

COMPARAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE CÃES MAGROS E OBESOS

Modalidade: () Ensino (X) Pesquisa () Extensão

Nível: () Médio (X) Superior () Pós-graduação

Área: () Química () Informática (X) Ciências Agrárias () Educação () Multidisciplinar

Autores : Charlene Ediane LONGHI¹; Renata Cavalcanti Bastos da ROCHA²; André Luis Fachini de SOUZA³

Identificação autores: ¹Acadêmica do curso de Medicina Veterinária, no Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari* e bolsista Edital 045/2015 PIBIC/IFC; ²Acadêmica do curso de Medicina Veterinária, no Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari*; ³Docente no Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari*.

Introdução

No Brasil, entre 30% e 40% dos cães são obesos, uma síndrome cada vez mais presente na clínica veterinária. A má alimentação e o sedentarismo contribuem bastante com o sobrepeso nestes animais sendo que estudos recentes têm sugerido que a microbiota intestinal está relacionada com a obesidade. Pesquisadores mostraram que camundongos biologicamente alterados para crescerem sem nenhuma bactéria tendiam a ser mais magros que os animais normais e ganhavam peso se recebessem as bactérias de um camundongo comum (HARTSTRA et al., 2014).

Do mesmo modo, percebe-se que, em humanos, as bactérias intestinais podem manipular o comportamento humano para ingerir certos tipos de alimentos por meio da síntese de hormônios, toxinas e neurotransmissores similares aos humanos. Também são capazes de modular a capacidade de coleta de energia de polissacarídeos não digeríveis, podendo afetar o metabolismo do controle de peso corporal do hospedeiro e sua homeostase energética (HANDL et al., 2013).

Em cães, poucos estudos foram desenvolvidos neste sentido. Foram comparadas as microbiotas intestinais de cães magros e obesos, observando-se diferenças significativas, conforme as observações realizadas nos estudos com humanos e roedores (HANDL et al., 2013).

Desta forma, este trabalho tem o objetivo de comparar a microbiota fecal de cães magros e obesos com relação a características macroscópicas, microscópicas e bioquímicas de bactérias isoladas dos animais em estudo.

Material e Métodos

Amostras de fezes foram coletadas em cães que foram avaliados quanto ao escore de condição corporal (ECC), por meio de escalas numéricas de 9 pontos (LAFLAMME, 1997). Esses animais foram classificados em quatro grupos: muito magro (1-3), ideal (4-5), sobrepeso (6) e obeso (7-9). Todos os animais selecionados para este estudo apresentavam o trato gastrointestinal hígido.

Uma amostra de fezes por cão estudado foi colhida à fresco em frasco estéril, logo após defecação espontânea e levada ao laboratório do IFC – Campus Araquari. Parte da amostra foi utilizada nos ensaios microbiológicos e o restante imediatamente congelado a -20 °C. A parte da amostra congelada foi armazenada para a montagem inicial de um banco de fezes de animais magros e obesos que poderá ser utilizado em trabalhos posteriores para extração do DNA genômico e identificação bacteriana pelo sequenciamento do gene que codifica o mRNA 16S, como descrito por HANDL et al (2013). Foi usado um sistema de identificação das amostras alfanumérico conforme exemplo: “A1B1”.

No início do estudo, foi realizado um procedimento-piloto para o estabelecimento da diluição adequada em solução salina isotônica (NaCl 0,9% [p/v]), que permitiu o crescimento de um número viável de colônias por grama de fezes. Uma massa de 1 grama de cada amostra de fezes foi diluída a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em solução salina isotônica para um volume final de 10mL. Na sequência, foi plaqueado 1mL de cada diluição em meio de cultivo ágar nutriente (Extrato de carne 3g/L; Peptona 5g/L; Cloreto de sódio 8g/L e Ágar 15g/L) e incubado em estufa a 37°C *overnight*. Após contagem das colônias, as mesmas foram replicadas para outra placa de Petri numerada contendo meio ágar nutriente para identificação de cada colônia isolada e replicadas para microtubos contendo 500 µL de caldo nutriente e incubados a 37°C *overnight*. Na sequência foi adicionado um volume de 500 µL de glicerol aos microtubos, seguido de homogeneização delicada e armazenamento a -20°C.

As colônias isoladas foram previamente analisadas macroscopicamente, quanto a aspectos morfológicos (tamanho, forma e cor). Aspectos bioquímicos foram analisados por meio da avaliação do metabolismo através da presença de enzimas específicas. As enzimas avaliadas foram aquelas relacionadas ao metabolismo de carboidrato e lipídios. Outro teste efetuado foi o teste da catalase (MOREIRA et al., 2015).

Resultados e discussão

Foram coletadas 18 amostras de fezes de cães doadores, sendo 16,66% do total de

amostras provenientes de cães considerados abaixo do peso ideal (escores 2, 3 e 4), 33,33% do total de amostras foram de cães considerados dentro do peso ideal (escore 5) e 38,88% do total de amostras foram originadas de animais com sobrepeso (escore 6). Ainda, 11,11% do total de amostras fecais foram provenientes de cães considerados obesos (escores 7 e 9). Proporcionalmente, percebeu-se uma maior quantidade de fêmeas com sobrepeso e obesidade em relação aos machos, o que já foi observado em estudo anterior (SHIHO et al., 2016)

Outro fator observado foi que 50% dos cães avaliados a partir de 7 anos de idade (meia-idade) estavam com sobrepeso ou obesidade e os demais (50%) estavam magros ou dentro do escore de condição corporal ideal (5). Esta informação antagoniza com o estudo de Shiho e colaboradores (2016).

Duas amostras (11,11% do total amostrado), submetidas ao mesmo protocolo de crescimento bacteriano que as demais, não apresentaram crescimento em nenhuma das condições testadas. Uma das duas amostras foi proveniente de cão com histórico de *diabetes mellitus* tipo I e com escore 2 (magro). Esta informação corrobora com pesquisas anteriores que relacionaram microbiota intestinal e *diabetes mellitus* tipo I (HU et al., 2015). Segundo Hu e colaboradores (2015), existe uma relação tão íntima entre microbiota intestinal e *diabetes mellitus* tipo I que sugere uma possibilidade de tratar a enfermidade por meio do enriquecimento da microbiota intestinal. O outro animal cuja amostra de fezes não apresentou crescimento bacteriano foi considerado hígido e com escore 6 (sobrepeso), sendo que não se determinou a razão da ausência de crescimento bacteriano.

Para análise das amostras foram utilizados quatro meios de cultivo: ágar *Spirit Blue*, ágar SS, ágar McConkey e ágar *Starch*, além da realização do teste da catalase.

O ágar *Spirit Blue* é utilizado para a detecção e enumeração de microrganismos lipolíticos. Os resultados relacionados a este meio de cultivo ainda estão em processo de análise.

O ágar SS é um meio diferencial seletivo para o isolamento das bactérias patogênicas *Salmonella* e algumas espécies de *Shigella*. Das amostras analisadas, 93,75% cresceram com 100% de colônias cor de rosa, sendo sugestivo de *Escherichia coli* e em uma amostra (A20) houve o crescimento de uma colônia de cor preta, sendo sugestivo de *Salmonella typhimurium*, apesar da condição geral hígida do animal.

O ágar McConkey é um meio destinado para o crescimento de bactérias Gram negativas e para indicar a fermentação de lactose. Em todas as amostras houve o crescimento de colônias rosas (fermentadoras de lactose) com exceção de duas amostras (A5 e A9) que

tiveram o crescimento de colônias rosas e amarelo claro (não fermentadoras de lactose).

Já o ágar Starch é um meio diferencial que testa a capacidade de um organismo para produzir enzimas extracelulares que hidrolisam o amido (α -amilase). O resultado da análise do cultivo bacteriano neste meio demonstrou diferenças significativas ($p < 0,01$) na quantidade de unidades formadoras de colônias (UFCs) amilase positivas em cães com ECC ideal quando comparado com cães com ECC obeso, o que sugere que nos cães com ECC ideal ao chegar o amido não hidrolisado no intestino, as bactérias contribuiriam com a produção de enzimas extracelulares fornecendo substratos para a degradação sequencial pelas enzimas intestinais do animal e absorção da glicose. No caso da presença de um percentual menor de bactérias produtoras de α -amilase, como observado nos animais de ECC obesos, é proposto que a presença de amido não digerido no intestino pode favorecer a fermentação do amido e a glicose formada é metabolizada dando origem à ácidos graxos de cadeia curta, absorvidos pelo hospedeiro e contribuindo para a obesidade do animal.

O último procedimento para análise das amostras foi o teste da catalase. A catalase é uma enzima que converte peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A finalidade do teste é separar os estreptococos (catalase negativa) de outros cocos Gram-positivos produtores de catalase, como os estafilococos. Foi evidente uma tendência de aumento, não significativo do percentual de bactérias catalase negativas em função do aumento do ECC, o que pode ser explicado pelo tamanho da população utilizada neste estudo ser reduzido.

Conclusão

A partir do presente estudo foi possível concluir e confirmar alguns itens já descritos em trabalhos anteriores, um deles é que as fêmeas apresentam uma tendência maior ao sobrepeso e obesidade em relação aos machos, porém, em relação a idade, diferente do que já foi estudado, não houve diferença significativa, apesar do número da amostra ser relativamente pequeno.

Já é sabido através de estudos anteriores que a microbiota intestinal tem uma relação íntima com a *diabetes mellitus* tipo I, o que foi confirmado nesta pesquisa, uma vez que a amostra fecal de um cão com *diabetes mellitus* tipo I não apresentou crescimento bacteriano em nenhuma das condições testadas. Outra amostra, de um cão aparentemente hígido, quando foi submetida ao crescimento em ágar SS, apresentou crescimento de uma colônia preta

sugestiva de *Salmonella typhimurium*, porém, não há evidência de que estes dois casos têm relação com o ECC do animal.

Os resultados obtidos a partir do crescimento das amostras submetidas ao ágar Starch demonstraram que o percentual de bactérias produtoras de α -amilase em cães com ECC ideal foi significativamente maior que o percentual apresentado em amostras de cães obesos.

No decorrer da pesquisa, foi criado um banco de fezes a partir das amostras coletadas que foram congeladas, a fim de dar continuidade ao estudo, podendo ser utilizadas para extração de DNA bacteriano para análises de sequenciamento do gene que codifica para rRNA 16S. Com os resultados obtidos é possível observar a necessidade de estudos mais aprofundados, coletando fezes de vários dias do mesmo animal com o objetivo de gerar resultados mais fidedignos e esclarecer as dúvidas pendentes.

Referências

- HANDL, S.; GERMAN, A.J.; HOLDEN, S.L.; DOWD, S.E.; STEINER, J.M.; HEILMANN, R.M.; GRANT, R.W.; SWANSON, K.S.; SUCHODOLSKI, J.S. Faecal microbiota in lean and obese dogs. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 84, 2013. p.332-343.
- HARTSTRA, A.J.; BOUTER, K.E.C.; BÄCKHED, F.; NIEUWDORP M. Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. **Diabetes care**. 2015.
- HU, C.; WONG, F. S.; WEN, L. Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? **Pharmacological Research**. 2015.
- LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, Santa Barbara, v. 22, n. 3, p. 10-15, 1997.
- MOREIRA, M.A.S.; SILVA JÚNIOR, A.; FERREIRA, H.C.C.; PIERI, F.A.; COSTA, J.C.M.; KALKS, S.P. **Microbiologia veterinária: práticas**. Viçosa: Ed. UFV, 2015, 68p.
- SHIHO, U.; YASUDA, H.; KOKETSU, Y. Characteristics of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinics. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 2016.