

## AVALIAÇÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE INGESTÃO DE BETA-GLUCANOS EM VARIÁVEIS DIGESTIVAS, IMUNOLÓGICAS E MICROBIOTA FECAL DE CÃES

**PEDRO H. MARCHI<sup>1</sup>**, THIAGO H. A. VENDRAMINI<sup>1</sup>; RAFAEL V. A. ZAFALON<sup>1</sup>; LEONARDO A. PRÍNCIPE<sup>1</sup>; CINTHIA G. L. CESAR<sup>1</sup>; MARIANA P. PERINI<sup>1</sup>; JULIO C. C. BALIEIRO<sup>1</sup>; MARCIO A. BRUNETTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP, Pirassununga/SP

Contato: pedro.henrique.marchi@usp.br / Apresentador: PEDRO HENRIQUE MARCHI

**Resumo:** Este estudo avaliou os efeitos da inclusão de níveis crescentes de beta-glucanos [(BG); 0,0%; 0,07%; 0,14%; 0,28%] em alimento seco extrusado sobre variáveis digestivas, imunológicas e microbiota de cães adultos saudáveis. Quatro cães border collie e quatro cocker spaniel inglês, machos e fêmeas, com idade de 3,5±0,5 anos e escore de condição corporal ideal foram distribuídos em dois quadrados latinos 4x4 balanceados. Em cada período, 28 dias foram destinados à adaptação às dietas e sete para coletas amostrais. Os dados foram analisados por meio dos procedimentos PROC MIXED, PROC GLIMMIX e Tukey-Kramer (p<0,05). A inclusão de 0,14% de BG resultou em maior relação entre linfócitos T CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>. A diversidade beta microbiana diferiu entre os tratamentos 0,0 e 0,14% de BG. Ademais, foram observadas modulações positivas e negativas em cinco filos, 15 famílias e 25 gêneros após a ingestão das dietas com inclusão de BG. Os principais microrganismos presentes na microbiota canina, descritos na literatura, foram modulados após o consumo de 0,14% de BG. Diante do exposto, conclui-se que a inclusão de 0,14% de BG resultou nas melhores respostas e foi o teor de inclusão ideal.

**PalavrasChaves:** canino, fermentação, microbioma, nutrição, prebiótico

## EVALUATION OF INCREASING LEVELS OF BETA-GLUCANS INTAKE ON DOG DIGESTIBLE, IMMUNITY AND FECAL MICROBIOTA VARIABLES

**Abstract:** This study evaluated the effects of beta-glucans increasing levels inclusion [(BG); 0.0%; 0.07%; 0.14%; 0.28%] in dry extruded diet on digestive, immunity and microbiota variables of healthy adult dogs. Four male and female border collies and four english cocker spaniels, aged 3.5±0.5 years and with ideal body condition score were distributed into two balanced 4x4 latin squares. In each period, 28 days were destined to diet acclimation and seven days to sample collection. Data were analyzed using PROC MIXED, PROC GLIMMIX and Tukey-Kramer procedures (p<0.05). The inclusion of 0.14% BG resulted in a higher ratio of CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Microbial beta diversity differed between the 0.0 and 0.14% BG treatments. Furthermore, positive and negative modulations were observed in five phyla, 15 families and 25 genera after BG inclusion diets ingestion. The main microorganisms present in the canine microbiota, described in the literature, were modulated after the consumption of 0.14% of BG. In light of the foregoing, it is concluded that 0.14% BG inclusion resulted in the best responses and was the optimal inclusion level.

**Keywords:** canine, fermentation, microbiome, nutrition, prebiotic

**Introdução:** Os beta-glucanos obtidos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (BG) têm sido amplamente utilizados na medicina humana. Seus benefícios estendem-se a várias espécies animais, dentre elas mamíferos, peixes e invertebrados. Em cães, a suplementação de BG demonstrou-se benéfica sobre o sistema imunológico, saúde intestinal e produtos fermentativos, metabolismo de glicose e lipídios e modulação de microrganismos importantes presentes no microbioma intestinal canino. No entanto, nenhum estudo avaliou os efeitos da inclusão de teores crescentes deste prebiótico na dieta de cães. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de 0,0, 0,07, 0,14 e 0,28% de BG em alimento seco extrusado sobre variáveis digestivas, imunológicas e microbiota fecal de cães adultos saudáveis e definir a recomendação ideal de inclusão deste ingrediente.

**Material e Métodos:** O estudo foi conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais, sob protocolo número 2866090223. Quatro cães border collie e quatro cocker spaniel inglês, machos e fêmeas, com idade de 3,5±0,5 anos e escore de condição corporal ideal (LAFLAMME, 1997) foram distribuídos aleatoriamente em dois quadrados latinos 4x4 balanceados. Foram formulados e extrusados quatro alimentos experimentais isonutritivos, com inclusão de teores crescentes de beta-glucanos (0,0%; 0,07%; 0,14%; 0,28%). A necessidade energética de manutenção dos cães foi determinada por meio da equação: 95kcal/peso corporal<sup>0,75</sup> (FEDIAF, 2021). Cada período apresentou duração total de 35 dias, os quais foram divididos em 28 dias para adaptação às dietas e sete dias para a coleta de amostras fecais e sanguíneas. Foram determinados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes (AAFCO, 2019), concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, nitrogênio amoniacal, ácido lático, IgA e pH (FERREIRA et al., 2016); imunofenotipagem de linfócitos, intensidade e porcentagem de fagocitose, *burst* oxidativo por meio da leitura em citometria de fluxo e microbiota fecal por Illumina<sup>®</sup>. Em caso de resultados significativos nas análises de variância, utilizou-se o teste de médias Tukey-Kramer. Todas as análises foram realizadas com auxílio dos procedimentos PROC MIXED e PROC GLIMMIX, do programa SAS, versão 9.4. Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

**Resultado e Discussão:** As concentrações fecais dos produtos fermentativos e o pH permaneceram inalterados após o consumo de todos os tratamentos (Tabela 1). Ademais, não foram observadas diferenças nos CDA dos nutrientes avaliados. A porcentagem e intensidade de fagocitose, populações linfocitárias, *burst* oxidativo e concentração de IgA fecal não foram moduladas por nenhum dos tratamentos (Tabela 2). No entanto, a inclusão de 0,14% de BG demonstrou aumento na relação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> (p=0,0368; Figura 1). Este índice é um importante marcador do sistema imunológico e reduções

desta variável já foram documentadas em cães idosos e cães com demodicose generalizadas (BLOUNT et al., 2005; SINGH et al., 2010). O índice de diversidade beta microbiana diferiu entre os tratamentos 0,0 e 0,14% de BG (p=0,047), o que sugere variabilidade taxonômica entre os grupos (KERS et al., 2022). O filo Firmicutes foi o mais abundante em todos os tratamentos e apresentou a maior média após o consumo de 0,14% de BG (Tabela 3), o que é considerado um achado benéfico (SUCHODOLSKI, 2011). As famílias *Erysipelotrichaceae* e *Ruminococcaceae* e os gêneros *Fusobacterium* e *Prevotella*, considerados benéficos por envolvimento na produção de ácidos graxos de cadeia curta e outros metabólitos (HANDL et al., 2011; BERMINGHAM et al., 2017), apresentaram maior abundância após consumo de 0,14% de BG. O filo Proteobacteria é potencialmente patogênico e apresentou menor abundância após o consumo de 0,14% de BG (MUKHOPADHYA et al., 2012).

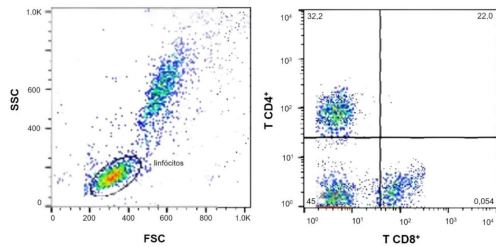


Figura 1. Atividade de proliferação de linfócitos e relação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> observadas nos grupos experimentais

Tabela 1. Produtos fermentativos, ácidos graxos e pH fecal observados no estudo.

Variável	Tratamentos				EPM	p
	0,0%	0,07%	0,14%	0,28%		
<b>Produtos fermentativos</b>						
Nitrogênio amoniacal (mmol/kg MS)	6,97	6,92	7,28	7,13	0,62	0,9576
Ácido lático (mM/kg MS)	4,80	5,41	5,65	5,21	0,72	0,5905
Ácidos graxos totais (mM/kg MS)	54,66	54,18	58,26	56,15	2,40	0,3792
pH fecal	6,68	6,66	6,53	6,59	0,12	0,7406
<b>Ácidos graxos de cadeia curta</b>						
Acetato (mM)	33,13	31,75	32,98	32,91	1,77	0,8785
Propionato (mM)	13,77	14,34	15,64	15,13	1,00	0,1219
Butirato (mM)	6,26	6,58	7,72	6,57	1,00	0,6592
<b>Ácidos graxos de cadeia ramificada</b>						
Valerato (mM)	0,10	0,29	0,18	0,11	0,09	0,4069
Isovalerato (mM)	0,76	0,69	1,00	0,81	0,10	0,0664
Isobutirato (mM)	0,66	0,61	0,76	0,65	0,06	0,1466
Total	1,49	1,52	1,92	1,54	0,18	0,1534

Legenda: EPM = erro padrão da média.

Tabela 2. Variáveis imunológicas observadas no estudo.

Variável	Tratamentos			EPM	p	
	A0	A1	A2			
Fagocitose (%)	68,63	75,25	76,79	78,04	4,15	0,0692
Intensidade de fagocitose	32,85	36,56	30,33	37,80	7,47	0,2546
Burst oxidativo PMA	894,00	809,37	785,62	1029,12	160,39	0,4423
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (%)	37,9	42,49	44,53	42,60	2,45	0,2210
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> (%)	29,81	27,33	23,35	26,23	2,48	0,1237
Relação T CD4 <sup>+</sup> :CD8 <sup>+</sup>	1,33 <sup>b</sup>	1,71 <sup>ab</sup>	1,99 <sup>a</sup>	1,74 <sup>ab</sup>	0,19	<b>0,0368</b>
IgA fecal (µg/mL)	225,091	271,41	242,35	229,73	53,81	0,9254

Legenda: PMA = acetato de forbol miristato; EPM = erro padrão da média; <sup>a,b</sup>Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey-Kramer ajustado pelo PROC MIXED.

Tabela 3. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão das abundâncias relativas dos principais grupos taxonômicos observados nos grupos experimentais.

Taxonomia (%)	Tratamentos				P
	0,0%	0,07%	0,14%	0,28%	
<b>Actinobacteria<sup>1</sup></b>	0,72±0,49 <sup>a</sup>	0,51±0,35 <sup>b</sup>	0,90±0,61 <sup>a</sup>	0,15±0,10 <sup>c</sup>	<0,0001
<b>Bacteroidetes<sup>1</sup></b>	26,38±6,99 <sup>a</sup>	19,75±5,70 <sup>b</sup>	21,30±6,03 <sup>b</sup>	21,73±6,12 <sup>b</sup>	<0,0001
<i>Bacteroides<sup>3</sup></i>	16,17±3,53 <sup>a</sup>	13,77±3,09 <sup>b</sup>	10,99±2,55 <sup>c</sup>	11,76±2,70 <sup>c</sup>	<0,0001
<i>Prevotella<sup>3</sup></i>	4,94±2,12 <sup>b</sup>	3,34±1,46 <sup>c</sup>	7,32±3,06 <sup>c</sup>	7,81±3,25 <sup>a</sup>	<0,0001
<b>Firmicutes<sup>1</sup></b>	34,18±9,16 <sup>c</sup>	46,59±10,13 <sup>b</sup>	58,54±9,88 <sup>a</sup>	45,54±10,10 <sup>b</sup>	<0,0001
<i>Erysipelotrichaceae<sup>2</sup></i>	2,99±1,72 <sup>c</sup>	4,56±2,58 <sup>b</sup>	9,94±5,29 <sup>a</sup>	2,02±1,17 <sup>d</sup>	<0,0001
<i>Turicibacter<sup>2</sup></i>	2,56±0,83 <sup>b</sup>	0,83±0,28 <sup>c</sup>	2,82±0,91 <sup>b</sup>	3,74±1,20 <sup>a</sup>	<0,0001
<i>Lachnospiraceae<sup>2</sup></i>	15,18±4,62 <sup>d</sup>	19,77±5,69 <sup>b</sup>	16,91±5,04 <sup>c</sup>	22,89±6,33 <sup>a</sup>	<0,0001
<i>Blautia<sup>3</sup></i>	8,91±2,49 <sup>b</sup>	10,78±2,96 <sup>c</sup>	8,71±2,44 <sup>c</sup>	11,03±3,02 <sup>a</sup>	<0,0001
<i>Ruminococcaceae<sup>2</sup></i>	5,20±1,11 <sup>c</sup>	5,98±1,27 <sup>b</sup>	9,66±1,97 <sup>a</sup>	6,44±1,36 <sup>b</sup>	<0,0001
<i>Faecalibacterium<sup>3</sup></i>	4,76±1,06 <sup>c</sup>	5,48±1,21 <sup>b</sup>	9,01±1,91 <sup>a</sup>	6,03±1,32 <sup>b</sup>	<0,0001
<b>Fusobacteria<sup>1</sup></b>	32,32±5,76 <sup>a</sup>	23,33±4,72 <sup>b</sup>	14,09±3,19 <sup>c</sup>	23,92±4,80 <sup>b</sup>	<0,0001
<i>Fusobacterium<sup>3</sup></i>	32,33±5,46 <sup>a</sup>	23,18±4,45 <sup>b</sup>	14,09±3,03 <sup>c</sup>	23,94±4,55 <sup>b</sup>	<0,0001
<b>Proteobacteria<sup>1</sup></b>	2,21±1,08 <sup>a</sup>	1,72±0,84 <sup>b</sup>	1,42±0,69 <sup>c</sup>	1,67±0,82 <sup>b</sup>	<0,0001

Legenda: <sup>1</sup>Filos; <sup>2</sup>Famílias; <sup>3</sup>Gêneros; <sup>a,b,c</sup>Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 1% no teste de Tukey-Kramer ajustado pelo PROC GLIMMIX.

**Conclusão:** Conclui-se que a inclusão dos teores testados não altera a digestibilidade dos nutrientes da dieta. Ademais, as modulações observadas sobre a imunidade adaptativa, índice de diversidade beta microbiana, filos, famílias e gêneros bacterianos benéficos permitem afirmar que o tratamento com inclusão de 0,14% de BG resultou na melhor resposta pelos cães e foi o teor de inclusão ideal.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem a Grandfood Indústria e Comércio LTDA (PremieRpet®) e a Biorigin pelo apoio ao estudo e produção de dietas.

**Referências Bibliográficas:** AAFCO. Association of American Feed Control Officials. Washington, DC: Official Publication, 2019. BERMINGHAM, E.N. et al. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. *PeerJ*, v. 5, p. e3019, 2017. BLOUNT, D.G. et al. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 108, p. 399-407, 2005. FEDIAF. The European Pet Food Industry Federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. Bruxelas, BE: The European Pet Food Industry Federation, 2021. FERREIRA, E.M. et al. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. *Animal Feed Science and Technology*, v. 216, p. 30-39, 2016. KERS, J.G.; SACCENTI, E. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 796025, 2022. LAFLAMME, D. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice*, v. 22, p. 10-15, 1997. MUKHOPADHYA, I. et al. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 9, p. 219-230, 2012. SINGH, S.K. et al. Determination of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood of dogs with demodicosis. *Parasitology*, v. 137, p. 1921-1924, 2010. SUCHODOLSKI, J.S. Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, v. 89, p. 1520-1530, 2011.