



REVISÃO SOBRE ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE POTROS

GABRIELA SANTOS ALENCAR; LUANDA FERREIRA CIPRIANO; LAURA SOARES MAGALHÃES; MARIA LUIZA MACIEL DE MENDONÇA

RESUMO

Este trabalho trata da análise da microbiota intestinal de potros, em diferentes situações de idade, manejo e alimentação, utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) combinadas a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Para tanto, trazemos uma revisão de literatura sobre o tema, partindo das premissas gerais e já conhecidas de que a manutenção de uma microbiota saudável é crucial para o bem-estar dos mais diversos tipos de animais, uma vez que afeta diretamente sua saúde imunológica, metabólica, seu desenvolvimento geral e qualidade de vida. Potros, assim como outros filhotes, são bastante sensíveis às mudanças ocorridas na microbiota assim como aos desafios que seu sistema imunológico é exposto nos primeiros dias de vida, período crucial para estabelecer uma população intestinal saudável e proporcionar um bom desempenho nas fases posteriores de seu desenvolvimento. O uso de algumas técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento do gene 16S rRNA e a qPCR, são usadas nesse contexto para estudar a microbiota intestinal, sua composição, diversidade e mudanças ocorridas ao longo da vida do animal. O uso combinado dessas técnicas fornece informações precisas sobre grupos específicos de microrganismos que povoam o trato gastrointestinal, permitindo que se faça uma intervenção mais direcionada na saúde, alimentação e manejo dos animais, como a confecção de prebióticos, probióticos ou pós bióticos específicos a necessidade do animal naquela fase de sua vida. Dessa forma, isso pode resultar na melhoria dos índices produtivos e reprodutivos, além da qualidade de vida dos animais a curto, médio e longo prazo.

Palavras-chave: NGS; microbiologia; equinos; microbioma; 16S.

1 INTRODUÇÃO

A colonização do trato gastrointestinal dos equinos ocorre ainda na vida intrauterina, passa por diversas mudanças ao longo da vida do animal e acaba culminando em uma população rica e diversa, contando com várias espécies de protozoários, vírus, fungos e bactérias anaeróbias. Sua diversidade é mais expressiva durante os primeiros meses de vida do potro, e vai se tornando tão mais estável quanto o animal se aproxima da vida adulta (QUERCIA et al, 2019; COSTA, 2016).

Conforme o potro passa a se alimentar de outras fontes de carboidrato sua microbiota consequentemente muda a fim de se adaptar melhor a sua dieta, o que ocasiona a perda da microbiota do mecônio e a aquisição de microrganismos fermentadores de fibras através do próprio leite materno. O consumo de forragem e a própria coprofagia, comportamento normal da espécie, também contribuem para essa diversificação (QUERCIA et al, 2019).

A manutenção de uma microbiota saudável é essencial para o bem estar do animal,

não somente de equinos, mas de todas as espécies, pois permite que o potro portador da microbiota saudável cresça sendo competente em termos imunológicos e metabólicos para ser um indivíduo saudável em sua vida adulta e velhice. Além disso, o conhecimento dos componentes dessa microbiota permite ampliar as possibilidades de intervenção na saúde, alimentação e manejos desses animais, podendo contribuir assim com a melhoria dos índices produtivos, qualidade de vida e reprodução dos animais a curto, médio e longo prazo (QUERCIA et al, 2019).

Para melhor elucidar as mudanças ocorridas na microbiota dos potros assim como a sua composição, são empregadas técnicas diagnósticas de biologia molecular, dentre elas o Sequenciamento genético do Gene 16S rRNA, que por sua vez permite a caracterização dos componentes da microbiota intestinal e verificação da diversidade da população microbiana que a compõe (MOLS et al, 2020).

Associada a esta técnica se emprega comumente a qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real), o uso simultâneo dessas técnicas permite complementar a análise da microbiota fornecendo informações quantitativas mais precisas sobre grupos específicos de microrganismos de interesse, pois, enquanto as análises por sequenciamento geram resultados gerais e com dados bastante volumosos, as análises por PCR permitem se direcionar as buscas para um alvo específico com o auxílio de primers desenhados para tal finalidade (COSTA E WEESE, 2018).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A microbiota intestinal normal do potro ao nascer é complexa e tem um caráter transitório, sofrendo sucessivas transformações ao longo dos primeiros 30 dias de vida. Pode facilmente ser mudada em termos de componentes e distribuição destes, sendo fatores como ambiente e dieta determinantes nestas características. Tende a ir tornando-se estável e cada vez mais parecida com a microbiota de um indivíduo adulto a partir dos 50 a 60 dias de vida até os 9 meses de idade, quando, em média, tende a se tornar mais semelhante a microbiota de sua mãe (Costa et al, 2018; MOLS et al, 2020).

Ao analisar a microbiota do mecônio de potros saudáveis, notou-se a presença de bactérias que estão comumente presentes nas fezes, vagina e boca de equinos adultos. Os filos mais predominantemente encontrados foram *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobactérias* e *Bacteroidetes*, sendo estes associados a digestão e fermentação de alimentos em adultos (QUERCIA et al, 2019; MOLS et al, 2020).

Vale destacar que, a microbiota intestinal normal de um cavalo adulto saudável é povoada em sua maioria por bactérias do filo *Firmicutes*, tal qual a maioria dos mamíferos, seguida por *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia*. Contudo, o conceito de microbiota normal pode variar de acordo com a idade, região geográfica em que o animal se encontra, sistema de manejo empregado e raça desse (COSTA E WEESE, 2018; QUERCIA et al, 2019).

Parte dos microrganismos que vão compor a flora adulta dos potros são adquiridos por via coprofágica, entre o terceiro ao quinto dia de vida, sendo essa ingestão de fezes maior aos quatorze dias e permanecendo até os dois meses de idade, contribuindo para a estabilização da microbiota intestinal do potro. São microrganismos adquiridos através do hábito de coprofagia as *Prevotellas*, *Blautias* e *Ruminococcus*, que por sua vez irão auxiliar o animal na fermentação e digestão de fibras presentes em sua dieta (COSTA E WEESE, 2018).

Em 2022, Husso e seus colaboradores realizaram uma análise utilizando a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA, de sua região hipervariável V3-V4, que buscava comparar a microbiota intestinal de potros no período perinatal com a microbiota vaginal, oral e fecal de suas mães, a fim de melhor compreender as ligações existentes entre estes indivíduos, sua influência na composição da microbiota intestinal dos potros, assim como as

populações que compõem estas microbiotas e sua respectiva distribuição.

O estudo em questão utilizava 14 pares de éguas com idades entre 6 a 16 anos, assim como 18 potros, sendo 10 fêmeas e 8 machos, sendo 14 destes potros filhos das éguas aqui citadas e mais outros 4 foram adicionados ao experimento. Todos os animais nasceram durante o mesmo período do ano e foram expostos às mesmas condições de alimentação e manejo (HUSSO et al, 2022).

Para a análise em questão foi utilizada a plataforma Illumina MiSeq, os resultados obtidos indicam que a microbiota normal dos potros após 24 horas de nascimento mais se assemelha a microbiota das fezes de sua mãe, seguindo por uma forte colonização por indivíduos do filo *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Aos 7 dias de vida a microbiota dos potros ainda diferia da microbiota encontrada nas fezes de indivíduos adultos, mas se assemelhava a microbiota vaginal de suas mães. Os dados obtidos por esta pesquisa ressaltam o fato de que a microbiota normal de um potro recém-nascido muda muito rapidamente durante os seus primeiros dias de vida, mas que vai se estabilizando conforme o animal vai ficando mais velho (HUSSO et al, 2022).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de colonização e desenvolvimento da microbiota intestinal dos potros é bastante complexo, uma vez que sofre influência de diversas fontes como da própria transmissão materna, das mudanças sofridas em sua dieta, das condições de manejo, contato com outros animais, preservação de seu bem estar e condições do próprio ambiente ao qual o animal se encontra. Outros fatores que podem afetar a microbiota intestinal de equinos são: a presença de inflamações no trato gastrointestinal, frequência de exercícios físicos, clima, estado imunológico do animal, condições de transporte do animal, higiene, jejum estendido, uso de probióticos, probióticos e antibióticos (LIEPMAN, 2015; SCHOSTER et al, 2016; MOLS et al, 2020).

O uso de antibióticos se destaca como o fator externo com as influências mais profundas sobre a microbiota. A administração destas substâncias ocasiona um desbalanço populacional que leva a diminuição da população bacteriana comensal residente e consequente aumento de bactérias patogênicas naturalmente resistentes, promovendo um quadro de disbiose, sendo os animais adultos mais resistentes a isto em relação aos potros (LIEPMAN, 2015; COSTA E WEESE, 2018).

A introdução de forragem na alimentação dos animais, com consequente diminuição do consumo do leite e introdução de concentrado promove alterações significativas na composição da microbiota intestinal dos potros, promovendo um aumento significativo na quantidade de bactérias fermentadoras em animais dos 7 aos 14 dias de vida. A literatura cita ainda alterações permanentes na microbiota intestinal com a suplementação de prebióticos na alimentação de cavalos, em contrapartida o uso dos probióticos não parece ter o mesmo potencial de feito, sendo dessa forma necessária a realização de mais estudos para melhor elucidar esta questão (SCHOSTER, et al, 2016).

Há uma estreita relação entre a colonização bacteriana e a competência do sistema imunológico em manter o indivíduo protegido de enfermidades como doenças inflamatórias intestinais, doenças inflamatórias das vias aéreas assim como a sua obstrução recorrente. A presença de condições debilitantes de saúde também promove influência na composição da microbiota do animal, tais como colite, cólicas e laminites (COSTA E WEESE, 2018; SHEPARD, 2012).

Sabe-se que as cólicas são condições extremamente estressantes para o animal e que a sua microbiota intestinal é sensível às mudanças provocadas mediante esta situação. Os estressores que podem vir a causar cólicas são de naturezas diversas, podendo ocasionar

aumento na população de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, se comparado a um indivíduo saudável. Análises de NGS sugerem a ocorrência de alterações em alguns táxons bacterianos na região proximal do volvo do cólon maior, o que tem potencial de uso como ferramenta de diagnóstico para detecção precoce e tratamento de alguns episódios de cólica em equinos (COSTA E WEESE, 2018).

A questão da diarreia por calor do potro também se associa ao desenvolvimento e maturação da microbiota do animal, processo induzido pelo ato de coprofagia, que auxilia na colonização desta microbiota e promove maior diversidade de microrganismos que anteriormente não existiam, o que permite a fermentação de outros alimentos que não o leite materno (SCHOSTER, et al, 2016).

A microbiota intestinal de cavalos que apresentam colite, doença de grande importância econômica, tende a ter grande disparidade em relação às suas comunidades bacterianas componentes se comparada a microbiota de um cavalo saudável. Além disso, cavalos com diarreia apresentam menor diversidade populacional em sua microbiota e indivíduos com colite têm a ter uma quantidade extremamente reduzida de indivíduos do filo *Firmicutes* compondo a sua microbiota. (COSTA E WEESE, 2018).

Em indivíduos com Laminite há uma relação já bem estabelecida entre a sobrecarga de carboidratos em sua microbiota o desenvolvimento da doença, observado com o uso de técnicas moleculares, que apontam um maior desenvolvimento da população de *Streptococcus spp* antes do animal desenvolver a doença, e após o desenvolvimento pleno da enfermidade nota-se uma mudança significativa com predominância das populações de *Escherichia coli* e *Lactobacillus spp* (COSTA E WEESE, 2018).

De modo geral os artigos consultados para confecção deste estudo concordam na questão de que há grande necessidade de realização de mais estudos acerca da influência da microbiota na vida dos equinos em específico, se comparado aos mesmos estudos realizados em outras espécies como aves e bovinos, destacando a carência de dados mais robustos a longo prazo para estabelecimento de um estudo prospectivo.

4 CONCLUSÃO

O sequenciamento do microbioma dos potros é de extrema importância para ampliar os dados sobre a microbiota do animal e dessa forma poder ter um melhor direcionamento em termos de conduta de manejo geral, alimentação e suplementação, o que propicia maior probabilidade do indivíduo se tornar um adulto funcional e saudável. Permite também elucidar questões sobre a ligação mãe-potro em relação ao intercâmbio de população microbiana da microbiota, como isso afeta o animal diretamente enquanto permite que se façam intervenções na própria mãe visando melhorar a qualidade de vida tanto dela quanto do potro.

Portanto, há ainda a necessidade de ampliar estes estudos no sentido de testar mais animais em diferentes situações de manejo, contactantes e padrões alimentares, acompanhados por mais tempo ou mesmo pela vida toda, a fim de gerar mais dados para produção de probióticos, prebióticos, e outros medicamentos ou formas de intervenção na saúde e bem estar destes animais, permitindo que se avalie ainda o impacto que essa população e sua distribuição têm na vida dos equinos de modo geral.

REFERÊNCIAS

COSTA, M.C. et al. Desenvolvimento fecal da microbiota em potros. **Equine Veterinary Journal**., 2016, ed: 48, p. 681–688. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/evj.12532> Acesso em: 26 jul. 2023.

COSTA, M.C; WEESE, J.S. Understanding the intestinal microbiome in health and disease. **Veterinary clinics of North America: Equine Practice**. v. 34, 2018, p.1-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2017.11.005> Acesso em: 26 jul. 2023.

HUSSO, A; JALANKA, J.; ALIPOUR, M.J.; HUHTI, P.; KARESKOSKI, M. PESSA-MORIKAWA, T.; LIVANAINEN, A.; NIKU, M. The composition of the perinatal intestinal microbiota in horse. **Scientific reports**. 2020, v.441, p.1-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57003-8>. Acesso em: 25 jul. 2023.

LIEPMAN, R. S. Alterações no microbioma fecal de cavalos saudáveis em resposta ao tratamento com antibióticos. (Tese) Columbia (OH): **Universidade Estadual de Ohio**. 2015, p.1-88. Disponível em: http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu1429004228 Acesso em: 25 jul. 2023.

MOLS, K. L.; HANSEN-BOE, G.B.; MIKKELSEN, D.; BRYDEN, W.L. CAWDELL - SMITH, A. J. Prenatal establishment of the foal gut microbiota: a critique of the útero colonisation hypothesis. **Animal Production Science**, 2020, v.60, p.2080–2092. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/AN20010> Acesso em: 25 jul. 2023.

QUERCIA, S.; FRECCERO, F.; CASTAGNETTI, C.; SOVERINI, M.; TURRONI, S.; BIAGGI, E.; RAMPELLI, S.; LANCI, A.; MARIELLA, J.; CHINELLATO, E.; BRIGIDI, P.; CANDELA, M. Early colonization and temporal dynamics of the gut microbial ecosystem in standardbred foals. **Equine Veterinary Journal**. v. 51, 2019, p. 231–237. Disponível em: DOI: 10.1111/evj.12983. Acesso em: 25. Jul 2023.

SHEPARD, M.L, SWECKER, W. S. J., JENSEN, R.V., et al. Caracterização das comunidades de bactérias fecais de equinos alimentados com forragem por pirosequenciamento do gene 16S rRNA V4 amplicons. **FEMS Microbiology Lett** v. 326, 2012, p.62–68. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02434.x> Acesso em: 25. Jul 2023.

SCHOSTER, A; GUADABASSI, L; STAEMPFLI, H.R., et al. O efeito longitudinal de um probiótico multiestirpe na microbiota bacteriana intestinal de potros recém-nascidos. **Equine Veterinary Journal**. 2016; v.48, p.689–696. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/evj.12524> Acesso em: 26. Jul 2023