

REPETIBILIDADE DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE PROBIÓTICO SOBRE METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO E MICROBIOTA INTESTINAL EM CÃES

RENATA B. M. S. SOUZA¹, TAISS S. BASTOS¹; EDUARDA LORENA FERNANDES¹; JULIA SANTOS RODRIGUES¹; HELOÏSE LEGENDRE²; NADÈGE RICHARD²; ACHRAF ADIB LESAUX²; ANANDA P. FÉLIX¹.

¹Universidade Federal do Paraná, UFPR, Campus de Ciências Agrárias, Curitiba, PR, Brasil. ²Phileo by Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France.

Contato: renata.bacila@ufpr.br / Apresentador: RENATA B. M. S. SOUZA

Resumo: Objetivou-se avaliar a repetibilidade dos efeitos da suplementação de probiótico a base de leveduras sobre os metabólitos de fermentação e microbiota intestinal em cães. Foram avaliadas duas dietas: controle, sem, e probiótico, com fornecimento de 0,12 g de probiótico (*Saccharomyces cerevisiae* viável) /animal/dia. As dietas foram ofertadas durante 28 dias para 16 cães Beagles adultos, distribuídos inteiramente ao acaso (n=8). No 28º dia, amostras de fezes foram coletadas para as análises de amônia, pH, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), amins biogênicas, fenóis, indóis e microbiota (Experimento 1). Após 3 meses de *wash out*, o experimento foi repetido (Experimento 2) sob as mesmas condições. A suplementação com probiótico modulou a microbiota intestinal e seus metabólitos, favorecendo a produção de butirato e o aumento de bactérias relacionadas à eubiose, como *Faecalibacterium* e *Turicibacter* (P<0,05). Houve correlação positiva do grupo controle com a concentração de compostos nitrogenados nas fezes e índice de disbiose (P<0,05). Ainda, não houve diferença significativa ao comparar os resultados dos mesmos tratamentos entre os experimentos 1 e 2 (P>0,05), concluindo-se que há repetibilidade dos efeitos do probiótico após um período de 3 meses.

PalavrasChaves: Eubiose, índice de disbiose, levedura, validação

REPEATABILITY OF THE EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF PROBIOTIC ON GUT FERMENTATIVE METABOLITES AND MICROBIOTA IN DOGS

Abstract: The aim of this study was to evaluate the repeatability of the effects of yeast probiotic supplementation on gut fermentative metabolites and microbiota in dogs. Two diets were evaluated: control, without, and test, with the inclusion of 0.12 g of probiotic (viable *Saccharomyces cerevisiae*)/animal/day. The diets were offered for 28 days to 16 adult beagle dogs, distributed in a completely randomized design (n=8). On the 28º day, fecal samples were collected for analysis of ammonia, pH, phenols, indoles, short-chain (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA), total biogenic amines, and microbiota (Trial 1). After 3 months, the experiment was repeated (Trial 2), under the same conditions. The probiotic supplementation modulated the intestinal microbiota and its metabolites, favoring butyrate production and the increase of bacteria related to eubiosis, such as *Faecalibacterium* and *Turicibacter* (P<0.05). The control group showed a positive correlation with the fecal concentration of nitrogenous compounds and dysbiosis index (P<0.05). Additionally, there was no significant difference when comparing the results of the same treatments between Trials 1 and 2 (P>0.05), concluding that there is repeatability of the probiotic's effects after 3 months.

Keywords: Dysbiosis index; eubiosis; validation; yeast

Introdução: Em cães, o uso de probióticos como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pode ser uma estratégia dietética para modular positivamente a microbiota intestinal e seus metabólitos (STERCOVA et al., 2016). No entanto, a maior parte dos estudos que avaliam o efeito de aditivos sobre a funcionalidade intestinal é exploratória, havendo escassez de trabalhos que validaram os resultados posteriormente. Vários fatores podem interferir na repetibilidade do estudo, mesmo que este seja realizado sob as mesmas condições experimentais. Tais fatores incluem variáveis capazes de aumentar o erro experimental, como interferências ambientais, variabilidade biológica individual dos animais e fatores técnicos relacionados ao processamento de amostras e métodos analíticos (KERS et al., 2018; PINNA et al., 2021). Nesse contexto, objetivou-se avaliar a repetibilidade dos efeitos da suplementação dietética de probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre metabólitos de fermentação e microbiota intestinal de cães.

Material e Métodos: Foram avaliadas duas dietas: controle, sem, e probiótico, com fornecimento de 0,12 g de probiótico (1 x 10¹⁰ UFC/g *Saccharomyces cerevisiae*) /animal/dia. Para isso, foram utilizados 16 cães adultos da raça Beagle (11.61 ± 0.12 kg), distribuídos inteiramente ao acaso (n=8/tratamento). A dieta base do experimento foi um alimento completo seco extrusado sem aditivos funcionais, como prebióticos e probióticos, atendendo as recomendações nutricionais para manutenção de cães adultos da FEDIAF (2019). O probiótico foi fornecido por recobrimento da dieta teste. As dietas foram fornecidas por 28 dias. No 28º dia foram coletadas amostras de fezes frescas para análises de pH (medido em pHmetro digital), amônia (Brito et al., 2010), fenóis, indóis, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), amins biogênicas e microbiota (Experimento 1). Após três meses, o experimento foi repetido (Experimento 2), utilizando-se os mesmos métodos, animais, equipamentos e condições. As amins biogênicas foram analisadas por cromatografia líquida. Os fenóis, indóis, AGCC e AGCR foram analisados por cromatografia gasosa. A quantificação dos táxons bacterianos foi realizada por qPCR e o índice de disbiose calculado de acordo com Alshawaqfeh et al. (2017). Para avaliar a relação entre a suplementação do probiótico e as variáveis fecais nos dois experimentos (1 e 2), os dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) utilizando matriz de correlação. A comparação entre os grupos foi feita pela análise de similaridade (ANOSIN), considerando P<0,05.

Resultado e Discussão: Em ambos os experimentos, observou-se que o grupo controle se correlacionou positivamente com

as maiores concentrações fecais de amônia, espermidina, putrescina e aminas biogênicas totais, maior abundância relativa de *Escherichia coli* e maior pH e índice de disbiose ($P < 0,05$, Figura 1). Já, a maior concentração fecal de butirato e maior abundância relativa de *Faecalibacterium*, *Clostridium hiranonis*, *Turcibacter* e *Bifidobacterium* foram correlacionadas positivamente com o grupo probiótico ($P < 0,05$, Figura 1), concordando com STERCOVA et al. (2016). A levedura é capaz de competir por sítios de adesão contra potenciais patógenos, favorecendo o estabelecimento de bactérias relacionadas com a eubiose (VAN DEN ABEELE et al., 2020). Além disso, a levedura é capaz de modular o ambiente intestinal por meio da produção de metabólitos como o butirato. As demais variáveis não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$, não apresentado). A ANOSIN apontou diferença entre os grupos controle e probiótico ($P < 0,05$, Figura 1). No entanto, não houve diferença nos resultados do mesmo tratamento entre os experimentos 1 e 2 ($P > 0,05$, Figura 1), demonstrando que o efeito do probiótico sobre as variáveis analisadas foi consistente entre os experimentos. Apesar da complexidade das interações do trato gastrointestinal e dos erros experimentais não controláveis, foi possível validar os principais resultados do probiótico com a repetição do estudo.

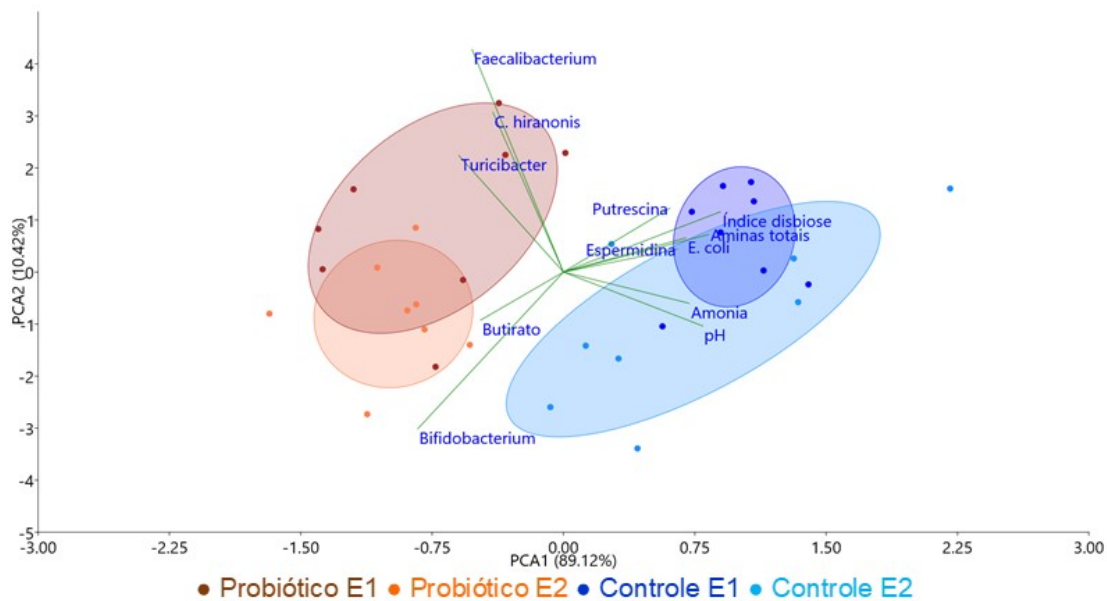


Figura 1. Análise de componentes principais (PCA) das variáveis fecais que se correlacionaram com a suplementação ou não de probiótico a base de leveduras nos experimentos (E) 1 e 2 ($n=8$ /tratamento). Os vetores indicam as variáveis correlacionadas positivamente com cada tratamento ($P < 0,05$). A análise de similaridade (ANOSIN) indicou diferença entre os grupos Controle e Probiótico ($P < 0,05$), mas não entre os resultados do mesmo tratamento entre os experimentos 1 e 2 ($P > 0,05$).

Conclusão: O consumo de 0,12 g do probiótico *Sacharomyces cerevisiae*/animal/dia é capaz de modular a microbiota intestinal e seus metabólitos, favorecendo a eubiose. Além disso, concluímos que há repetibilidade na resposta ao consumo do probiótico, após um período de 3 meses em cães.

Agradecimentos: Agradecimento ao CNPQ pelo apoio financeiro com a bolsa do primeiro autor. Agradecemos a Phileo-Lesaffre pelo apoio à pesquisa.

Referências Bibliográficas: ALSHAWAQFEH, M. K. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 93, n. 11, 1 nov. 2017. DE BRITO, C. B. M. et al. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. *Animal Feed Science and Technology*, v. 159, n. 3–4, p. 150–155, ago. 2010. FEDIAF. The European Pet Food Industry Federation. 2019. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. Bruxelas, Belgian: The European Pet Food Industry Federation. KERS, J. G. et al. Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018. PINNA, C. et al. On the Variability of Microbial Populations and Bacterial Metabolites within the Canine Stool. An in-Depth Analysis. *Animals?: an open access journal from MDPI*, v. 11, n. 1, 18 jan. 2021. STERCOVA, E. et al. Effects of live yeast dietary supplementation on nutrient digestibility and fecal microflora in beagle dogs. *Journal of Animal Science*, v. 94, n. 7, p. 2909–2918, 1 jul. 2016. VAN DEN ABEELE, P. et al. Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. *Journal of Animal Science*, v. 98, n. 6, 1 jun. 2020.