de genes responsáveis por características poligênicas. Uma vez identificados, os genes ou marcadores de interesse poderão ser utilizados como complemento dos métodos de seleção genética convencional, para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento, através da seleção assistida por marcadores (MAS). O conhecimento dos genes que influenciam as características econômicas, bem como suas funções, possibilitará também a busca por novos direcionamentos para melhorar o desempenho e a qualidade do produto final (Ledur *et al.*, 2003).

Um dos procedimentos utilizados para identificar e mapear QTLs é a varredura genômica utilizando-se marcadores microssatélites (Anderson *et al.*, 1994). A Embrapa Suínos e Aves, em conjunto com a ESALQ/USP, iniciaram estudos em genômica de aves no Brasil em 1999 com o objetivo de mapear novos QTLs e confirmar algumas regiões já associadas a características de produção em outras populações. Para isso foi desenvolvida uma população F2, específica para estudos genômicos, a partir do cruzamento entre linhagens divergentes de corte e postura, que estão sendo utilizadas para identificar marcadores associados a características de crescimento, consumo de ração e composição de carcaça, nas condições brasileiras de clima e manejo (Ledur *et al.*, 2000 a, b; Zanella *et al.*, 2000). Resultados gerados nesta linha de pesquisa vem sendo disponibilizados na página da Rede de Genômica de Aves da Embrapa Suínos e Aves, no endereço: <http://www.cnpsa.embrapa.br/genomafrango/genomafrango.html>. Pesquisas ainda são necessárias antes que essas informações possam ser utilizadas pelo setor produtivo. Contudo, os resultados potenciais deste projeto poderão ter impacto na redução da dependência tecnológica e no avanço do conhecimento técnico-

científico nacional, sendo estratégicos para o aumento da competitividade do agronegócio brasileiro.

Objetivos

Este projeto visou inicialmente à identificação e o mapeamento de QTLs para características de desempenho e qualidade da carcaça nos cromossomos 6, 7, 8 e 13 da galinha doméstica. Com a inclusão de novas parcerias e respectiva captação de recursos, foi possível expandir as análises para os cromossomos da galinha ainda não analisados pela equipe. As regiões de QTL identificadas no genoma da galinha servirão de base para a descoberta e localização de genes envolvidos no controle de características complexas, como as de interesse econômico na avicultura.

Resultados e discussão

A população de aves F2 da Embrapa foi utilizada para mapear QTLs que controlam várias características de interesse econômico para a avicultura. Para tal, cerca de 570 aves F2 foram genotipadas com 128 marcadores moleculares distribuídos ao longo de 22 cromossomos da galinha, cobrindo 2630 cM, o que representa aproximadamente 63% do genoma. Os mapas de ligação dos 22 cromossomos foram construídos e as análises estatísticas para o mapeamento de QTL por intervalo foram realizadas pelo método de regressão aplicados aos modelos genéticos de F2 e de meio-irmãos. Foram também estimados os efeitos dos QTLs identificados nas características avaliadas. Os principais resultados obtidos até o momento foram a identificação e o mapeamento de QTLs em vários cromossomos da galinha para características de desempenho, carcaça, peso de órgãos e também as associadas ao metabolismo e deposição de gordura (Nones *et al.*, 2006; Ambo *et al.*, 2009 e Campos *et al.*, 2009).

Vários QTLs foram mapeados para peso ao nascer, peso aos 35 e aos 42 dias de idade. QTLs inéditos que controlam o comprimento do intestino independente do peso corporal foram também identificados. Essas regiões de QTL contêm genes que atuam no controle dessas características e foram identificados genes possivelmente responsáveis pela variação das mesmas nos cromossomos 2, 7, 10 e 27. Além disso, um número limitado de QTLs posicionados em diferentes cromossomos, com efeitos aditivos, explicam uma proporção substancial da diferença em peso corporal entre as linhagens de corte e de postura utilizadas neste estudo. Esses resultados evidenciam diferentes regiões de QTL influenciando o crescimento; algumas agindo do nascimento até as 6 semanas de idade, enquanto outras regiões do genoma estão envolvidas em fases específicas do crescimento da galinha (Ambo *et al.*, 2009).

Foi identificado um QTL no cromossomo (GGA) 7 influenciando cinco caracteres relacionados com crescimento e consumo de ração. Outros QTLs foram mapeados nos GGAs 6 e 11, associados com o peso dos pés; nos GGAs 8 e 11, associados com o peso da moela; e no GGA13, associado com o peso do coração. O QTL para peso do coração explicou 4,34% da variação fenotípica para esta característica. Este resultado pode ser de grande interesse para a avicultura, considerando que a capacidade cardio-respiratória dos frangos está relacionada com problemas metabólicos, como ascite e morte súbita, em frangos de corte (Moura *et al.*, 2006).

QTLs também foram mapeados para o rendimento de carcaça e de cortes nobres. Destacam-se, por sua importância econômica, os QTLs para rendimento de peito e de coxas e sobrecoxas. Esses resultados contribuem para a identificação de genes envolvidos no rendimento das diferentes partes da carcaça de aves, possibilitando uma seleção genética diferenciada para o melhoramento das partes da carcaça de maior valorização. QTLs inéditos também foram mapeados para porcentagem (em relação ao peso vivo) de moela, pulmões, coração e

figado no genoma da galinha. Além de possibilitar o melhor entendimento da arquitetura genética envolvida no desenvolvimento desses órgãos em relação ao peso vivo, esses resultados indicam regiões do genoma cujos genes apresentam grande efeito na variação dessas características. Marcadores ou genes identificados nessas regiões poderão ser utilizados na seleção genética para crescimento balanceado entre coração, pulmão e peso corporal, por exemplo, visando reduzir a ocorrência de ascite e morte súbita.

A deposição de gordura tem impacto negativo sobre a eficiência alimentar e o rendimento de carcaça em frangos e pode causar dificuldades no processamento da carne destes e rejeição pelo consumidor. A deposição de gordura é altamente herdável e apresenta correlações genética e fenotípica positivas com o peso corporal, sendo um problema para o melhoramento de frangos de corte, visto que a seleção para aumento da taxa de crescimento também aumenta a deposição de gordura. Estratégias de seleção para reduzir a deposição de gordura baseadas no fenótipo são complexas e de alto custo. A identificação de marcadores ligados a regiões do genoma que regulam a deposição de gordura permite o uso destes na seleção assistida para reduzir a gordura corporal, sem influenciar outras características de carcaça e proporcionando um melhoramento genético mais rápido. Neste projeto, foram mapeados cinco QTLs para peso da gordura abdominal nos cromossomos (GGAs) 2, 3 e 27, seis QTLs para porcentagem de gordura abdominal nos GGAs 3, 10, 12 e 27 e quatro QTLs para níveis de triglicerídeos no plasma nos GGAs 5, 23 e 27. Há uma região do cromossomo 5, entre 20 e 30 cM, que pode conter um ou mais genes envolvidos no metabolismo da gordura, sendo o *IGF2* e o *NR1H3* possíveis genes candidatos localizados nessa região (Campos *et al.*, 2009). Na Figura 1 está apresentada a comparação entre as regiões de QTL relacionadas a características de deposição de gordura mapeadas neste projeto e os QTLs mapeados para essas características em outros estudos, publicados no QTLdb (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>).

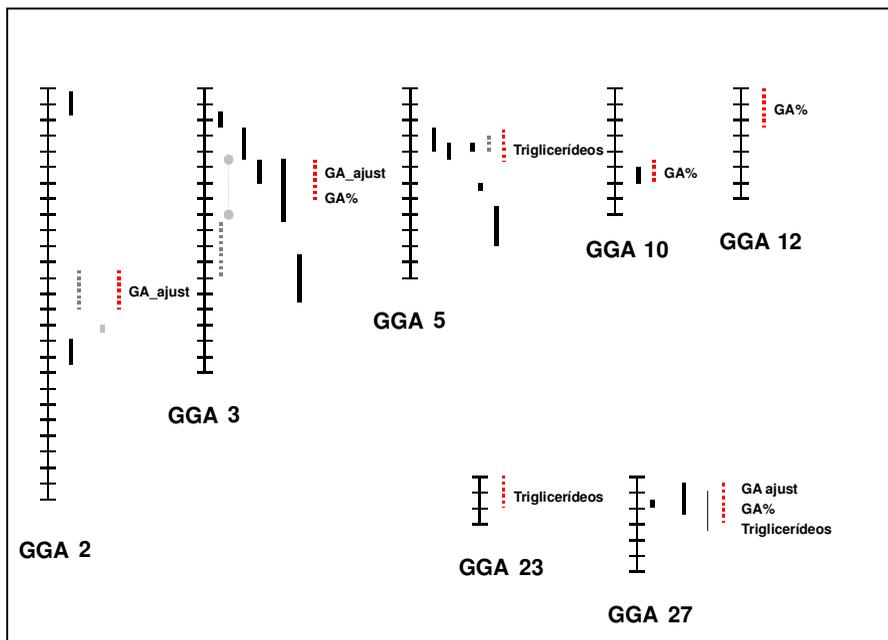


Figura 1. Comparação de QTLs mapeados pela equipe com QTLs para características relacionadas com gordura corporal mapeados por outras equipes relatados no banco de dados QTLdb (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>). QTLs para gordura abdominal - GA (—), gordura da pele (.....), triglicerídeos (——), gordura intramuscular (——), colesterol (●—●) e QTLs mapeados pela equipe do projeto (Campos *et al.*, 2009;).

Além disso, foram evidenciadas interações entre QTL e sexo associadas a características de desempenho e carcaça na população de aves F2 da Embrapa. Os QTLs encontrados no GGA1 para pesos da cabeça, pés e coração, ganho de peso e conversão alimentar; no GGA11 para peso de asas, e no GGA3 para consumo de ração não apresentaram efeitos significativos em fêmeas, sendo sexo-específicos para machos. Os QTLs para peso corporal aos 35 e 42 dias de idade, mapeados no GGA2, apresentaram efeitos maiores em machos do que em fêmeas. Assim, espera-se uma menor resposta à seleção em fêmeas do que em machos, se estes QTLs forem utilizados em programas de seleção (Pinto *et al.*, 2006). Foram também evidenciadas interações epistáticas entre QTLs para peso aos 42 dias de idade indicando que para a aplicação em seleção assistida por marcadores não basta selecionar as

aves apenas pela informação de um determinado QTL, pois os efeitos aditivos dependem das combinações genotípicas de vários QTLs (Pinto *et al.*, 2007).

Considerações finais

Em conjunto, os resultados obtidos contribuem para a melhor compreensão da arquitetura genética relacionada as diferentes características em que QTLs foram identificados, permitindo a busca por novos direcionamentos para melhorar o desempenho e a qualidade da carcaça de frangos de corte, por meio da seleção assistida por marcadores. Os resultados obtidos apresentam impactos potenciais na melhoria da eficiência de produção, melhoria de qualidade do produto para o consumidor, redução de resíduos de abatedouro e redução de custo para o produtor e consumidor.

Tecnologias geradas

Práticas/processos

Identificação de regiões genômicas nos cromossomos 6, 7, 8, 11 e 13 da galinha doméstica associadas com características de desempenho, carcaça e peso de órgãos

Foi encontrado um QTL no cromossomo (GGA) 7 afetando cinco caracteres relacionados com crescimento e consumo de ração. Outros QTLs foram mapeados nos GGAs 6 e 11, associados com o peso dos pés; nos GGAs 8 e 11, associados com o peso da moela, e no GGA13, associado com o peso do coração. Essas regiões de QTL contêm genes que atuam no controle dessas características, sendo este o primeiro passo para a identificação de genes candidatos. O QTL para peso do coração explicou 4,34% da variação fenotípica para esta característica. Este resultado pode ser de grande interesse para a avicultura, considerando que a capacidade cardio-respiratória está relacionada com

problemas metabólicos, como ascite e morte súbita, em frangos de corte. Os QTLs mapeados para ganho de peso, consumo de ração e peso do coração devem ser melhor investigados, pois são regiões que contêm genes que afetam características de grande relevância econômica para a avicultura (Moura *et al.*, 2006).

Interações entre QTL e sexo associadas a características de desempenho e carcaça na população de aves F2 da Embrapa

Foram utilizados modelos com e sem interação entre QTL e sexo para mapear QTLs associados a características de desempenho e carcaça nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11 e 13 de aves. Verificou-se que não necessariamente há um aumento do poder do teste com a inclusão da interação QTL x sexo no modelo. Se o efeito aditivo do QTL for semelhante em magnitude e sinal, entre machos e fêmeas, o excesso de parâmetros do modelo reduz o poder do teste, o que reforça a importância em se testar este tipo de interação. Os QTLs encontrados no GGA1 para pesos da cabeça, pés e coração, ganho de peso e conversão alimentar; no GGA11 para peso de asas, e no GGA3 para consumo de ração não apresentaram efeitos significativos em fêmeas, sendo sexo-específicos para machos. Os QTLs para peso corporal aos 35 e 42 dias de idade, mapeados no GGA2, apresentaram efeitos maiores em machos do que em fêmeas. Assim, espera-se menor resposta a seleção em fêmeas do que em machos, se estes QTLs forem utilizados em programas de seleção genética (Pinto *et al.*, 2006).

Mapas genéticos de ligação dos cromossomos 6, 7, 8, 11 e 13 da população experimental de aves F2 da Embrapa

Com base na população F2 da Embrapa para estudos genômicos foram construídos os mapas de ligação dos cromossomos 6 a 8, 11 e 13 da galinha. Foram testados 51 marcadores microssatélites, dos quais 28 foram informativos. Um SNP identificado pelo nosso grupo, localizado

no gene do receptor da *leptina*, foi incluído no mapa do cromossomo 8. As 10 aves da geração inicial, os 8 F1s e um total de 459 aves F2 de cinco famílias de irmãos completos foram genotipados com estes marcadores. O número de meioses informativas totais por loco variou de 232 a 862 e o de meioses informativas de fase conhecida de 0 a 764. A ordem dos marcadores nos cromossomos coincidiu com a do mapa consenso da galinha, com exceção dos marcadores ADL0147 e MCW0213 do cromossomo 13 que tiveram sua ordem invertida. O número reduzido de meioses informativas de fase conhecida para o marcador ADL0147 (150) pode ser apontado como uma possível causa para a inversão, além da relativa proximidade entre os dois marcadores envolvidos na inversão (10,5 cM). Foi possível a construção de mapas de ligação confiáveis, que podem ser utilizados pela comunidade científica para mapeamento de QTLs ou auxílio na localização de genes em aves, juntamente com os demais disponíveis na literatura (Ambo *et al.*, 2008).

Mapeamento de QTLs para características de desempenho no genoma da galinha

QTLs inéditos que controlam o comprimento do intestino independente do peso corporal foram descritos neste estudo. Verificou-se um número limitado de QTLs posicionados em diferentes cromossomos, com efeito aditivo, que explicam uma proporção substancial da diferença em peso corporal entre as linhagens de corte e postura utilizadas neste estudo. Esses resultados evidenciam diferentes regiões de QTL afetando o crescimento. Algumas parecem agir do nascimento até as 6 semanas de idade, enquanto outras regiões genômicas estão envolvidas em fases iniciais ou tardias do crescimento da galinha (Ambo *et al.*, 2009).

Mapeamento de QTLs no genoma da galinha associados a deposição de gordura

QTLs para peso e percentagem de gordura abdominal foram mapeados no genoma da galinha, bem como QTLs inéditos para níveis de triglicérides no plasma. Efeito de imprinting (gamético) foi detectado em alguns QTLs para % de gordura abdominal, o que deve ser melhor investigado devido as conseqüências deste efeito na seleção. Esses resultados contribuem para a melhor compreensão da arquitetura genética relacionada ao metabolismo e deposição de gordura, permitindo a busca por novos direcionamentos para melhorar o desempenho e a qualidade do produto final, por meio da seleção assistida por marcadores (Campos *et al.*, 2009).

Efeito epistático de QTLs para peso vivo em frangos

demonstrou-se que existem importantes interações entre QTLs para peso vivo aos 42 dias de idade nos cromossomos GGA1, GGA3 e GGA5, as quais foram identificadas somente com o modelo de busca simultânea de dois QTLs, o qual permitiu mapear cinco QTLs a mais que a análise unidimensional. Em termos de aplicação em seleção assistida por marcadores, fica claro que não basta selecionar animais apenas pela informação de um determinado QTL, pois os efeitos aditivos dependem das combinações genótípicas de vários QTLs. Os efeitos encontrados demonstram que as interações epistáticas integram um mecanismo importante para geração de variação nas linhagens estudadas. Assim, mecanismos como estes são importantes para o desenvolvimento das aves e precisam ser investigados com mais freqüência (Pinto *et al.*, 2007).

Referências

AMBO, M.; CAMPOS, R. L. R.; MOURA, A. S. M. T.; BOSCHIERO, C.; ROSARIO, M. F.; LEDUR, M. C.; NONES, K.; COUTINHO, L. L. Genetic linkage maps of chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13 from a Brazilian resource population. *Scientia Agrícola*, v.65, n.5, p.447-452, 2008.

AMBO M.; MOURA A.S.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.; BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K.; CAMPOS, R.L.; BOSCHIERO, C.; BURT DW.; COUTINHO, L.L.; Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. *Animal Genetics*, 40(2):200-208, 2009.

ANDERSON, L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H.; KNOTT, S.A.; JOHANSSON, M.; ANDERSON, K.; ANDERSON-EKLUND, L.; EDFORS-LILJA, I.; FREDHOLM, M.; HANSSON, I. HAKANSSON, J.; LUNDSTROM, K. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, 263:1771-1774.

CAMPOS R.L.; NONES K, LEDUR M.C.; MOURA A.S.; PINTO L.F.; AMBO M.; BOSCHIERO C.; RUY D.C.; BARON E.E.; NINOV K.; ALTENHOFEN C.A.; SILVA R.A.; ROSÁRIO M.F.; BURT D.W.; COUTINHO L.L. Quantitative trait loci associated with fatness in a broiler-layer cross. *Animal Genetics*, 40:729–736, 2009.

LEDUR, M. C.; BERTANI, G. R.; NONES, K. Genômica nos programas de melhoramento genético avícola. APINCO 2003, Conferência de Ciência e Tecnologia Avícola, Anais... 7 a 9 de Maio de 2003. Campinas, SP, 2003. p. 87-105.

LEDUR, M. C.; ZANELLA, E. L.; SCHMIDT, G. S.; JAENISCH, F. R. F.; SAATKAMP, M.G.; BASSI, L.J.; COUTINHO, L. L. Peso e características de carcaça em linhagens utilizadas no desenvolvimento de populações referência para detecção de QTL em aves. In: APINCO 2000, Conferência de Ciência e Tecnologia Avícola, Anais... Campinas: FACTA, p.73, 2000 a.

LEDUR, M. C.; ZANELLA, E. L.; SCHMIDT, G. S.; JAENISCH, F. R. F.; SILVA, V. S.; VENTURA, L.; COUTINHO, L. L. Divergence of strains and strain crosses used to develop new reference populations for QTL studies in poultry. In: WORLD ´S POULTRY CONGRESS, 21., 2000 b, Montreal, Canadá. [Abstracts...] Montreal: 1CDROM.

MOURA, A.S.A.M.T.; BOSCHIERO, C.; CAMPOS, R. L.R.; AMBO, M.; NONES, K.; LEDUR, M.C.; ROSARIO, M.F.; MELO, C.M.R.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L., 2006. Mapping QTL for performance and carcass traits in chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13. In: 8th WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION (WCGALP), 2006, Belo Horizonte, MG, Brazil, Aug. 13-18. Proc. of the 8th WCGALP, CD Rom, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2006.

NONES K., LEDUR M.C., RUY D.C., BARON E.E., MELO C.M.R., MOURA A.S.A.M.T., ZANELLA E.L., BURT D.W. & COUTINHO L.L. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. *Animal Genetics*, 37:95-100, 2006.

PINTO, L. F. P.; PACKER, I. U.; LEDUR, M. C.; NONES, K.; ENCISO-PÉREZ, M.; COUTINHO, L. L. Efeito epistático de QTLs para peso vivo em frangos. In: Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 44, Jabotical, SP. Anais... Jaboticabal: SBZ, 2007. 1 CD-ROM.

PINTO, L.F.B.; PACKER, I.U.; LEDUR, M.C.; CAMPOS, R.L.R.; MOURA, A.S.A.M.T.; AMBO, M.; BOSCHIERO, C.; NONES, K.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; PÉREZ-ENCISO, M.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci by sex interactions for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. In: XII Reunión Nacional de Mejora Genética Animal, 28 a 30 de junio de 2006, Gijón, Asturias, Espanha, 8 p., CD-ROM.

ZANELLA, E. L.; LEDUR, M. C.; SCHMIDT, G. S.; JAENISCH, F. R. F.; COUTINHO, L. L., 2000. Development of a new reference population for QTL detection in poultry. *Poultry Science*, Annual Meeting Abstracts, Poultry Science Association, 89th Annual Meeting, Aug. 18-20, Montreal, Canada, 2000, vol. 79, Supplement 1, p. 61, abstract 263.

Capítulo 5

Coccidiose: caracterização fenotípica e molecular de linhagens de aves com vistas a estudar os mecanismos de resistência genética e desenvolver linhagens resistentes

Giovani Rota Bertani
Carlos Alberto Fagonde Costa
Jorge Vitor Ludke
Liana Brentano
Elsio Antonio Pereira de Figueiredo
Iara Maria Trevisol
Paulo Augusto Esteves
Waldomiro Barioni Júnior
Laura Helena Vega Gonzales Gil
Erik Amazonas de Almeida
Russolina Benedeta Zingali
Mônica Corrêa Ledur
Douglas Bayer Vieira
Francisco Emanuel Alves Gonçalves
Jakeline França Azevedo

Introdução

A coccidiose é a doença mais freqüente na avicultura industrial mundial, no entanto, é difícil chegar a estimativas reais das perdas causadas por essa doença (Williams, 1999). São reconhecidas sete espécies de *Eimeria* que parasitam a galinha doméstica e que são os agentes patogênicos da coccidiose. São elas: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox* e *Eimeria tenella* (Schnitzler & Shirley, 1999; Mattiolo *et al.*, 2000). É extremamente raro existir lotes de aves que não estejam infectados por, no mínimo, uma dessas espécies de *Eimeria*. A coccidiose apresenta-se em duas formas: clínica e subclínica. A primeira caracteriza-se por apresentar alta taxa de mortalidade e atualmente não é comum na avicultura industrial. A segunda mostra-se como sendo a forma mais comum na avicultura industrial, pois pelo menos uma das sete espécies de *Eimeria* está presente com intensidade variável, o que provoca redução no ganho de peso e comprometimento na conversão alimentar.

Entre os aspectos negativos causados pela coccidiose encontram-se as perdas associadas aos custos de anticoccidianos e as vacinas utilizadas na sua prevenção em frangos de corte, matrizes e poedeiras. As perdas anuais da avicultura mundial em consequência da coccidiose podem chegar a valores de US\$ 55 milhões (Williams, 1999).

As dificuldades no controle da coccidiose sempre estiveram presentes no sistema de produção avícola. O controle da coccidiose em frangos de corte, desde o desenvolvimento da avicultura industrial, é baseado no uso preventivo de drogas anticoccidianas na ração (Braunius, 1986; Vertommen, 1994). Por algum tempo pareceu que esta seria uma solução definitiva, mas o surgimento de resistência nas populações de *Eimeria* aos anticoccidianos logo mostrou a necessidade de se desenvolver novas alternativas (Jeffers, 1989). Pode-se dizer que, as alternativas estudadas foram, durante muito tempo, o desenvolvimento

de novas drogas e de estratégias como os programas duais de controle anticoccidiano. Mais recentemente, com os altos custos para o desenvolvimento de novas drogas e, com as restrições aparentemente crescentes quanto aos riscos que os anticoccidianos representam na cadeia alimentar, tem havido um esforço considerável no desenvolvimento de opções que racionalizem o seu uso ou torne a avicultura independente desses produtos.

As vacinas para coccidiose são pesquisadas desde 1952 (Williams, 2002a), e desde então muitos aspectos de seu uso têm sido avaliados. Entre os aspectos encontram-se os métodos de vacinação, as variações imunogenéticas dos agentes patogênicos e a utilização combinada de quimioterápicos (Williams *et al.*, 2000; Williams, 2002b). No entanto, o controle eficaz através da vacinação é limitado devido ao grande número de cepas de *Eimeria* existentes e o uso de quimioterápicos é limitado pelo desenvolvimento de parasitas resistentes. Dessa maneira, busca-se novas alternativas para o controle da coccidiose. Para tanto, uma opção seria a utilização do potencial genético dos animais em relação à resistência de doenças, uma vez que, esta característica é controlada por genes (Zhu *et al.*, 2003a).

Atualmente, o uso do potencial genético no controle da coccidiose encontra-se em fase inicial. Em vista disso, o presente projeto pretende contribuir para os esforços da comunidade científica no que tange ao controle da coccidiose através da exploração do potencial genético das aves. A exploração da seleção para utilização de aves resistentes à coccidiose possibilitaria a inclusão da resistência genética à parasitose como forma alternativa que possibilitasse a reduzir as perdas econômicas e o uso de coccidiostáticos.

O projeto desenvolvido abordou o estudo da expressão de genes envolvidos na imunidade inata como forma de compreender aspectos relevantes da seleção genética para características produtivas em aves (produção de ovos ou produção de carne) e seu efeito sobre resistência

a doenças. Como modelo usamos a infecção por *Eimeria tenella*, um dos agentes etiológicos da coccidiose. No âmbito desta proposta, linhagens previamente desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves foram caracterizadas quanto à susceptibilidade à infecção por *E. tenella*. Posteriormente, abordagens de genômica funcional e proteômica foram introduzidas no estudo. O presente estudo teve como objetivo caracterizar linhagens genéticas de aves desenvolvidas baseando-se na teoria da genética quantitativa quanto suas características fenotípicas e quando ao perfil de moléculas (RNA mensageiro e proteína) após a infecção por *Eimeria tenella*.

Material e métodos

Três linhagens de aves desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, foram utilizadas. Essas linhagens apresentam características fenotípicas divergentes, pois foram selecionadas, no caso da TT (TT; selecionada por 12 gerações) e CC (selecionada por 10 gerações), para características que apresentam correlação genética negativa (seleção para produção de ovos versus seleção para produção de carne, por exemplo). Em outras palavras, a seleção para produção de carne nas aves TT, resulta em aves com alta produção de carne, porém com baixa fertilidade, ou seja, baixa produção de ovos, justamente devido a essas duas características apresentarem correlação genética negativa.

Por outro lado, as aves selecionadas para a produção de ovos, são aves pequenas e com maior taxa de ovulação. A terceira linhagem utilizada, CCc (selecionada por 10 gerações), é uma linhagem controle da CC. Essa linhagem tem a mesma origem das aves CC, porém não foi selecionada para produção de ovos e sim os cruzamentos foram feitos ao acaso. Resumindo, temos duas linhagens com fenótipos divergentes que possivelmente diferem ao nível de DNA devido às diferentes origens, por não serem formadas a partir da mesma população base e

também devido a seleção genética para duas características de correlação genética negativa. No caso das diferenças em nível de DNA entre CC e CCc, a principal diferença, possivelmente, seja devido à seleção genética utilizando-se métodos quantitativos.

A metodologia empregada utilizando estas linhagens especiais é a base para a identificação de moléculas associadas a características de resistência à coccidiose.

A caracterização fenotípica das linhagens foi feita através da inoculação via oral de 30.000 oocistos de *Eimeria tenella* e parâmetros fenotípicos de resistência a infecção foram colhidos como taxa de mortalidade, número de oocistos fecais, peso do baço, ganho de peso e conversão alimentar. O baço foi colhido para a realização e estudos de genômica funcional (expressão de RNAm) e de proteômica. O estudo de genômica funcional utiliza microarranjos do sistema imune de galinha que possibilita o estudo simultâneo de 13.000 genes associado ao estudo de genes específicos utilizando-se reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Os estudos de proteômica envolveram eletroforese em gel de duas dimensões e MALDI-TOF-MS/MS.

Resultados e discussão

O estudo aqui relatado integrou abordagem clássica de genética quantitativa através da caracterização fenotípica de diferentes linhagens genéticas de aves associada a utilização de tecnologias avançadas para identificar moléculas de RNA mensageiro e proteínas associadas a infecção por *Eimeria tenella* de uma abordagem de pesquisa no dia do nascimento, grupos de pintinhos foram alocados em gaiolas. No sétimo dia, estes foram inoculados com 30.000 oocistos de *E. tenella* e grupos controles foram mantidos. A taxa de mortalidade foi avaliada antes e depois da inoculação tanto nos grupos inoculados como nos grupos controle. Os oocistos fecais foram contados em cada uma das gaiolas

(5 a 9 dias pós infecção). Entre os dias 7 e 25 de idade, a taxa de mortalidade após infecção diferiu (letras diferentes, $P < 0.05$) conforme a seguir: TT = 35,0%^a (35/100; ou seja de um total de 100 da linhagem TT, 35 morreram), CCc = 25,0%^{ab} (24/100) and CC = 18,7%^b (18/101). Sete dias após a infecção, ou seja, aos 14 dias de idade, várias outras características foram avaliadas, incluindo: consumo de ração (CR), peso corporal aos 14 dias de idade (PC14), ganho de peso ponderado (GPP), ganho de peso ponderado médio (GPPM), consumo médio de ração (CMR), conversão alimentar ponderada (CAP). Nas aves infectadas os resultados de GPPM, incluindo a média dos quadrados mínimos e erro padrão foram: TT = 131,97g \pm 6,41^a, CCc = 24,08g \pm 3,42^b e CC = 22,68g \pm 3,44^b ($P < 0,01$). Nas aves controles, não inoculadas, os resultados para GPPM foram: TT = 274,7g \pm 8,45^a, CCc = 63,19g \pm 3,42^b e CC = 61,83g \pm 3,85^b ($P < 0,01$). Em relação à CAP, nas aves infectadas, os resultados foram: TT = 1,90 \pm 0,26^b, CCc = 3,49 \pm 0,33^a, CC = 3,93 \pm 0,33^a ($P < 0,1$). Nas aves não infectadas, os resultados foram: TT = 1,27 \pm 0,33^b, CCc = 1,81 \pm 0,39,42^a e CC = 1,96 \pm 0,37^a ($P < 0,1$). O nível de infecção usado no presente estudo diminuiu significativamente o desempenho de produção reduzindo vários parâmetros produtivos, tais como: CR, PC14, GPP, GPPM e CMR. A linha genética com maior taxa de mortalidade (TT) apresentou o melhor desempenho produtivo em relação a GPPM e CAP, quando comparada com CC (linhagem genética mais susceptível a mortalidade). Foram identificadas diferenças significativas em relação a taxa de mortalidade e ganho de peso pós infecção entre duas linhagens, as quais são materiais genéticos valiosos no estudo dos mecanismos genéticos da resistência genética contra esta parasitose de importância econômica que afeta a avicultura.

Em relação ao número de oocistos liberados nas fezes de aves infectadas, observou-se que a linhagem com maior taxa de mortalidade TT, a liberação total de oocistos foi maior em relação as outras duas linhagens. A linha controle (CCc) apresentou uma taxa de mortalidade

intermediária, sem diferença significativa ($P > 0.05$) entre TT ou CC. Na linhagem TT os parasitas estão se multiplicando e liberando sua progênie com muito maior eficiência em relação as outras linhas, sendo mais evidente nos dias cinco e seis após a infecção. Isso pode estar refletindo uma menor capacidade imunoprotetora nas aves da linhagem de corte TT. A expressão de treze mil genes do sistema imune foi estudada através da genômica funcional. Destaca-se aqui a expressão de NK-lisina no baço, sendo naturalmente expressa em maior quantidade na linhagem que apresenta menor taxa de mortalidade devido a infecção (CC). Na linhagem de maior mortalidade (TT), ocorre um grande aumento nos níveis de expressão de NK-lisina dois dias após a infecção. Isso pode refletir a ineficácia de combate ao processo de instalação dessa parasitose. O mesmo padrão de expressão observado n NK-lisina na linhagem de corte TT (mais susceptível) foi observado também para o gene de IL-18. As aves da linhagem TT são geneticamente menos propensas a impedir a infecção por *E. tenella*. Esses resultados são interessantes devido ao fato de NK-lisina e IL-18 desempenharem papéis fundamentais no combate a infecções. A primeira é secretada por células do sistema imune como linfócitos T e células *natural killer (NK)* e atua principalmente sobre parasitas intacelulares. IL-18 é uma citocina capaz de promover a produção de IFN- γ independentemente das células NK, estimulando a resposta de linfócitos T. No estudo de análise proteômica também foi identificado variação na expressão de proteínas específicas. Identificamos que as características de taxa de mortalidade, número de oocistos fecais liberados em um período de 24 horas, e a relação do peso do baço com o peso corporal, e o nível de expressão de NK-lisina e IL-18 no baço são componetes importantes da resistência genética à infecção por *Eimeria tenella*.

Considerações finais

Estes resultados são interessantes no sentido de que estas linhagens estão agora caracterizadas e poderão servir de modelo para estudos de interação patógeno-hospedeiro. Além disso, o protocolo utilizado de infecção poderia ser utilizado na seleção genética para diminuir a taxa de mortalidade à infecção com *E. tenella* em linhagens experimentais. Para uso em linhagens comerciais, mais estudos são necessários no sentido de conhecer melhor a correlação genética da taxa de mortalidade com *E. tenella* e outras características economicamente importantes.

Referências

- BRAUNIUS, W. W. Epidemiology of *Eimeria* in broilers in relation to anticoccidial drugs. Arch. Geflügelk., v. 50, p. 88 – 93, 1986.
- JEFFERS, T. K. Anticoccidial drug resistance: a review with emphasis on the polyether ionophores. In: International Coccidiosis Conference, 5., Tours, France, INRA, 1989. Proceedings ... INRA, 1989. p. 295-308.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25, 402-408, 2001.
- MATTIELLO, R.; BOVIEZ, J. D.; McDOUGALD, L. R. *Eimeria brunetti* and *Eimeria necatrix* in chickens of Argentina and confirmation of seven species of *Eimeria*. Avian Diseases, v. 44, p. 711 – 714, 2000.
- SCHNITZLER, B. E.; SHIRLEY, M. W. Immunological aspects of infections with *Eimeria maxima*: a short review. Avian Pathology, v. 28, p. 537 – 543, 1999.

WILLIAMS, R.B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. Inter J Parasitol. v. 29, p. 1209–1229, 1999.

WILLIAMS, R. B.; JOHNSON, J. D.; ANDREWS, S. J. Anticoccidial vaccination of broiler chickens in various management programmes: relationship between oocyst accumulation in litter and the development of protective immunity. Vet. Res. Commun., v. 24, p. 309–325, 2000.

WILLIAMS, R. B. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. Avian Pathol, v. 31, p. 317-353, 2002a.

WILLIAMS, R. B. Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). Avian Dis, v. 46, p. 775 - 802, 2002b.

ZHU, J. J.; LILLEHOJ, H.; ALLEN, P.; VAN TASSEL, C.P.; SONSTEGARD, T.S.; CHENG, H.H.; POLLOCK, D.; SADJADI, M.; MIN, W.; EMARA, M.G. Mapping quantitative trait loci associated with resistant to coccidiosis and growth. Poult. Sci., v. 82, p. 9-16, 2003.

Capítulo 6

Estudo dos fatores de risco associados a problemas tegumentares, com ênfase em Dermatite Necrótica (*Celulite*) e Dermatoses dos Frangos

Fátima Regina Ferreira Jaenisch
Arlei Coldebella
Márcia Regina Franke Kavalli
Kelly Cristina Tagliari de Brito
Ricardo Alfredo Soncini
Allan Durigon
Benito Guimarães de Brito
Valéria Maria Nascimento Abreu
Paulo Giovanni de Abreu
Helenice Mazzuco

Introdução

Estimativas reportam que em 2010, o Brasil responderá por 40% do comércio mundial de carne de frango (Avisite, 2009). Essa liderança brasileira está diretamente relacionada à produtividade do setor avícola e à qualidade dos produtos comercializados.

Toda a produção de frangos converge para os abatedouros onde é avaliada pelo Serviço de Inspeção Sanitária. O resultado desses exames determina o grau de aproveitamento das carcaças. Nessa etapa, entre a produção e a comercialização, a receita esperada pode ser drasticamente reduzida, de acordo com o grau de alterações encontradas nas aves durante a inspeção.

A detecção de problemas tegumentares é crescente durante a inspeção em abatedouros. Muitas das lesões de pele são genericamente classificadas como “dermatoses”, devido à dificuldade de determinar a patogenia do problema.

A dermatite necrótica, popularmente conhecida por “celulite dos frangos” (Figura 1) destaca-se como causa do descarte de carcaças em abatedouros no mundo todo. A manifestação dessa afecção tem sido relacionada a múltiplos fatores da produção.



Foto: Fátima R.F. Jaenisch

Figura 1. Lesão de celulite em frango.

A abordagem dada a este trabalho permitiu a identificação das variáveis associadas à manifestação de dois problemas tegumentares, que acometem frangos de corte, quais sejam: a dermatite necrótica, comumente chamada de celulite dos frangos e as dermatoses, que são lesões tegumentares inespecíficas, também identificadas durante o abate. As respostas obtidas possibilitaram a proposição de intervenção racional sobre os fatores de riscos associados a essas afecções. Esse estudo corrobora com investigações preliminares sobre lesões de pele e mau empenamento em frangos realizados previamente (Jaenisch *et al.*, 2002).

Os resultados permitiram a obtenção de ampla informação sobre esses processos tegumentares, e maior compreensão na manifestação dessas lesões.

Objetivos

- Identificar os fatores de risco associados à manifestação dos problemas tegumentares em frangos, com ênfase em dermatite necrótica (celulite) e dermatoses;
- Desenvolver uma prática/processo agropecuário, com orientações técnicas dirigida a gerentes e técnicos que atuam em avicultura, com vistas à intervenção racional nas áreas de sanidade, ambiência e manejo, para reduzir a manifestação da celulite aviária, na produção de frangos de corte.

Metodologia

A apresentação multifatorial que caracteriza esses processos tegumentares determinou um estudo epidemiológico, abordando questões de manejo, sanidade e ambiência. Foram analisados 125

aviários de frangos de corte, durante os períodos de cria e recria e ao abate das aves.

Atendendo à complexidade do problema, as variáveis observadas foram incluídas no modelo de regressão logística associadas às razões de chances (*Odds Ratio*), para identificar o conjunto de informações que melhor explicassem a relação dos fatores de risco, com a manifestação dos problemas tegumentares estudados, por procedimento LOGISTIC (SAS, 2003).

A seleção das variáveis explicativas, para comporem o modelo final foi realizada pelo método score, considerando somente as variáveis cujo nível descritivo de probabilidade foi inferior a 0,25 ($p < 0,25$) na análise Univariada. A superdispersão da variável resposta foi corrigida por meio da estatística χ^2 de Pearson. No modelo final o nível mínimo de significância considerado foi de 5%. O mesmo procedimento foi realizado para compor o modelo das variáveis para avaliar as dermatoses, lesões tegumentares inespecíficas.

Para o cálculo do impacto econômico da ocorrência de celulite no setor avícola foram consideradas as informações respectivas ao ano de 2008, cuja produção estimada foi de 5,47 bilhões de frangos, com o preço médio no atacado de R\$ 2,29/kg, o peso do frango ao abate de 2,5 Kg, e o rendimento de carcaça de 84%, (Avisite, 2009). Definida uma perda média de 50%, e considerando-se a condenação de celulite (total e parcial), de 0,43% (23,5 milhões de animais afetados) obteve-se a perda em milhões de kg de frango. Dessa forma foi estimado o prejuízo financeiro causado por celulite na cadeia de frangos de corte brasileira.

Resultados e discussão

A partir da metodologia empregada foi identificado o conjunto de variáveis associadas à manifestação da celulite dos frangos. A metodologia proposta possibilitou ainda, a identificação dos fatores de risco associados à manifestação das dermatoses, lesões tegumentares inespecíficas, que também acarretam grandes perdas em abatedouros. As variáveis explicativas associadas à manifestação dos processos tegumentares estudados compuseram um modelo estatístico, que permitiu o cálculo de medidas de associação ajustadas, simultaneamente para o efeito de múltiplas variáveis de confusão e/ou modificadoras de efeito, que segundo Morais & Souza, 1998, essa associação não incorre na perda de poder estatístico.

A identificação do conjunto de variáveis que melhor explicaram a relação dos fatores de risco à manifestação das lesões, possibilitou simular tendências de manifestação dessas patologias, em diferentes condições de campo, decorrentes de modificações sobre os fatores de risco identificados. As variáveis foram organizadas em conjuntos de situações, cuja prevalência tenha sido inferior, à identificada nos aviários estudados.

Com relação especificamente aos resultados obtidos sobre a manifestação da celulite dos frangos, observou-se que a prevalência média foi de 0,43%. Na Figura 2 está apresentada a distribuição da freqüência de celulite nos 107 aviários que compuseram o estudo.

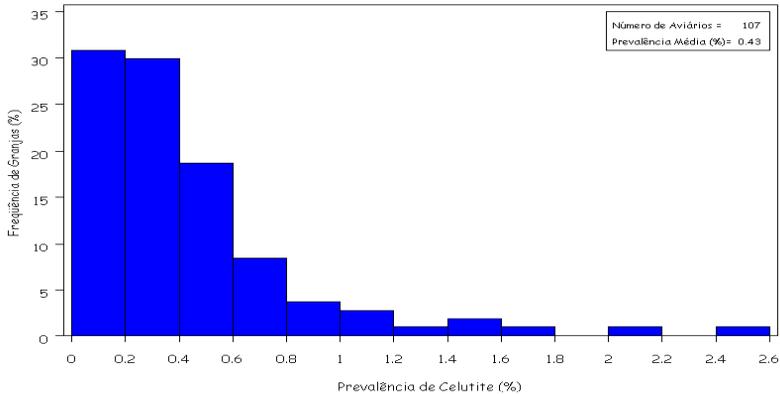


Figura 2. Histograma da distribuição de dermatite necrótica (celulite), nos aviários avaliados.

A abordagem feita nesse estudo permitiu a visualização de situações encontradas a campo, em que a modificação de variáveis determina significativa associação negativa à manifestação das lesões nos frangos. O conjunto das variáveis estatisticamente associadas à manifestação de celulite está relacionado aos seguintes tópicos:

- **Tipo de piso usado nos aviários:** O uso de piso de concreto no aviário mostrou 1,7 vezes mais chances das aves apresentarem celulite do que no piso de chão batido. A esse respeito tem sido reportado, que o chão batido favorece a absorção da umidade da cama, por infiltração da água no solo (Fiorentin, 2003), o que pode ter contribuído para esse resultado.
- **Cuidados de biossegurança nos aviários:** Aviários em que não houve a retirada dos utensílios para higienização antes do alojamento apresentaram 1,8 vezes mais chance de ter celulite. A retirada de aves mortas do aviário durante o dia reduziu em 0,8 a prevalência de celulite, para cada unidade de retirada. Já o excesso de bebedouros nos aviários,

durante as três primeiras semanas de alojamento aumentou o risco de manifestação de celulite.

- **Sexo das aves alojadas:** Frangos do sexo masculino apresentaram 2,5 vezes mais chance de ter celulite do que as fêmeas, sugerindo associação a transtornos metabólicos, uma vez que machos demandam maior trabalho fisiológico (Jaenisch, *et al.*, 2001).
- **Número de lotes criados sobre a mesma cama:** O aumento do número de lotes criados sobre a mesma cama aumentou em 1,1 o risco de celulite, para cada lote a mais alojado.
- **Distância entre incubatório e aviário:** Aves provenientes de incubatórios localizados fora da região de criação apresentaram 1,3 vezes mais chance de ter celulite, do que as oriundas do incubatório local.
- **Tempo de permanência das aves no aviário:** O tempo de permanência das aves no aviário aumentou a manifestação de celulite em 1,0 para cada dia a mais de alojamento.
- **Localização dos silos de ração:** A localização dos silos de ração, do lado de fora do aviário aumentou 2,3 vezes mais a chance das aves apresentarem celulite. É provável que a maior exposição às temperaturas elevadas acelere a degradação de ingredientes da ração, especialmente de vitaminas e antioxidantes, que atuam na preservação dos endotélios dos vasos e integridade da pele. Trabalhos reportam que a suplementação de Zinco e vitamina E reduz a incidência de celulite em frangos (Downs, *et al.*, 2000).

Considerando-se que em 2008, a produção brasileira de frangos foi de 5,47 bilhões de cabeças (Avisite, 2009) e sendo de 0,43% a condenação (total/parcial) por celulite obtida nesse trabalho, estima-se uma perda por essa lesão em torno de 23,5 milhões de animais, o que corresponde a um prejuízo de 56,4 milhões de reais, para a cadeia de frangos de corte brasileira.

Outro problema tegumentar, estudado nesse trabalho foram as afecções cutâneas inespecíficas, categorizadas como dermatoses, ao exame *post mortem*.

A prevalência média de dermatose em 102 lotes avaliados foi de 1,31% mostrando-se um problema maior que a própria celulite em frangos (Figura 3).

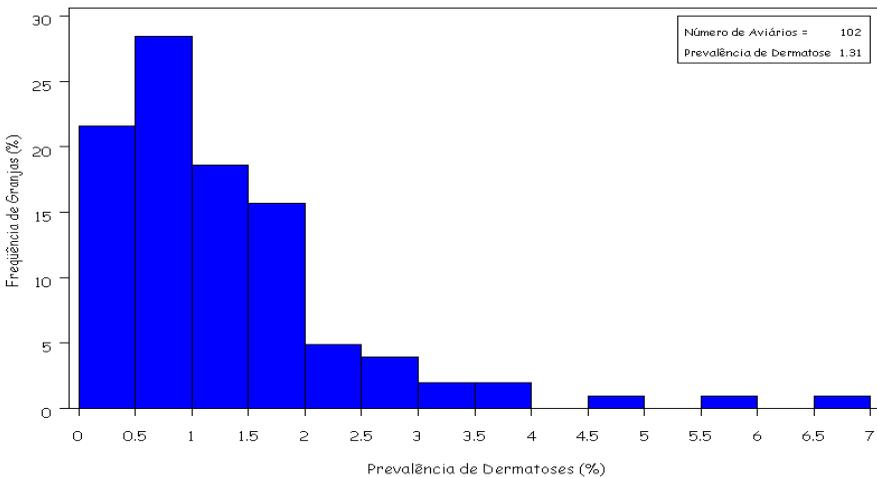


Figura 3. Histograma da distribuição de dermatose nos aviários avaliados.

Foi determinado o conjunto de fatores de risco, associados à apresentação das dermatoses. Este estudo possibilitou maior esclarecimento sobre a participação das possíveis variáveis na manifestação dessa afecção.

Da mesma forma que na celulite, foram identificadas diversas situações de campo que, ao serem modificadas, determinam significativa redução da prevalência de dermatose. O conjunto dos fatores de risco que apresentou menor chance da manifestação de dermatose foi composto por variáveis relativas aos seguintes tópicos:

- **Fatores relacionados à biossegurança:** Aves alojadas em aviários nos quais não houve a distribuição de cama nova no pinteiro apresentaram 1,7 vezes mais chance de ter dermatose, do que as alojadas em aviários em que essa distribuição foi realizada. Aviários em que não houve a desinfecção dos equipamentos antes do alojamento dos pintos apresentaram 1,4 vezes mais chance de descarte por dermatose, do que naqueles em que não houve a desinfecção. A redução no número de dias de intervalo entre lotes, antes do alojamento dos pintos, propiciou aumento na chance de aparecimento de dermatose.
- **Linhagem e sexo:** Obteve-se 1,7 vezes mais chance de ter dermatose com a linhagem denominada A quando comparada com a linhagem B. Machos mostraram o dobro de chance da ocorrência dessa lesão com relação às fêmeas.
- **Fatores de manejo e ambiência:** O uso de comedouros tubulares, que demandam maior manipulação operacional propiciou 1,7 vezes mais chance de aparecimento de dermatoses, do que os comedouros tuboflex. Nos aviários pequenos, de até 63m de comprimento, a chance do aparecimento de dermatoses foi 1,8 vezes menor quando comparados aos aviários de até 103m.
- **Fatores de risco ligados à ambiência:** Aves alojadas no inverno apresentaram 1,4 vezes mais chance de ter dermatose do que aquelas alojadas no verão. Observou-se que quanto mais vezes a temperatura esteve fora da zona de conforto para as aves, maior foi a prevalência de dermatose.

Tecnologias geradas

A identificação do conjunto de variáveis relacionado à manifestação da dermatite necrótica e da dermatose em frangos possibilitou a elaboração de documento do tipo prática/processo agropecuário. As

informações são direcionadas a gerentes e técnicos, que trabalham na avicultura, com orientações que permitem a tomada de decisão de forma ponderada, quanto à adoção de medidas de manejo, ambientais e sanitárias, com vistas à redução desses problemas tegumentares em frangos de corte.

Considerações finais

Essa pesquisa demandou grande empenho, para abarcar de maneira clara e correta, as inúmeras variáveis com potencial envolvimento na manifestação das afecções estudadas.

Este estudo possibilitou maior esclarecimento quanto à participação das variáveis explicativas na manifestação dos problemas tegumentares estudados, limitando o universo dos fatores de risco a serem considerados no entendimento e controle dessas afecções.

As informações obtidas dão subsídios para a tomada de decisão, quanto à adoção de medidas racionais de manejo, ambientais e sanitárias, com vistas à redução da manifestação de celulite e de dermatose em frangos de corte.

Referências

AVISITE. Cotações Médias do Frango 2008/2009 R\$/Kg. Disponível em:<http://www.avisite.com.br/economia/cotacoesmed.asp?acao=frang> oabatido. Acesso em: Nov. 2009.

DOWNS, K. M. *et al.* Dietary Zinc complexes and vitamin E for reducing cellulitis in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, 9:319-323, 2000.

FIORENTIN, L. A. reutilização da cama de aviário no contexto do benchmarking. **Avicultura Industrial**. São Paulo, nº 06: 2006, ANO 97-Edição 1146.

GIOTTO, A. *et al.* Impacto econômico de condenação *post mortem* de frangos de corte em um matadouro–frigorífico na região sul do Brasil. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0701-2.pdf>. Acesso em: Jul. 2009.

JAENISCH F.R.F. *et al.* Síndrome da hipertensão pulmonar. **Circular técnica 27**; ISSN 0102-3713. Concórdia SC, 2001. Disponível em: www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cit27.pdf Acesso Jan. 2010.

JAENISCH, F. R.F. *et al.* Caracterização da síndrome do mau empenamento em frangos de corte. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 11p. (Embrapa Suínos e Aves. **Circular Técnica, 33**). Disponível em: www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cit33.pdf

MORAIS, S.A., & SOUZA, J.M.P. Metodologia caso-controle em epidemiologia de doenças cardiovasculares: II - Análise de dados. **Rev. Saúde Pública** [online]. 1998, vol.32, n.1, pp. 82-88. ISSN 0034-8910. doi: 10.1590/S0034-89101998000100013.

SAS INSTITUTE INC. **System for Microsoft Windows**: Release 9.1. Cary, 2002-2003. 1 CD-ROM.

Embrapa

Suínos e Aves

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

