

EFFECTO DEL ALOPURINOL SOBRE LA DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LA MOLLEJA Y EL CIEGO EN POLLOS DE CEBO

Ranilla¹, M. J., Arranz¹, J. J., Klandorf², H., Falkenstein, E. y Carro^{1,2} M. D.

¹Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León, España. mjrang@unileon.es. ²Division of Animal and Veterinary Sciences, WVU, Morgantown, WV 26506. USA

INTRODUCCIÓN

El alopurinol es un potente inhibidor de la xantina oxidasa que se utiliza para el tratamiento de la gota en la medicina humana. La xantina oxidasa es la enzima implicada en la oxidación de la xantina e hipoxantina a ácido úrico, por lo que su inhibición en las aves provoca una disminución de la formación de ácido úrico (Klandorf et al., 2001) que, previsiblemente, debería ocasionar una reducción del rendimiento productivo de los animales. Sin embargo, Lee y Fisher (1972) observaron que la administración de alopurinol (0,75 g/kg alimento) a pollos de cebo de un día durante 4 semanas no produjo efectos adversos, observándose únicamente una pequeña reducción del peso vivo. Por el contrario, Klandorf et al. (2001) observaron una reducción significativa del crecimiento de pollos de cebo que recibían alopurinol (10 mg/kg peso vivo). La microbiota gastrointestinal de las aves juega un papel fundamental en su nutrición y crecimiento, pero hasta el momento no existe información sobre el posible efecto directo del alopurinol sobre dicha microbiota. Por ello, en este trabajo se planteó analizar el efecto del alopurinol sobre las comunidades bacterianas de la molleja y el ciego de pollos de cebo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron 15 pollos de cebo de 5 semanas de vida, que se dividieron en tres grupos en función de su peso vivo (PV; $845 \pm 3,1$ g). Uno de los grupos recibió un pienso estándar de cebo (CON) y los otros dos recibieron el mismo pienso suplementado con alopurinol a niveles de 25 (AL25) y 50 mg/kg PV (AL50). Los pollos se pesaron dos veces a la semana y la ingestión de alimento se controló cada dos días. Al final del periodo experimental los pollos se sacrificaron y se tomaron muestras del contenido digestivo de la molleja y del ciego en viales estériles. Las muestras se congelaron inmediatamente y se liofilizaron antes de analizar los perfiles de las comunidades bacterianas de las digestas mediante ARISA (Análisis Automatizado de la Región Espaciadora Intergénica Ribosomal). La extracción de ADN de las digestas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Yu y Morrison (2004), y el ADN extraído se amplificó utilizando los cebadores 16S-1392F y 23S-125R, que amplifican la región ITS1 en el operón rRNA (Danovaro et al., 2006). El cebador 16S-1392F está marcado con 6-FAN. El amplicón se purificó y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Para el ARISA se utilizaron 5 ng de ADN y 0,5 μ L de un estándar interno de tamaño (LIZ1200; Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) en formamida desionizada y desnaturalizados a 94 °C durante 2 minutos, antes de enfriarlos en hielo. La separación de los fragmentos ARISA se realizó en un ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos), utilizando capilares de 40 cm por 50 μ m y polímero POP-4 (Perkim Elmer). Los fragmentos obtenidos se analizaron con el software GeneMarker versión 1.80 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, Estados Unidos). El dendrograma se construyó utilizando el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) a partir de la matriz de porcentaje de similitud. El índice de Shannon se calculó como una estimación de la diversidad de las comunidades bacterianas en las digestas. El efecto del alopurinol sobre el peso vivo de los pollos se analizó según un modelo de medidas repetidas en el tiempo. El efecto del alopurinol sobre el índice de Shannon y el número de filotipos en las digestas de molleja y ciego se evaluó mediante un análisis de varianza factorial 2 x 3 (dos tramos digestivos x 3 dosis de alopurinol). Cuando se observó un efecto significativo ($P < 0,05$) de algún factor, las diferencias entre medias se analizaron mediante el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos por Klandorf et al. (2001), la administración de alopurinol afectó ($P < 0,001$) negativamente al crecimiento de los pollos (Tabla 1). Al final del periodo experimental, la ganancia media diaria de los pollos en los tratamientos AL25 y AL50 representó el 69,3 y 24,6% de la alcanzada por los pollos control, respectivamente.

Tabla 1. Evolución de la ganancia diaria en pollos de cebo que recibían alopurinol a dosis de 0 (CON), 25 (AL25) y 50 (AL50) mg/kg PV durante 5 semanas ($n = 5$)

Tratamiento	Tiempo (semanas)					EEM ¹	Significación estadística (P=)		
	1	2	3	4	5		AL	Tiempo	AL x Tiempo
CON	108,0 ^b	98,0 ^b	110,9 ^b	119,3 ^b	129,4 ^c	6,79	<0,001	0,062	<0,001
AL25	82,5 ^a	81,6 ^b	98,3 ^b	100,6 ^b	89,7 ^b				
AL50	82,1 ^a	66,9 ^a	62,2 ^a	71,4 ^a	31,8 ^a				

^{a, b, c} dentro de cada fila, los valores con diferente superíndice difieren ($P < 0,05$).

¹ error estándar de la media.

Tal y como puede observarse en la Tabla 2, la administración de alopurinol no afectó al índice de Shannon ($P = 0,87$) ni al número de filotipos ($P = 0,90$). De acuerdo con resultados previos (Van der Wielen et al., 2002) tanto el número de filotipos y el índice de Shannon fueron mayores ($P < 0,001$) en el ciego que en la molleja.

Tabla 2. Índice de Shannon y número de picos del ARISA en contenido digestivo de la molleja y ciego de pollos de cebo que recibían alopurinol a dosis de 0 (CON), 25 (AL25) y 50 (AL50) mg/kg PV durante 5 semanas ($n = 5$)

	Tramo digestivo (TD)	Tratamiento			EEM ¹	Significación estadística (P=)		
		CON	AL25	AL50		TD	AL	TD x AL
Índice de Shannon	Molleja	3,39 ^a	3,30 ^a	3,45 ^a	0,113	<0,001	0,87	0,71
	Ciego	3,84 ^b	3,85 ^b	3,81 ^b				
Número de filotipos	Molleja	30,0 ^a	28,6 ^a	33,4 ^a	3,45	<0,001	0,90	0,63
	Ciego	47,0 ^b	47,0 ^b	45,4 ^b				

^{a, b} dentro de cada columna y para cada parámetro, los valores con diferente superíndice difieren ($P < 0,05$).

¹ error estándar de la media.

Se detectaron un total de 92 filotipos de ellos los que 4 se encontraron exclusivamente en la molleja y 17 en el ciego. En los pollos control, 17 de los filotipos se encontraron únicamente en la molleja y 42 exclusivamente en el ciego. En los animales que recibieron alopurinol, 5 se observaron únicamente en la molleja y 16 en el ciego.

La figura 1 representa el dendrograma de los análisis cluster de las comunidades bacterianas del contenido digestivo de la molleja (M) y el ciego (C). Las comunidades bacterianas se dividieron claramente en dos grupos distintos en función del tramo digestivo. En la molleja, las comunidades bacterianas se agruparon en función del tratamiento, de tal forma que las digestas de los pollos que recibían la dieta control se agruparon en un cluster y las de los pollos que recibían alopurinol en otro, sin que se observasen diferencias claras debidas a la dosis de alopurinol. Sin embargo, éste patrón de comportamiento no se observó en el ciego, lo que indicaría que la administración de alopurinol no ejerció un efecto claro sobre las comunidades bacterianas.

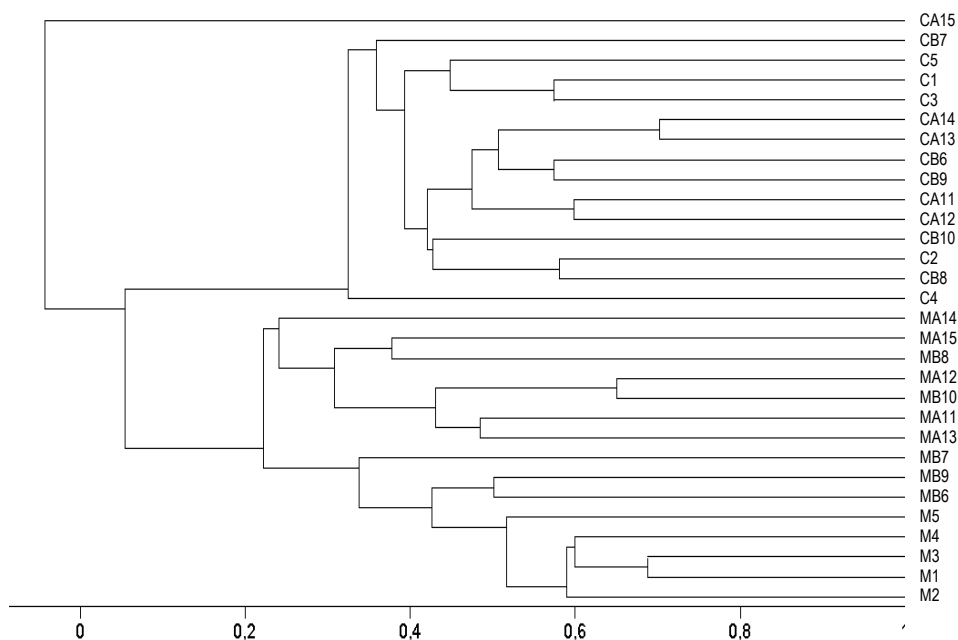


Figura 1. Dendrograma de los ARISA de las digestas de molleja (M) y ciego (C) en pollos que recibían una dieta control o suplementada con allopurinol a dosis de 25 (B) y 50 (A) mg/kg de peso vivo. Los números del 1 al 15 indican muestras de diferentes pollos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Danovaro, R. Luna, G.M., Dell'Anno, A., Pietrangeli, B. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989. • Klandorf, H., Rathore, D.S., Shi, X., Iqbal, M. 2001. *Com. Biochem. Physiol.* 129: 93-104. • Lee, P. C., Fisher, J. R. 1972. *Arch. Biochem. Biophys.* 148: 277-281. • Van der Wielen, Kreuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., van Knapen, F., Biesterveld, S. 2002. *Microb. Ecol.* 44: 286-293. • Yu, Z., Morrison, M. 2004. *Bio. Techniques* 36: 808-812.

Agradecimientos: M.D. Carro disfrutó de una ayuda del MICINN (Programa Nacional de Movilidad de Recursos Humanos de Investigación; PR2008-0025) durante la realización de este trabajo.

EFFECTS OF ALLOPURINOL ON BACTERIAL COMMUNITIES IN THE CROP AND THE CAECUM OF BROILERS

ABSTRACT. The objective of this study was to analyse the effects of feeding two doses of allopurinol (25 and 50 mg/kg body weight) for 5 weeks on the bacterial communities in the crop and caecum of broilers. The DNA was isolated from samples of digesta and the ITS1 region of rDNA operon was amplified by PCR and analyzed by ARISA. At the end of the experimental period, allopurinol reduced ($P < 0.001$) the daily gain of broilers by 30.7 and 75.4% (values for the low and high doses, respectively), but neither the Shannon index nor the number of phylotypes were affected ($P = 0.87$ and 0.90 , respectively). Both the Shannon index and the number of phylotypes were higher ($P < 0.001$) in the caecum compared with the crop. Results of the dendrogram suggest that allopurinol had a direct effect on the bacteria of the crop, and that, even though uric acid production was decreased, had no indirect effects on intestinal bacteria.

Keywords: *allopurinol, crop, caecum, broilers, ARISA*