

USO DE METRONIDAZOL ALTERA A DIGESTIBILIDADE DA DIETA, PERMEABILIDADE, METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO, INDICADORES DE IMUNIDADE E O MICROBIOMA INTESTINAL DE CÃES FILHOTES

LAIANE S. LIMA¹, KARINA S. K. MELOTTO¹, EDUARDA L. FERNANDES¹, RENATA B. M. S. SOUZA¹, LORENNNA N. A. SANTOS¹, HELOÍSA L. SILVA¹, ESTEPHANY T. SANTOS¹, ANANDA P. FÉLIX¹

¹Universidade Federal do Paraná, UFPR, Campus de Ciências Agrárias, Curitiba, PR, Brasil.

Contato: laianesilva@ufpr.br / Apresentador: LAIANE S. LIMA

Resumo: Objetivou-se avaliar o efeito do metronidazol (M) sobre os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da dieta, permeabilidade, metabólitos de fermentação, indicadores de imunidade e microbioma intestinal de cães filhotes. Doze cães Beagles em crescimento (65 ± 14 dias) foram divididos em grupos controle, sem, e teste (M), com administração via oral de metronidazol (15 mg/kg) por 5 dias (n=6/grupo). Os cães foram alimentados com a mesma dieta durante 80 dias. Nos dias 20, 50 e 80 após o uso do metronidazol foram realizadas coletas de fezes e sangue para análises dos CDA, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), IgA e microbioma fecal e concentrações séricas de NFKB e FITC-dextran. O uso de metronidazol reduziu os CDA da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta da dieta e resultou em menor concentração fecal de butirato e maior de AGCR (P<0,05). O grupo metronidazol apresentou maior concentração sérica de NFKB e maior permeabilidade intestinal (P<0,05). Ainda, o uso de metronidazol reduziu a IgA fecal (dias 50 e 80), a diversidade bacteriana e gêneros indicativos de eubiose, como a *Blautia* e *Turicibacter* (P<0,05). Conclui-se que o uso de metronidazol pode afetar negativamente indicativos de saúde intestinal em cães filhotes.

PalavrasChaves: Antibióticos; FITC-dextran; NFKB.

THE USE OF METRONIDAZOLE AFFECTS DIET DIGESTIBILITY, INTESTINAL PERMEABILITY, FERMENTATIVE METABOLITES, IMMUNITY INDICATORS, AND MICROBIOME OF PUPPIES

Abstract: We aimed to evaluate the effects of metronidazole on diet apparent digestibility coefficients (ADC), intestinal fermentative metabolites, permeability, immunity indicators, and microbiome in puppies. Twelve growing Beagle dogs were divided into a control group, without, and a test group (M), with oral administration of metronidazole (15 mg/kg) for 5 days (n=6/group). Dogs were fed the same diet for 80 days. On days 20, 50, and 80, after metronidazole use, feces and blood were collected for analysis of ADC, short-chain (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA), IgA, microbiome, and serum concentrations of NFKB and FITC-dextran. The use of metronidazole reduces the ADC of dry matter, organic matter, and crude protein of the diet and resulted in lower fecal butyrate and higher BCFA concentration (P<0.05). The metronidazole group presented higher serum concentrations of NFKB and intestinal permeability (P<0.05). Besides, the metronidazole use reduced fecal IgA (days 50 and 80), bacterial diversity, and genera that indicate eubioses, such as *Blautia* and *Turicibacter* (P<0.05). In conclusion, the use of metronidazole can negatively affect indicatives of gut health in puppies.

Keywords: Antibiotics; FITC-dextran; NFKB.

Introdução: O intestino desempenha papel crucial na saúde dos cães, pois é responsável pela digestão e absorção de nutrientes, e apresenta funções de proteção contra patógenos (GARRIGUES et al., 2022). Em cães filhotes, a preocupação é maior, pois seu sistema imune está em desenvolvimento e há maior exposição a fatores estressantes. A prescrição de antibióticos, como o metronidazol, é comum no tratamento de diarreia aguda em cães filhotes e apesar de ser efetivo contra infecções, o seu uso deve ser avaliado com cautela, pois pode induzir a queda na diversidade do microbioma (PILLA & SUCHODOLSKI, 2020). Tal alteração pode comprometer o ambiente intestinal, prejudicando as funções imunes do intestino e a produção de metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da administração oral de metronidazol sobre a digestibilidade da dieta, metabólitos de fermentação, permeabilidade, indicadores de imunidade e microbioma intestinal de cães filhotes.

Material e Métodos: O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Foram avaliados dois tratamentos, controle, sem, e teste (M), com administração oral de metronidazol (15 mg/kg de peso) por 5 dias consecutivos (dias -5 a 0). Para isso, foram utilizados 12 cães Beagles em crescimento (8 machos e 4 fêmeas), saudáveis, com peso e idade iniciais de 4,06 ± 0,50 kg e 65 ± 14 dias, distribuídos inteiramente ao acaso (n=6/grupo). Os cães foram alimentados por 80 dias com o mesmo alimento comercial extrusado para cães em crescimento. Entre os dias 75 e 80 foram coletadas fezes de acordo com o método de coleta total de fezes (AAFCO, 2016), para análises de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral e energia bruta (EB) (AOAC, 1995). Nos dias 20, 50 e 80 (após o término da administração de metronidazol) foram coletadas amostras de fezes frescas e sangue. As quantificações de NFKB sérico e IgA fecal foram realizadas por ELISA e os AGCC e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) fecais, por cromatografia gasosa. A permeabilidade intestinal foi analisada por meio do marcador FITC-dextran (VICUÑA et al., 2015). O microbioma fecal foi analisado por sequenciamento do gene 16S rRNA. Os dados de digestibilidade foram analisados pelo teste t-Student (P<0,05). Os dados de metabólitos fecais e sanguíneos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com medidas repetidas no tempo, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). Ainda, foi aplicada a análise discriminante linear (LDA) do tamanho do efeito (LEfSE), com P-ajustado <0,05.

Resultado e Discussão: O uso de metronidazol reduziu (P<0,05) a digestibilidade da MS (73,3 para 70,5%), MO (77,0 para 74,4%) e PB (78,3 para 73,5), sem diferença para o EEA e EB (P>0,05, não apresentado). Ainda, o grupo M apresentou

menor concentração fecal de butirato (8,35 para 7,81 mM/mol) e maior de isobutirato (5,51 para 5,61 mM/mol), isovalerato (5,50 para 5,66 mM/mol) e AGCR totais (11,00 para 11,30 mM/mol), no período total ($P < 0,05$). Os demais metabólitos não diferiram ($P > 0,05$, não apresentado). Esses resultados são coerentes com a menor digestibilidade da PB e aumento da permeabilidade intestinal no grupo M ($P < 0,05$, Tabela 1). O butirato, além de fornecer energia aos colonócitos, estimula a formação de mucina, essencial para a função de barreira intestinal (PILLA & SUCHODOLSKI, 2020). Além disso, o grupo M apresentou maior NFkB sérico e, embora tenha sido observado maior IgA fecal no dia 20, houve redução dessa variável nos dias 50 e 80 nesse grupo ($P < 0,05$, Tabela 1). Isso indica provável aumento de processos inflamatórios no intestino e alteração na resposta imune local. Esses resultados provavelmente ocorreram devido às mudanças no microbioma intestinal causadas pelo metronidazol, como a redução na diversidade ($P < 0,05$, Tabela 1) e na abundância de gêneros considerados indicativos de eubiose, como a *Blautia* e *Turicibacter* e aumento no *Streptococcus* ($P < 0,05$, Figura 1). Resultados semelhantes foram observados em cães adultos saudáveis recebendo metronidazol (PILLA et al., 2020), reforçando que seu uso deve ser ponderado pelo médico veterinário.

Tabela 1. Médias de NF-kB (pg/mL), permeabilidade intestinal (Perm., µg/mL de FITC-dextran), IgA fecal (µg/ml) e índices de diversidade em cães recebendo (M) ou não (C) metronidazol.

Item	Dia 20		Dia 50		Dia 80		EPM	Probabilidades		
	C	M	C	M	C	M		Trat	Dia	TratxDia
NF-kB	177b	211ab	275a	278a	182b	287a	9,5	0,010	0,002	0,063
Perm.	0,507	0,540	0,501	0,627	0,496	0,493	0,011	0,048	0,092	0,115
IgA	161,0b	432,0a	69,1c	22,6d	59,3c	26,3d	42,90	0,172	0,001	0,033
Chao1	341a	192c	223b	192c	249b	209c	21,85	0,001	0,006	0,004
Shannon	4,1a	3,6b	4,0a	3,7b	3,8b	3,8b	0,08	<0,001	0,342	0,003

Trat = tratamentos; EPM: erro padrão da média. ^{a,b,c}Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando $P < 0,05$ apenas para Trat, não foi feita comparação de médias.

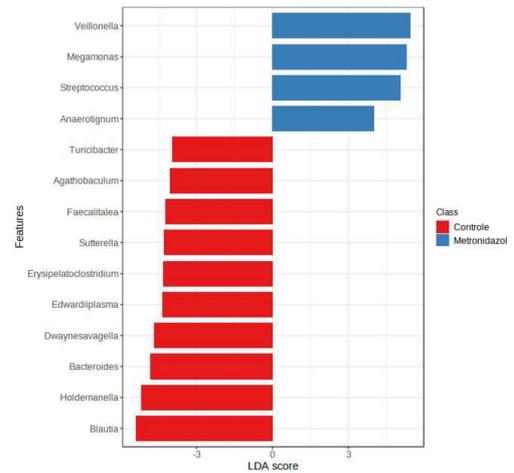


Figura 1. Gêneros bacterianos com maior poder discriminatório entre os grupos controle e metronidazol considerando todo o período (dias 20, 50 e 80). P ajustado < 0,05 pela LEfSe.

Conclusão: A administração oral de 15 mg de metronidazol/kg de peso corporal em cães filhotes saudáveis, durante 5 dias, reduz a digestibilidade da PB dietética. Além disso, aumenta a permeabilidade intestinal e fator de transcrição NFkB, e reduz a concentração de butirato fecal e diversidade microbiana, promovendo alterações indicativas de disbiose.

Agradecimentos: Agradecemos à VB Alimentos pelo suporte ao laboratório.

Referências Bibliográficas: AAFCO. Association of American Feed Control Officials, 2016. Dog and Cat Nutrient Profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporates. AAFCO, Oxford, IN, USA. AOAC. Association of the Official Analytical Chemists, AOAC, 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Washington, D. C., USA. GARRIGUES, Q. et al. Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, set. 2022. PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, Frontiers Media S.A., 14 jan. 2020. PILLA, R. et al. Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 34, p. 1853-1866, 2020. VICUÑA, E A. et al. Dose titration of FITC-D for optimal measurement of enteric inflammation in broiler chicks. *Poultry Science*, v. 94, n.6, p. 1353-1359, jun. 2015.