

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DE TEMPERATURA COMO MÉTODO DE ESTUDO DA MICROBIOTA CECAL DE FRANGOS DE CORTE

João Carlos Zamae Rodrigues¹
Adriano Sakai Okamoto²
Josias Rodrigues³
Tarcísio Macedo²
Raphael Lúcio Andreatti Filho²

RESUMO

Exigem-se atualmente das aves de produção um desenvolvimento acelerado e máxima eficiência produtiva, o que só pode ser obtido tendo-se como base uma homeostase fisiológica intestinal, a qual só será possível mediante o estabelecimento de uma microbiota saudável. É de consenso geral que a microbiota afeta tanto o sistema imune, local e sistêmico, quanto o aproveitamento da dieta, por isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição da microbiota cecal das aves ao longo dos 42 dias de vida, utilizando-se da Técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE), ainda não explorada pela avicultura. Os resultados demonstraram uma estabilidade da composição da microbiota ao longo do período avaliado, entretanto, um refinamento da técnica e outros estudos podem trazer informações complementares.

Palavras chave: *Salmonella*, frangos, TGGE, microbiota intestinal, imunidade.

EVALUATION OF THE TEMPERATURE GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS AS STUDY METHOD OF THE BROILER CHICKEN CECAL MICROBIOTA

ABSTRACT

They are currently required of the poultry of production an accelerated development and maximum productive efficiency, which can only be provided taking as the basis an intestinal physiological homeostasis, which can only be achieved by establishing a healthy microflora. It is generally agreed that the microbiota affects both the immune system, local and systemic, as the use of diet, so the aim of this study was to evaluate the composition of the cecal microbiota of birds over the 42 days of life, using the electrophoresis technique Gel with temperature gradient (TGGE), not yet exploited by poultry. The results demonstrated a stable microbiota composition throughout the study period, however, a refinement of technical and other studies can provide additional information.

Keywords: *Salmonella*, broiler, TGGE, intestinal microbiota, immunity.

¹ Patologia aviária, FMVZ - Unesp de Botucatu. Correspondência.

² Setor de Ornitopatologia, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ - Unesp de Botucatu.

³ Departamento de Microbiologia, IBB – Unesp.

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE TEMPERATURA COMO UN MÉTODO DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CECAL DE POLLOS DE ENGORDE

RESÚMEN

En la actualidad se requiere la producción de aves de corral acelerado desarrollo y la eficiencia productiva máxima, que sólo puede ser proporcionado tomando como base una homeostasis fisiológica intestinal, que sólo se puede lograr mediante el establecimiento de una microflora saludable. En general, se acordó que la microbiota afecta tanto al sistema inmunológico, local y sistémica, como el uso de la dieta, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la composición de la microbiota cecal de las aves durante la vida útil de 42 días, utilizando la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), aún no explotado por la avicultura. Nuestros resultados demostraron una composición de la microbiota estable durante todo el período de estudio, sin embargo, un refinamiento de los estudios técnicos y de otro puede proporcionar información adicional.

Palabras clave: Salmonella, pollos, TGGE, microbiota intestinal, inmunidad.

INTRODUÇÃO

As bactérias do trato gastrointestinal interagem entre si e com seus hospedeiros, e muitas dessas interações permanecem indefinidas devido à falta de conhecimento sobre a completa composição desta microbiota, a qual já se sabe, pode alterar profundamente a saúde e produtividade do hospedeiro (1).

Na produção comercial, as aves são incubadas em ambiente limpo, ocasionando a falta de provedores naturais de uma microbiota (2), assim, seu trato intestinal passa a ser um local de multiplicação irrestrita de patógenos (3). Por isso os eventos que ocorrem logo após a incubação são fundamentais para o desenvolvimento de uma microbiota saudável (2).

Devido às limitações das técnicas de cultivo e biologia molecular convencionais no estudo de comunidades bacterianas, desenvolveu-se a *temperature gradient gel eletrophoresis* (TGGE) (4). Essa técnica consiste em um gel de poli(acrilamida submetido a um gradiente de temperatura paralelo a uma corrente elétrica aplicada ao gel (5). O DNA é atraído pelo eletrodo positivo e migra pelo gel, enquanto as pontes de hidrogênio que ligam seus pares de base são separadas pelo gradiente de temperatura, causando sua desnaturação e diminuição do tempo de migração (6). Assim, variação na sequência das bases resultará em diferentes pontos de desnaturação no gel (4). Essas bandas podem ser extraídas, reamplificadas e sequenciadas (7).

Sendo assim, o objetivo do presente experimento foi avaliar a eficácia da técnica de TGGE como ferramenta de estudo da composição da microbiota cecal de frangos de corte ao longo do período de criação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 frangos de corte, com um dia de idade, da linhagem Cobb, alojados em gaiolas de arame com fornecimento de água e ração padrão *ad libitum*. Aos 10, 20, 30 e 42 dias de vida, foram selecionadas 6 aves ao acaso para eutanásia e coleta do conteúdo cecal.

As amostras das 6 aves nos respectivos momentos foram misturadas e esse *pool* submetido à extração de DNA com o kit *Stool DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp®)*. O produto resultante foi submetido à PCR sendo 5µl deste acrescido de 40µl de água ultrapura,

10 μ L de *Taq 5X Mastermix* (Biolabs[®]) e 0,5 μ L de cada um dos *primers*, *forward* U968GC (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC) e *reverse* L1401 (GCG TGT GTA CAA GAC CC) totalizando 50 μ L. A amplificação seguiu-se conforme Zoetendal et al. (8): desnaturação inicial de 95°C/5min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C/40s, anelamento a 55°C/40s e extensão a 72°C/1min, complementos por uma extensão final de 72°C/7min.

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5%, corado com *GelRed 10000x* (BIOTIUM[®]), por 40min a 70V, tendo como referência um marcador de 100pb. A banda correspondente ao *amplicon* (~433bp) foi purificada utilizando o kit *GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare[®]) e submetida à eletroforese em gel nas mesmas condições previamente citadas.

Por fim, 1 μ L de cada um dos produtos foi disposto em poços distintos de um gel consistindo de 6% de poliacrilamida (37,5:1), 8M de uréia, 2% de glicerol e 20% de formamida sob um gradiente de 32,5 a 45,4°C, em 130V por 2h. Este gel foi corado com nitrato de prata, observado em transiluminador de luz branca e fotografado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na figura 1 que o padrão de bandas para G1 se manteve semelhante ao longo dos quatro momentos de coleta e, assim, conclui-se que não houve variação da microbiota.

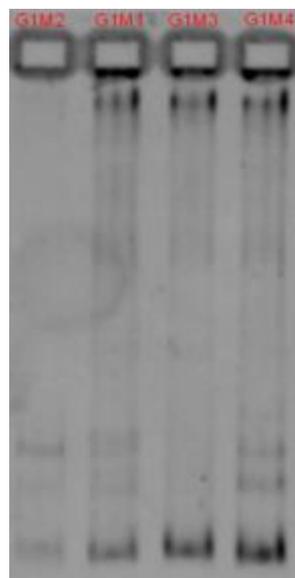


Figura 1. Gel resultante da técnica de TGGE revelando as bandas geradas pelos diferentes amplicons da PCR do conteúdo cecal das aves aos 10 (G1M1), 20 (G1M2), 30 (G1M3) e 42 dias (G1M4).

Os resultados do presente estudo diferem dos de Van der Wielen et al. (9) que reportaram um aumento na complexidade da microbiota, ao longo dos 38 dias de vida das aves, evidenciado pelo aumento do número de bandas no gel de eletroforese. Os autores afirmam ainda que aves mais velhas apresentam padrões de banda mais distintos em relação às outras, diferente das aves jovens que apresentam padrões semelhantes. Os resultados desse estudo não revelaram essa variação, estando de acordo com Apajalahti et al. (10).

Cabe ressaltar que estudos prévios da microbiota intestinal das aves mostraram uma diversidade de espécies, mas, ao se regredir na escala filogenética, observa-se que eles são pertencentes a basicamente 5 famílias, sendo as mais frequentes Enterobacteriaceae, Clostridiaceae e Lactobacillaceae (11).

Pode ser que as variações tenham ocorrido ao nível de gênero, as quais a técnica utilizada no presente estudo não foi eficaz em revelar. Nesse contexto, comunidades bacterianas que apresentam poucos grupos e dominantes, gerarão padrões de banda mais simples e aqueles grupos de menor abundância podem não ser adequadamente representados (4).

Também em discordância com a diversidade da microbiota relatada em literatura está o estudo de Pedroso et al. (12). Simpson et al. (13) ressaltam que os amplicons gerados por comunidades com contagens inferiores a 10^8 UFC/g de fezes não são capturados pela densitometria.

Outra possibilidade é a comigração de alguns fragmentos com poucos pares de base de diferença (14). Nessas situações, há bandas que não representam espécies ou gêneros, mas até famílias ou grupos (13).

CONCLUSÕES

A TGGE é uma ferramenta promissora para o estudo da microbiota entérica das aves e ainda pouco explorada, visto que até o fechamento deste trabalho não se encontraram na literatura estudos similares em frangos de corte. Por isso, esperamos progredir na sua utilização e fornecer dados robustos para a confecção de produtos probióticos e combate aos patógenos intestinais, gerando assim, melhor desempenho produtivo.

Aprovado pelo Comitê de experimentação de Ética da FMVZ, UNESP- Botucatu, conforme Protocolo 43/2013

Apoio e Financiamento FAPESP.

REFERÊNCIAS

1. Lyte M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Med Hypotheses*. 2010;74(4):634-8.
2. Crhanova M, Hradecka H, Faldynova M, Matulova M, Havlickova H, Sisak F, et al. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infect Immun*. 2011;79(7):2755-63.
3. Methner U, Barrow PA, Gregorova D, Rychlik I. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of *Salmonella* phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. *Vet Microbiol*. 2004;98(1):37-43.
4. Muzyer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGT) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998;73(1):127-41.
5. Chadalavada DM, Bevilacqua PC. Analyzing RNA and DNA folding using temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) with application to in vitro selections. *Methods Enzimol*. 2009;468:389-408.
6. Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*. 2004;56(3):297-314.

7. Seidavi A. Molecular approaches for the study of genetic diversity in microflora of poultry gastrointestinal tract. In: Caliskan M. Analysis of genetic variation in animals. Rijeka: InTech; 2012. p.83-104.
8. Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(1):3854-59.
9. Van der Wielen PWJJ, Lipman LJ, Van Knapen F, Biesterveld S. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):555-9.
10. pajalahti JH, Särkilahti LK, Mäki BR, Heikkinen JP, Nurminen PH, Holben WE. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytosine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):4084-8.
11. Amit-romach E, Sklan D, Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult Sci.* 2004;83(7):1093-8.
12. Pedroso AA, Menten JF, Lambais MR, Racanicci AMC, Longo FA, Sorbara JOB. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. *Poult Sci.* 2006;85(4):747-52.
13. Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Methods.* 1999;36(3):167-79.
14. Jackson S, James M, Abrams P. The effect of oestradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG.* 2002;109(3):339-44.

Recebido em: 16/08/2015

Aceito em: 27/01/2017