HENRIQUE TOBARO MACEDO

Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após o emagrecimento

Pirassununga

2020

HENRIQUE TOBARO MACEDO

Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após emagrecimento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:
Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:
Nutrição e Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto

Pirassununga

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3914
FMVZ

Macedo, Henrique Tobaro
Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após emagrecimento / Henrique Tobaro Macedo. – 2020.
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto.

1. Canino. 2. Disbiose. 3. Microbioma. 4. Obesidade. 5. Trato gastrointestinal. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

ERRATA

MACEDO, H. T. **Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após emagrecimento**. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Página	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	79 f.	84 f.
ABSTRACT	79 f.	84 f.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após oemagrecimento", protocolada sob o CEUA nº 5604060219 (ID 006342), sob a responsabilidade de **Márcio Antônio Brunetto** *e equipe; Henrique Tobaro Macedo; Thiago Henrique Annibale Vendramini; Matheus Vinícius Macegoza* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 27/03/2019.

We certify that the proposal "Characterization of the fecal microbiota of obese dogs before and after weight loss", utilizing 20 Dogs (males and females), protocol number CEUA 5604060219 (ID 006342), under the responsibility of **Márcio Antônio Brunetto** *and team; Henrique Tobaro Macedo; Thiago Henrique Annibale Vendramini; Matheus Vinícius Macegoza* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/27/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 01/2019 a 10/2020 Área: Clínica Médica Veterinária

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 8 anos	N:	20
Linhagem:	diversas raças ou SRD			Peso:	2 a 60 kg		

Local do experimento: Clínica Veterinária Pet'Stop

São Paulo, 13 de julho de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MACEDO H. T.

Título: **Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após o emagrecimento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

"À minha mãe Lucy (in memoriam), que cuidou de mim até o último instante da sua vida. Sei que de algum lugar, ela olha por mim. Saudade eterna. "

AGRADECIMENTOS

"Quando decidimos por algo verdadeiro e nos sentimos apoiados e amados, é impossível não brotar do nosso rosto um sorriso, expressão de quem sabe que está no lugar certo. "

É com essa certeza em meu coração e com muita alegria que quero agradecer a contribuição incrível, indispensável e totalmente providente de algumas pessoas, sem elas eu não teria chegado até aqui.

Agradeço aos meus pais João e Lucy (in memoriam), pela compreensão, ao serem privados em muitos momentos da minha companhia e atenção e, pelo profundo apoio e esforço, que dedicaram e ainda dedicam a mim. À Fabiana, à Flaviana, ao Hélio e ao Paulo, obrigado pelo carinho, dedicação e ajuda, vossos estímulos são forças nos momentos mais difíceis. Obrigado por me desejarem sempre o melhor. A todos vocês, minha família, sou eternamente grato por tudo que sou, pelo que conquistei e pela felicidade que tenho.

Minha gratidão especial ao Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto, meu orientador. Obrigado por sua dedicação, ensinamentos e por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho.

Um obrigado especial ao Thiago Henrique Annibale Vendramini a quem considero um irmão, e que sempre esteve ao meu lado, sem sua orientação, confiança e amizade, não somente neste trabalho, mas durante todo este tempo, nada disso seria possível.

Manifesto a minha gratidão a todos, funcionários e amigos do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos da FMVZ/USP - CEPEN Pet, em particular à Larissa, Mel, Matheus, Rafael, Roberta, Mariana Perini, Andressa e Jô. Obrigado pelo companheirismo e amizade construída ao longo destes anos de trabalho, a dedicação e esforço de vocês também tornaram possível a concretização deste projeto.

À Premier Pet, pelo auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo e toda confiança depositada em nosso grupo de pesquisa. Além disso, pela construção e manutenção do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos da FMVZ/USP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço à Deus e à Nossa Senhora, por estarem sempre comigo, guiando, iluminando cada passo meu e me abençoando. Obrigada por me darem a fé e a força necessária para lutar e enfrentar todos os desafios, sem nunca desistir.

RESUMO

MACEDO, H. T. **Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após o emagrecimento.** 2020. 79f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A obesidade é considerada na medicina veterinária a afecção nutricional e metabólica mais comum da atualidade. Esta ocorre devido ao acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo, resultado do aumento na ingestão de energia associado a falta de atividade física. A obesidade vem sendo correlacionada com disbiose da microbiota intestinal, bem como em desordens imunológicas, alterações ortopédicas, respiratórias e metabólicas, como resistência insulínica e hiperlipidemia. Estudos demonstraram em ratos geneticamente obesos e induzidos pela dieta, que a microbiota cecal de animais acima do peso apresentam *tags* genéticos ambientais que codificam enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos e no metabolismo de carboidratos simples. Assim, a microbiota de indivíduos obesos pode ser mais eficiente em digerir e metabolizar a energia da dieta que indivíduos magros. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota fecal de cães obesos e em escore corporal ideal e avaliar os efeitos do programa de perda de peso sobre os filos e gêneros bacterianos. Foram incluídos vinte cães, fêmeas, castradas, de diferentes raças, com idade entre 1 a 9 anos. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo experimental de animais obesos (GO), com escore de condição corporal (ECC) 9 e com porcentagem de gordura corporal superior a 30%, determinada pelo método de diluição de isótopos de deutério e um grupo controle (GC), com ECC 4 ou 5 e gordura corporal máxima de 15%. Os animais obesos foram incluídos em um programa de perda de peso e, quando perderam 20% do peso inicial, passaram a compor o grupo de animais emagrecidos (GE). Foram coletadas amostras de fezes dos três grupos experimentais. Nos grupos controle e obesos, a coleta foi realizada após um período de adaptação com dieta de manutenção e, no grupo emagrecido, a coleta de fezes foi realizada no final do programa de perda de peso. Após cada coleta, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C. Na sequência, foi extraído o DNA total das fezes e estas foram sequenciadas pela metodologia Illumina. As abundâncias observadas para cada filo e gênero foram avaliadas por modelo linear generalizado, considerando distribuição binominal e pelo emprego da função de ligação logit. O modelo incluiu efeitos fixos de grupos (Controle, Obesos e Emagrecidos), além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. Todas as análises foram realizadas pelo procedimento PROC GLIMMIX do programa Statistical Analysis System. Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos. Foram identificados 7 filos e 51 gêneros diferentes entre os

3 grupos experimentais. O filo e gênero predominante entre os grupos foi respectivamente o Firmicutes (53,01% - 71,98%) e o *Clostridium* (42,43 – 25,51%). Foi observada diferença entre animais obesos e magros para o filo Firmicutes (P=0,0189) e gênero *Sutturella* (P=0,0095). O programa de perda de peso modulou de forma positiva os filos Actinobacteria (P=0,0128), Firmicutes (P=0,0189) e o gênero *Dorea* (P<,0001) e, negativamente o *Faecalibacterium* (P=0,0114). O presente trabalho verificou que o programa de perda de peso foi capaz de modular os microrganismos do trato gastrointestinal, de forma que, os cães emagrecidos apresentaram composição microbiana com maior biodiversidade, aumento de Actinobacteria, Firmicutes e *Dorea* e menor abundancia de *Faecalibacterium.*

Palavras-chave: Canino. Disbiose. Microbioma. Obesidade. Trato gastrointestinal.

ABSTRACT

MACEDO, H. T. **Characterization of fecal microbiota of obese dogs and after weight loss.** 2020. 79f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Obesity is considered the most common nutritional and metabolic disorder in veterinary medicine today. This occurred to the excessive accumulation of adipose tissue in the organism, due to increase in energy intake with low physical activity. Obesity has been associated with an intestinal microbiota dysbiosis, as well as in immune disorders, orthopedic, respiratory and metabolic changes, such as insulin resistance and hyperlipidemia. Studies have shown in both genetically obese and diet-induced mice that the cecal microbiota from obese animals is enriched with environmental genetic tags that encode enzymes involved in the degradation of polysaccharides and the metabolism of simple carbohydrates. Thus, the microbiota of obese individuals may be more efficient in digesting and metabolizing dietary energy than lean individuals. So, the present study aims to characterize the microbioma profile of obese dogs and to evaluate the effects of weight loss on the population of microorganisms of dogs included in a weight loss program. Twenty dogs, female, neutered, different breeds and 1 to 9 years old were included. The animals were divided into two groups: experimental group of obese animals (GO) with a body condition score (BCS) 9 and body fat percentage greater than 30% determined by the deuterium isotope dilution method and a control group (GC) with BCS 4 or 5 and maximum body fat of 15%. The obese animals were included in a weight loss program and when they lost 20% of their initial weight, they became part of the group of emaciated animals (GE). Stool samples were collected from the three experimental groups. In the control and obese groups, the collection was performed after an adaptation period with a maintenance diet and in the emaciated group, the collection of feces was done at the end of the weight loss program. After each collection, the samples were stored at -80°C. Total DNA was extracted from the feces and sequenced using the Illumina methodology. The abundances observed for each phylum and gender were evaluated using a generalized linear model, considering binomial distribution and using the logit link function. The model includes fixed effects of Groups (Control, Obese and Weight Loss), in addition to the random effects of animals and residue. All as analyzes were performed using PROC GLIMMIX procedure from the Statistical Analysis System Program. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Seven different phyla and 51 different males were identified among the three experimental groups. The most prevalent phylum and genus among the groups was Firmicutes (53.01% - 71.98%) and *Clostridium* (42.43

– 25.51%) respectively. It was observed difference between obese and lean animals for phyla Firmicutes (P = 0.0189) and genus *Sutturella* (P = 0.0095). The weight loss program regulated positively the phyla Actinobacteria (P = 0.0128), Firmicutes (P = 0.0189) and genus *Dorea* (P<.0001), and negatively genus *Faecalibacterium* (P = 0.0114). The present study found that the weight loss program is capable of modulating the microorganisms of the gastrointestinal tract, so that the emaciated dogs presented microbial composition with greater biodiversity, greater presence of Actinobacteria, Firmicutes and *Dorea* and less abundance of *Faecalibacterium*.
Keywords: Canine. Dysbiosis. Gastrointestinal tract. Microbiome. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos experimentais incluídos no estudo. 36
Figura 2. Animais do Grupo obeso (A) e Grupo emagrecido (B). 37
Figura 3. Animais do Grupo controle. 37
Figura 4. Períodos, análises e os procedimentos experimentais que foram realizados. 43
Figura 5. Curvas de emagrecimento dos animais do Grupo Obeso. 46
Figura 6. Taxa de perda de peso semanal dos animais incluídos no estudo. 47
Figura 7. Número de leituras para cada grupo experimental. 50
Figura 8. Árvore filogenética dos microrganismos encontrados nas amostras fecais dos três grupos experimentais. 52
Figura 9. Índice de diversidade filogenética de Faith dos grupos experimentais. 53
Figura 10. Índices de uniformidade de Pielou dos grupos experimentais. 53
Figura 11. Distribuição dos filos e gêneros bacterianos entre os grupos experimentais. 55
Figura 12. Abundância relativa dos filos encontrados nos grupos experimentais. 55
Figura 13. Abundância relativa dos gêneros pertencentes aos filos Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria e Proteobacteria. 57
Figura 14. Abundância relativa dos gêneros pertencentes ao filo Firmicutes. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos principais estudos que avaliaram a microbiota fecal de cães em sobrepeso e obesos. 32
Tabela 2. Composição bromatológica na matéria natural e em ingredientes[1] do alimento controle utilizado no estudo. 39
Tabela 3. Composição bromatológica na matéria natural e em ingredientes[1] do alimento hipocalórico utilizado no estudo. 43
Tabela 4. Caracterização dos cães incluídos no estudo. 44
Tabela 5. Exames bioquímicos dos grupos obeso (GO), controle (GC) e emagrecido (GE). 48
Tabela 6. Peso, escore de condição corporal e composição corporal dos grupos obeso (GO), controle (GC) e emagrecido (GE). 49
Tabela 7. Número de sequencias e OTUs observadas em cada amostra experimental. 50
Tabela 8. Abundância relativa de filo, família e gênero bacteriano encontrados nos grupos experimentais. 59

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Valores de eritrogramas encontrados nos grupos experimentais no início do estudo. 83
Apêndice 2. Valores de leucogramas encontrados nos grupos experimentais no início do estudo. 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
CEPEN Pet	Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EMM	Escore de massa muscular
FA	Fosfatase alcalina
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GO	Grupo de animais obesos
GE	Grupo de animais emagrecidos
GC	Grupo de animais controle
IMC	Índice de massa corporal
LPS	Lipopolissacarídeos
NEPP	Necessidade energética para perda de peso
NEM	Necessidade energética de manutenção
NGS	*Next generation sequencing*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso meta
qRT-PCR	*Transcription polymerase chain reaction quantitative real time*
RNA	Ácido ribonucleico
TGI	Trato gastrointestinal
TPPS	Taxa de perda de peso semanal
USP	Universidade de São Paulo
VNP	Departamento de Nutrição e Produção Animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **22**
2 REVISÃO DE LITERATURA **23**
2.1. Obesidade 23
2.1.1. Definição e prevalência 23
2.1.2. Causas e consequências 24
2.1.3. Diagnóstico e tratamento 25
2.2. Microbiota intestinal 27
2.2.1. Definições e função 27
2.2.2. *Técnicas de avaliação da microbiota intestinal* 28
2.2.3. Disbiose 29
2.2.4. Obesidade versus microbiota fecal 33
3 HIPÓTESE **34**
4 OBJETIVOS **35**
4.1. Principal 35
4.2. Secundário 35
5 MATERIAL E MÉTODOS **35**
5.1. Local, instalações e animais 35
5.2. Triagem dos animais 37
5.3. Hemograma e perfil bioquímico 38
5.4. Período de padronização à dieta 39
5.5. Composição corporal 40
5.6. Avaliação da microbiota fecal 40
5.6.1. Coleta de fezes 40
5.6.2. Extração do material genético 41
5.6.3. Amplificação da região 16S – V4 41
5.6.4. Purificação e quantificação da biblioteca 41
5.6.5. Bioinformática 42
5.7. Protocolo de emagrecimento dos cães 42
5.8. Análise estatística 44
6 RESULTADOS **44**
6.1. Animais 44
6.2. Eritrogramas e leucogramas 45

6.3. Programas de perda de peso 45
6.4. Exames bioquímicos 47
6.5. Composição corporal 48
6.6. Caracterização da comunidade bacteriana por Miseq Illumina 49
6.7. Taxonomia 51
7. DISCUSSÃO 60
8 CONCLUSÕES 69
9 REFERÊNCIAS 70

1 INTRODUÇÃO

Os cães são muitas vezes referidos como melhores amigos dos seres humanos e oferecem companheirismo, consolo e até trabalho. Atrelada a esta relação, a convivência entre pessoas e seus animais de companhia tem promovido, em variados graus, o compartilhamento do ambiente e estilo de vida. Dessa forma, este contato é acompanhado de grandes implicações à saúde e bem-estar dos animais e, dentre as consequências que seguem essa aproximação, talvez, a principal delas seja a alta frequência de cães obesos.

Em todo o planeta, a obesidade em animais de estimação acompanha a tendência humana e tem aumentado. Fatores como elevada quantidade de alimentos palatáveis, calóricos e de baixo custo, aliados aos hábitos sedentários, são considerados pontos desencadeantes desta epidemia. Na medicina veterinária, a obesidade é considerada a afecção nutricional e metabólica mais frequente em cães e gatos.

Estudos recentes que abordaram a obesidade verificaram uma complexa rede de fatores que favorecem o ganho de peso e o desenvolvimento de resistência insulínica, os quais incluem dieta, genes, ambiente e, mais recentemente, a microbiota intestinal. Além disso, as altas taxas de obesidade observadas tornam improváveis que haja uma única causa (ex: genética) para esta afecção. Similar aos humanos, a microbiota intestinal dos animais de estimação é considerada como fator influenciador da homeostase, saúde e diversas doenças. O trato gastrintestinal possui fundamental papel na digestão e sistema imune, dessa forma, a microbiota e seus metabólitos podem influenciar na saúde dos animais de estimação, bem como de seus tutores e pessoas com as quais têm contato. Estudos têm demonstrado a relevância/importância de se conhecer a microbiota intestinal na saúde de cães, no entanto, existem poucas informações na literatura sobre o perfil da microbiota intestinal em cães obesos e os possíveis efeitos do emagrecimento, objetivo da presente proposta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obesidade

2.1.1. Definição e prevalência

A obesidade, definida como o acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo (BURKHOLDER et al., 2000), resulta de prolongado desbalanço entre o aumento relativo do consumo de energia sobre a diminuição do gasto energético que, frequentemente vem associado a baixa atividade física (KOPELMAN, 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018) completa a definição como o conjunto de alterações que podem prejudicar o bem-estar e a vida saudável. Ainda, quando se refere a animais de companhia, segundo Laflamme (2012), consiste em uma síndrome clínica resultante do excesso de gordura corporal, suficiente para comprometer a saúde e as funções de diferentes órgãos e sistemas.

De acordo com dados da OMS (2018), o número de pessoas nessa condição praticamente triplicou desde 1975 e, estima-se 1,9 bilhões de indivíduos acima do peso e 650 milhões obesos. Nos dias atuais, tornou-se o maior problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, de forma que são reportadas, aproximadamente 2,8 milhões de mortes como resultado do sobrepeso e obesidade (AHIRWAR, 2019). Segundo German (2006), assim como a tendência observada em humanos, a obesidade é uma preocupação crescente em animais de companhia.

Diversos autores descreveram alta frequência de animais obesos e em sobrepeso. Destaca-se o trabalho realizado por Gossellin et al. (2007) que, em estudo sobre a incidência desta doença, descreveram variação entre 20 a 40% nos cães da população estudada. Em 2005, na Austrália, foi relatado por Mcgreevy et al. (2005) a frequência de 41% de animais em sobrepeso. Enquanto isso, na França, estudos tem demonstrado prevalência de 39% de obesidade canina (COLLIARD et al., 2006) e no Reino Unido aproximadamente 50% (HOLMES et al., 2007). Lund et al. (2005) avaliaram 21.754 cães nos Estados Unidos e encontraram frequência de 29% de animais em estado de sobrepeso e 5,1% obesos. Na China, ao avaliarem 2.391 animais, os autores observaram a frequência de 44% de cães obesos (MAO et al., 2013). Ainda na Ásia, Usui et al. (2016) demonstraram que, no Japão - 15,1% dos animais avaliados estavam em sobrepeso e 39,8% obesos. Em estudo recente na Espanha, a prevalência de cães obesos chegou a 40,9% (MONTOYA-ALONSO et al., 2017). No Brasil, dados do nosso grupo de pesquisa

indicaram frequência de 41,0% de sobrepeso e obesidade em cães, na cidade de São Paulo - SP (PORSANI et al., 2019).

2.1.2. Causas e consequências

A fisiopatologia da obesidade é complexa e não está completamente elucidada. Pode ser entendida como uma matriz de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais que interagem entre si e atuam em diversos mediadores fisiológicos da ingestão alimentar e energética, culminando na deposição de gordura corporal (GONZALEZ-MUNIESA et al., 2017). Em animais de companhia, embora estes fatores também estejam envolvidos (MCCRORY et al., 2000; LUND et al., 2005; LAFLAMME, 2012), o desbalanceamento nutricional tem sido a sua causa mais comum (TOLL et al., 2010) e está relacionada principalmente ao prolongado desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, o que resulta em balanço energético positivo e crônico (ZORAN, 2010; OSTO & LUTZ, 2015).

Nas últimas décadas, o conhecimento científico acumulado mudou a percepção do tecido adiposo visto até então como uma estrutura inerte e armazenadora de energia, para um importante órgão endócrino que desempenha papel vital em várias atividades fisiológicas, que incluem crescimento, metabolismo, ritmos biológicos e imunidade (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; BALISTRERI et al., 2010). O aumento dos depósitos corporais de gordura foi relacionado com profundas alterações de metabolismo, que refletem nas funções fisiológicas (GAYET et al., 2004; TRAYHURN, 2005; GERMAN et al., 2010; BRUNETTO et al., 2011b). Alterações estas que são base para o aumento do risco de doenças e redução da expectativa de vida em cães, gatos e seres humanos.

O excesso de peso corporal implica em inúmeros efeitos negativos à saúde dos animais de companhia, além de ser fator de risco para diversas enfermidades, como alterações ortopédicas (BROWN et al., 1996; KEALY et al., 1997; KEALY et al., 2000), cardiovasculares (EDNEY & SMITH, 1986; ROCHA et al., 2007; PEREIRA-NETO et al., 2010; PEREIRA-NETO et al., 2014; PIANTEDOSI et al., 2016; TROPF et al., 2017), respiratórias (HENDRICKS, 1992; GERMAN, 2006; BACH et al., 2007; DEVITO et al., 2015; PEREIRA-NETO et al., 2018) e desordens metabólicas, como resistência insulínica (BRUNETTO et al., 2011b) e hiperlipidemia (CHIKAMUNE et al., 1995; JEUSETTE et al., 2005; BRUNETTO et al., 2011a), assim como desordens imunológicas (VENDRAMINI, 2019). Quando associadas, estas afecções podem levar a redução da longevidade (KEALY et al., 2002).

2.1.3. Diagnóstico e tratamento

Na rotina clínica de avaliação nutricional, as técnicas mais simples e com menor custo são as mais utilizadas, no entanto, a diversidade de raças e tamanhos de cães torna o diagnóstico da obesidade uma tarefa difícil. Diversas estratégias de avaliação já foram criadas, uma vez que, analisar somente o peso corporal resulta em uma avaliação subjetiva.

Dentre as técnicas de avaliação, destaca-se o escore de condição corporal (ECC), que fornece uma boa relação com a composição corporal por meio de um sistema de pontuação. Trata-se de uma técnica subjetiva, mas de boa precisão, baixo custo e prática. Vários sistemas foram sugeridos, sendo a escala de 9 (nove) pontos, a mais aceita. O sistema é visual e tátil e, tem por objetivo buscar características que se correlacionam (gordura subcutânea, gordura abdominal e musculatura superficial), por meio de avaliação da caixa torácica, processos espinhosos dorsais e cintura (LAFLAMME, 1997a). Para validar e comprovar a boa precisão da utilização da escala de ECC, German (2006) constatou boa correlação entre o escore de condição corporal e a composição corporal dos animais, também avaliados por técnicas de maior precisão, consideradas padrão-ouro. Outras metodologias de pesquisa em potencial para avaliação da composição corporal incluem análise química, densitometria, utilização de isótopos estáveis, ultrassonografia, condutância elétrica, tomografia computadorizada e ressonância magnética (GERMAN, 2006).

A definição exata do grau de obesidade envolve a determinação da composição corporal do animal. O conceito mais importante é a relação entre a composição de massa gorda (tecido adiposo) e massa corporal magra (BURKHOLDER, 2001). Desta forma, a metodologia de diluição de isótopos de deutério é uma técnica considerada padrão-ouro em medicina e medicina veterinária porque permite a determinação precisa do volume de água corporal e, como a água mantém relação relativamente estável com a massa magra, seu cálculo é preciso e por consequência, pode-se determinar o conteúdo de massa gorda do indivíduo (FERRIER et al., 2002).

Devido à alta prevalência de animais com sobrepeso e aos riscos à saúde associados ao excesso de gordura corporal, a prevenção pode impactar de forma positiva na saúde dos animais de estimação. O momento adequado para o controle e a intervenção do peso é antes do seu ganho e do desenvolvimento subsequente da doença clínica (BROOKS et al., 2014). Estes mesmos autores recomendaram que a manutenção do peso saudável deve começar com a visita ao veterinário; bem como com atividade física; atenção às alterações na condição corporal especialmente após a castração; utilização de alimentos alternativos no treinamento

comportamental e orientação dos tutores quanto às recomendações diárias de consumo apresentadas nos rótulos de alimentos comerciais, bem como, o fornecimento adequado da quantidade de alimento por meio de pesagem ou potes de medidas.

Uma vez desenvolvida e diagnosticada a obesidade, deve-se iniciar um programa de perda de peso com a estimativa do peso ideal ou peso meta (PM) do cão. Este passo ajuda a determinar a necessidade energética de ingestão e estabelece um objetivo motivador (BROOKS et al., 2014). Para tal, recomenda-se a avaliação do escore de condição corporal. Sugere-se que cães com ECC 7, tenham redução de 15% no peso corporal, ou seja, o peso atual multiplicado pela constante 0,85; já para cães com ECC 8 ou 9, a redução deve ser de 20% ou o peso atual multiplicado pela constante 0,8 (CARCIOFI et al., 2005; BRUNETTO et al., 2011b; PEREIRA-NETO et al., 2018).

Após a determinação do peso meta do animal, a principal estratégia para o emagrecimento fundamenta-se na promoção do balanço energético negativo, por meio de uma estimativa energética para perda de peso. O balanço energético negativo é baseado na redução das calorias consumidas pelos animais, associada ou não ao aumento do gasto energético. Desta forma, para obtenção da energia necessária, o animal mobiliza seus estoques orgânicos de gordura com a mínima perda de tecido muscular (NRC, 2006).

O cálculo da necessidade energética para perda de peso (NEPP) é dado pela equação: NEPP = 70 x $(PM)^{0,75}$ = Kcal /dia; e o da quantidade diária de alimento (g) resulta da divisão entre a NEPP e a energia metabolizável do alimento (Kcal/g).

As dietas coadjuvantes para perda de peso são formuladas para apresentar maior teor proteico e, maior inclusão de vitaminas e minerais / kcal de energia metabolizável do que os alimentos de manutenção, o que garante adequada ingestão de nutrientes durante a restrição energética. Alta proteína pode preservar a massa muscular durante a perda de peso e melhorar a saciedade (WEBER et al., 2007). Os efeitos do envelhecimento na digestibilidade da proteína em cães não estão totalmente compreendidos e, animais de estimação geriátricos podem demandar monitoramento mais próximo da ingestão proteica durante a perda de peso (HUTCHINSON et al., 2011). Além disso, estes alimentos por serem hipocalóricos, devem apresentar menores teores de gordura e/ou maior em umidade para diminuir a densidade calórica. As fibras também resultam na redução da densidade energética do alimento e auxiliam no controle da glicemia e lipidemia, retardam a absorção dos nutrientes e podem aumentar a sensação de saciedade durante o regime (NRC, 2006). Dessa forma, essas características na prática resultam em quantidade maior de alimentos fornecida aos cães.

Associado à restrição energética e à recomendação de um alimento hipocalórico, a prática de atividade física controlada pode apresentar diversos benefícios, dentre eles, destaca-se a perda de peso corporal. Robertson (2003) demonstrou que o risco de desenvolvimento da obesidade diminui à medida que se aumenta a atividade física. Além disso, Vitger et al. (2016) demonstraram em seu estudo importante correlação entre atividade física, restrição energética e manutenção de massa magra, fator importante para animais em emagrecimento. Em estudo realizado com vinte e dois cães obesos foi demonstrado que a restrição energética associada a prática moderada e regular de atividade física promoveu melhora da sensibilidade insulínica e aumento da capacidade oxidativa total dos cães, o que resultou em benefícios para a saúde dos animais (SILVA, 2017).

Por fim, o acompanhamento dos animais é fundamental para o sucesso do emagrecimento. Recomenda-se que os animais sejam reavaliados a cada 15 dias, além de se estabelecer taxa de perda de peso semanal adequada, que em cães o desejável é entre 1 a 2% do peso corporal (BROOKS et al., 2014).

2.2. Microbiota intestinal

2.2.1. Definições e função

O termo microbiota é definido como um grupo de microrganismos vivos presentes num determinado habitat e, quando este ambiente é o trato gastrointestinal, denomina-se microbiota intestinal (SUCHODOLSKI, 2017). De forma específica, refere-se a taxa microbiana associada a um ecossistema e identificada através de técnicas moleculares como o sequenciamento de RNA ribossomal 16s (rRNA). Quando nos referimos ao habitat como um todo, incluindo fatores bióticos e abióticos, hospedeiro, genoma microbiano e condições ambientais, caracterizamos o microbioma (WHITESIDE et al., 2015). Além disso, as mudanças no perfil dos microrganismos que compõe a microbiota intestinal podem ser definidas como disbiose e podem estar relacionadas às desordens do trato gastrintestinal e, também, de outros órgãos (SUCHODOLSKI, 2016).

Estima-se que o trato gastrintestinal de mamíferos abrigue complexa comunidade constituída de trilhões de microrganismos, cuja soma total de bactérias pode chegar a um valor cerca de 10 vezes maior do que o número de células que compõem os tecidos e órgãos do hospedeiro (SUCHODOLSKI, 2017). Dentre esta coleção de microrganismos, está uma variedade de archeas, bactérias, fungos, protozoários e vírus (TURNBAUGH et al., 2007;

SUCHODOLSKI, 2011; SHREINER et al., 2015). Estudos em humanos e animais modelo revelaram que a estreita relação entre o microbioma intestinal e o hospedeiro desempenham papel vital no metabolismo e imunidade (TIZARD et al., 2018), desenvolvimento do sistema nervoso (ZEISEL, 2004; CHANG et al, 2009), absorção de nutrientes (SONNENBURG, 2005) e prevenção contra colonização por patógenos (NRC, 2006; FUKUDA, 2011).

As funções da microbiota intestinal derivam, principalmente, das interações microbiota-hospedeiro geradas a partir dos produtos finais de fermentação dos nutrientes. Em mamíferos, a fermentação de fibras complexas obtidas através da dieta (por exemplo, amido, celulose, pectina) são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Estes, são parcialmente absorvidos e servem como fonte de energia para o hospedeiro (por exemplo, butirato, propionato e acetato), regulam a motilidade intestinal e, também, são usados como importantes fatores de crescimento para as células epiteliais intestinais. Além disso, os AGCC servem de estímulo importante para a manutenção da função da barreira intestinal, de maneira a minimizar a translocação bacteriana (RONDEAU et al., 2003) e atuar na regulação imunológica por ativação de células T regulatórias no intestino (ARPAIA et al., 2013).

Com o advento das avaliações metabolômicas, diversos metabólitos que são produzidos pela microbiota intestinal ganharam destaque, como por exemplo o indol, um subproduto da degradação do triptofano, que é anti-inflamatório e aumenta a função da barreira intestinal (BANSAL et al., 2010). Ao mesmo tempo, evidências indicaram que o metabolismo bacteriano e a estimulação imunológica no intestino vão além do trato gastrintestinal e, que existe conexões entre o cérebro e o intestino, moduladas pelos microrganismos intestinais (SUCHODOLSKI, 2017).

2.2.2. *Técnicas de avaliação da microbiota intestinal*

Até décadas atrás, a cultura bacteriana era a técnica mais comumente utilizada para identificar bactérias no trato gastrointestinal de mamíferos (ECKBURG et al., 2005). Esta ferramenta é um método de avaliação útil na determinação de infecções ativas de patógenos conhecidos (por exemplo, Salmonella e Campylobacter) e testes de sensibilidade a antibióticos em amostras clínicas. No entanto, existem várias limitações associadas à cultura bacteriana de amostras intestinais.

A cultura bacteriana subestima amplamente o número total de bactérias nos intestinos, uma vez que, a maioria das bactérias intestinais não pode ser isolada em meios laboratoriais utilizados na rotina, pela falta de informações sobre suas necessidades ideais de crescimento. A

maioria dos microrganismos intestinais são anaeróbios facultativos estritos, o que impede seu isolamento *in vitro*. Estima-se que menos de 10% das bactérias intestinais podem ser cultivadas em meios de rotina (ECKBURG et al., 2005) e apenas uma pequena fração pode ser corretamente classificada por meio de critérios morfológicos e bioquímicos clássicos. Dessa forma, a avaliação de amostras fecais através de cultura aponta resultados de uma pequena porção da microbiota intestinal e fecal.

Os recentes avanços das ferramentas moleculares, em especial as tecnologias de sequenciamento de última geração (NGS, em inglês, *next generation sequencing*) que permitem amplificar, sequenciar e identificar quais táxons (unidade taxonômica) bacterianos estão presentes em uma amostra, revolucionaram a compreensão sobre a microbiota intestinal de mamíferos e, sobretudo, com menor custo (TURNBAUGH et al., 2007; KNIGHT et al., 2017).

O princípio está na extração do ácido desoxirribonucleico (DNA, em inglês, *desoxyribonucleic acid*) de amostras intestinais e amplificação dos genes RNA ribossomal 16S (rRNA) por meio de primers bacterianos universais. Em teoria, esta estratégia permite amplificar o DNA de todas as espécies bacterianas conhecidas e desconhecidas contidas em uma amostra. Para identificar os filotipos presentes na amostra, os amplicons da PCR (fragmentos de DNA ou RNA resultado da amplificação ou replicação) podem ser sequenciados por plataformas de sequenciamento de alto rendimento (HANDL, 2011), por exemplo, o Illumina. Essas plataformas permitem a análise de milhares de sequências em poucas horas e assim, a identificação detalhada da microbiota intestinal.

2.2.3. Disbiose

Barko et al. (2018) definiram disbiose como as alterações do microbioma associadas a doenças ou condições que alteram a homeostasia do ecossistema intestinal. Os mesmos autores complementaram ainda que a disbiose geralmente é caracterizada pela diminuição da diversidade de espécies, mudanças no ambiente inflamatório intestinal e sistêmico e relações metabólicas alteradas entre os microrganismos e hospedeiro. Sob outra perspectiva, quando se trata de disbiose, há mudança de composição e/ou de variedade de espécies da microbiota, ou seja, ocorre alteração no perfil dos microrganismos que compõem a microbiota intestinal e, além disso, pode estar relacionada às desordens do TGI e também de outros órgãos (SUCHODOLSKI, 2016). Para Petersen e Round (2014), a disbiose pode ser categorizada em três tipos, estes podendo ou não serem exclusivos: perda dos microrganismos benéficos, crescimento de microrganismos patogênicos e perda da diversidade microbiana.

As células microbianas e do hospedeiro compõem um organismo híbrido multiespecífico que atua de forma dinâmica e simbiótica em termos de composição celular, diversidade genética e capacidade metabólica (BARKO, 2018). A partir disso, Suchodolski (2016) descreveu que o processo da doença pode estar associado a alterações na função da microbiota (por exemplo, produção reduzida de ácidos graxos de cadeia curta e de outros metabolitos e conjunto de enzimas bacterianas alteradas) ao invés de alterações na composição da microbiota. Essas alterações funcionais ou imunológicas não são prontamente detectadas, pois a avaliação de toda a microbiota e suas funções ainda não é possível. Ademais, alguns autores observaram variação na microbiota ao longo do trato gastrintestinal e, também, diferenças claras entre a microbiota da mucosa e do lúmen (SUCHODOLSKI et al., 2005; MANCHESTER et al., 2013). Além disso, a avaliação de forma adequada de todas as interações entre a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro é bastante complexa (KATHRANI et al., 2012). Suchodolsky (2016) relatou que os fatores que desempenham papel crucial na complexa comunicação entre as bactérias e o sistema imunológico do hospedeiro são ainda pouco conhecidos, além disso, a avaliação bruta das alterações bacterianas em amostras intestinais na maioria das vezes não revela todo o processo da doença e, concluiu que além da evolução realizada na caracterização da disbiose intestinal em doenças gastrintestinais, a metabolômica também forneceu informações sobre as consequências funcionais da disbiose e seu papel na fisiopatologia de alguns distúrbios do TGI em humanos (DUBOC et al., 2013) e cães (HONNEFFER et al., 2015).

Certas bactérias que colonizam o TGI tendem a se aderir à superfície da mucosa intestinal, enquanto outras habitam o lúmen (GIL-CARDOSO et al., 2016). Ao mesmo tempo que as bactérias da superfície da mucosa interagem com o sistema imune do hospedeiro, os microrganismos que residem no lúmen podem estar mais envolvidos em interações metabólicas com alimentos ou outros derivados da digestão (QUIGLEY, 2013), os quais podem afetar tanto a absorção e metabolismo dos nutrientes quanto as funções tróficas e protetoras do hospedeiro; e, dessa forma, as alterações no equilíbrio desta microbiota podem ocasionar o desenvolvimento de múltiplas desordens e doenças (LEE & HASE, 2014).

Estudos em seres humanos têm associado a disbiose intestinal com distúrbios gastrintestinais, como doença inflamatória intestinal (DUBOC et al., 2013) e doença de Crohn (SHEN et al., 2017), além de outras enfermidades como obesidade (TURNBAUGH et al., 2006), diabetes (LARSEN et al., 2010; BROWN et al., 2011), asma (ARRIETA et al., 2014), alergias (ROUND et al., 2009) e autismo (ROSENFELD, 2015). Em medicina veterinária, as alterações associadas ao desequilíbrio da microbiota intestinal já foram observadas em cães

com diarreia aguda canina (BELL et al., 2008), meningoencefalite de origem desconhecida (JEFFERY et al., 2017), insuficiência pancreática exócrina (ISAIAH et al., 2017), doença inflamatória intestinal (MINAMOTO et al., 2015; HONNEFFER et al., 2015) e obesidade (HANDL, 2013). Na tabela 1, estão apresentados os principais estudos que avaliaram a microbiota fecal canina e os respectivos métodos utilizados na identificação dos microrganismos.

Para entender a dinâmica entre microbiota saudável e não saudável, já foram observados diversos fatores endógenos e exógenos que influenciaram no perfil microbiano, tais como: genótipo do hospedeiro (BENSON et al., 2010), idade (YATSUNENKO et al., 2012) e sexo (BOLNICK et al., 2014), no entanto, apesar da relação entre todos estes aspectos, os autores apontaram que a dieta é o fator que apresenta maior impacto na microbiota intestinal (XU e KNIGHT, 2015).

Embora não esteja claro se a disbiose é causa ou efeito da doença gastrintestinal, é provável que haja sobreposição, pois a inflamação está envolvida na gênese da disbiose. Além disso, estudos funcionais recentes demonstraram que a disbiose, quando presente, é um fator de risco que pode exacerbar a inflamação em indivíduos geneticamente suscetíveis. Sendo assim, o restabelecimento da eubiose deve ser um resultado desejado do tratamento. No entanto, pesquisas para melhor definir o perfil de disbiose em cães associada a diferentes doenças estão em andamento (SUCHODOLSKI, 2016; FORSTER et al., 2018; MINAMOTO et al., 2019 GIARETTA et al., 2020).

Tabela 1. Resumo dos principais estudos que avaliaram a microbiota fecal de cães em sobrepeso e obesos.

Ano	Autor	Número de animais	Condição	Amostra	Método de identificação	Principais resultados
2013	HANDL et al.	43	Cães magros e obesos (I* e N*)	Fezes	RT-PCR quantitativo e Pirosequenciamento do gene 16S rRNA	Firmicutes, Fusobacteria e Actinobacteria foram os filos bacterianos predominantes. O filo Actinobacteria e o gênero Roseburia foram mais abundantes em cães obesos
2015	PARK et al.	12	Cães magros e obesos (I)	Fezes	Sequenciador de genoma FLX Plus	O filo Firmicutes foi o grupo predominante na microbiota fecal de cães magros. No entanto, as bactérias do filo Proteobacteria (76%) foram o grupo predominante na microbiota fecal de cães no grupo obeso
2017	KIELER et al.	18	Cães obesos e após o emagrecimento (N)	Fezes	MiSeq sequenciador Illumina	Os cães apresentaram predomínio dos gêneros Fusobacterium (~20–50%) e Bacteroides (~15–35%). Diferença foi observada em três gêneros: Suterella, Fusobacterium e Megamonas entre as semanas 0, 6 e 12
2018	FORSTER et al.	66	Cães magros, em sobrepeso e obesos (N)	Fezes	MiSeq sequenciador Illumina	Os cães em condição corporal ideal apresentaram maior abundância relativa do gênero Eubacterium e menor abundância relativa da família Bifidobacteriaceae em comparação aos cães obesos
2018	ALEXANDER et al.	9	Cães em sobrepeso (I)	Fezes	MiSeq sequenciador Illumina	A administração de prebiótico frutano do tipo inulina resultou em aumento na abundância relativa de alguns Firmicutes e em diminuição na abundância relativa de algumas Proteobactérias
2018	SALAS et al.	6	Cães obesos e após o emagrecimento (I)	Fezes	MiSeq sequenciador Illumina	Um programa de perda de peso em cães obesos baseado em uma dieta de baixa energia e alta fibra, modifica com sucesso sua microbiota fecal. Ao final do estudo, os cães apresentaram uma composição de microbiota com maior biodiversidade, maior presença de Allobaculum e menor proporção de Clostridium
2019	LYU et al.	16	Cães magros e obesos (I)	Fezes	MiSeq sequenciador Illumina	A abundância dos gêneros Bacteroidetes, Sutturella e Fusobacterium foram maiores em cães obesos em comparação a cães magros

Legenda. N: animais com obesidade natural (cães domiciliados); I: animais com obesidade induzida (cães de pesquisa).

2.2.4. Obesidade versus microbiota fecal

Apesar dos esforços em se tratar a obesidade, nos últimos anos sua prevalência em pessoas e animais de estimação vêm aumentando (MAO et al., 2013; LARSEN & VILLAVERDE, 2016; MONTOYA-ALONSO et al., 2017; PORSANI et al., 2019). Dentre as alterações associadas, uma possibilidade levantada recentemente é a disbiose da microbiota intestinal (TURNBAUGH et al., 2009a).

Em 2004, Bäckhed e colaboradores verificaram que a transferência da microbiota intestinal de um camundongo normal para um "*germ-free*" resultou em aumento da quantidade de gordura corporal num período de 10 a 14 dias, mesmo com reduzido consumo de ração. Os autores sugeriram que muitos mecanismos podem estar associados a este evento, como fermentação microbiana de polissacarídeos não digeridos, subsequente absorção intestinal de monossacarídeos e ácidos graxos, bem como a conversão dos mesmos em lipídeos complexos no fígado, e a regulação microbiana dos genes do hospedeiro que promovem deposição de lipídeos em adipócitos. Em um trabalho realizado com animais modelo foi observado que a microbiota de indivíduos obesos é mais eficiente em aproveitar a energia da dieta fornecida que indivíduos magros (TURNBAUGH et al., 2006).

Em humanos, a avaliação de indivíduos magros e obesos resultou em diferenças na microbiota fecal de cada grupo. Brignardello et al. (2010) encontraram diminuição de Clostridium-cluster XIVa em adultos obesos e significativo aumento de Faecalibacterium prausnitzii foi reportado em crianças obesas (BALAMURUGAN et al., 2010). Diminuição de bactérias do grupo Clostridium leptum (SCHWIERTZ et al., 2010) e Bifidobacteria ocorreu em pessoas obesas, enquanto houve enriquecimento de Lactobacilli (ARMOUGOM et al., 2009; BRIGNARDELLO et al., 2010), Bacteroides (SCHWIERTZ et al., 2010) e Prevotellaceae (ZHANG et al., 2009) em homens obesos. No que se refere a animais modelo, estudos com camundongos obesos descreveram mudanças significativas na microbiota cecal, havendo redução das bactérias do filo Bacteroidetes e aumento proporcional do filo Firmicutes. Associado a este achado, observou-se aumento nas concentrações de acetato e butirato dos mesmos animais (TURNBAUGH et al., 2006).

Existe assim, a hipótese de que o "microbioma obeso" possui relativa influência no metabolismo da energia e armazenamento de gordura do hospedeiro, como bactérias da Família Clostridiaceae e Prevotellaceae que possuem enzimas capazes de degradar carboidratos complexos indigestíveis e produção de ácidos graxos de cadeia curta. Tem sido demonstrado, tanto em ratos geneticamente modificados quanto em obesos induzidos pela dieta, que a

microbiota cecal de animais obesos é enriquecida com *tags* genéticos ambientais que codificam para enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos e no metabolismo de carboidratos simples. Dessa forma, existe a hipótese de que o desenvolvimento da obesidade reside na fermentação aprimorada de carboidratos pelo microbioma intestinal e, que a existência simultânea de Archea utilizadora de H_2 com as produtoras de H_2, facilita a fermentação de carboidratos e aumenta a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que podem ser usadas como fonte de energia pelo hospedeiro (ZHANG et al., 2009).

Em estudo pioneiro, Handl et al. (2013) ao avaliarem cães que foram obesos por tempo indeterminado e cães de uma colônia de pesquisa, alimentados *ad libitum* por 6 meses, não encontraram diferenças evidentes na composição da microbiota fecal em nível de filo e sugeriram que devido à complexidade da microbiota intestinal e seus avanços, é fundamental que os demais níveis taxonômicos sejam avaliados.

Mais recente, estudos revelaram que as interações microbiota-hospedeiro-intestino ocorrem em muitos níveis e envolvem complexas vias de sinalização, além de uma série de biomoléculas derivadas de microrganismos que podem ter efeitos em tecidos distantes (GIL-CARDOSO et al., 2016). O trabalho sugere que o aumento das concentrações de lipopolissacarídeos (LPS) gerado pela microbiota aumenta a permeabilidade intestinal e, no plasma, pode alterar o metabolismo lipídico do hospedeiro e resultar em superalimentação do mesmo. A superalimentação, por sua vez, pode levar ao aumento de espécies produtoras de LPS, o que tende a se tornar um ciclo vicioso (CANI et al., 2014; CARDOSO et al., 2016).

Os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal interfere no desenvolvimento da obesidade não está esclarecido e a maior parte dos estudos sobre microbiota intestinal em indivíduos obesos se concentraram em animais modelo e seres humanos, além disso, faltam informações sobre os possíveis efeitos de um programa de perda de peso no perfil da microbiota em cães.

3 HIPÓTESE

Cães obesos possuem microbiota fecal diferente de cães em condição corporal ideal. O emagrecimento resulta em alterações benéficas da microbiota desses animais.

4 OBJETIVOS

4.1. Principal

Caracterizar a microbiota fecal de cães obesos e avaliar os efeitos do emagrecimento na população de microrganismos de animais incluídos em um programa de perda de peso.

4.2. Secundário

Comparar a microbiota fecal de cães obesos com a de cães em escore de condição corporal ideal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais empregados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), sob protocolo nº 5604060219.

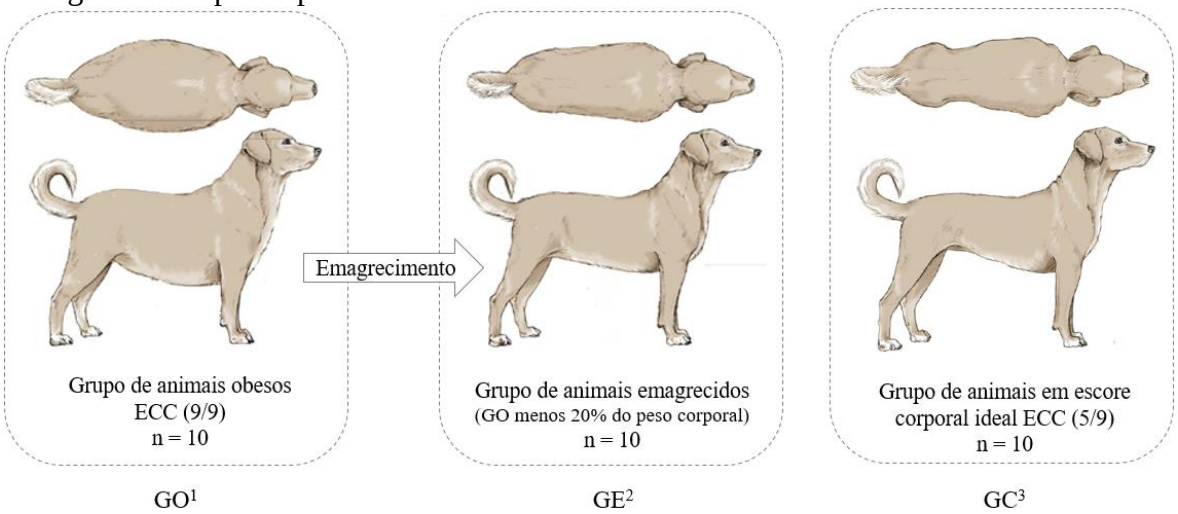
5.1. Local, instalações e animais

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências do Setor de Atendimento de Cães e Gatos e de Diagnóstico da Unidade Didática Clínico Hospitalar (UDCH) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) e no Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP.

Neste estudo foram incluídos dez cães, fêmeas, de diferentes raças, castradas, com idade entre 1 a 9 anos (6,29 ± 1,804) e provenientes do atendimento de rotina dos serviços da UDCH. Todos os animais possuíam escore de condição corporal (ECC) 9 (costelas não palpáveis, grande quantidade de gordura subcutânea, acúmulo de gordura na região lombar e na base da cauda e cintura pouco aparente ou não visível) conforme escala descrita por Laflamme (1997a), escore de massa muscular (EMM) 2 ou 3 conforme escala descrita por Michel et al. (2011) e

composição corporal determinada pelo método de diluição de isótopos de deutério (FERRIER et al., 2002; BRUNETTO et al., 2011b). Neste grupo, foram incluídos apenas animais cuja porcentagem de massa gorda era superior a 30% e sem doenças associadas. Os cães obesos foram incluídos em um programa de perda de peso para redução de 20% da massa corporal e passaram a compor um novo grupo experimental. Por fim, um terceiro grupo foi constituído por dez cães saudáveis, fêmeas, idade entre 1 e 4 anos (2,09 ± 0,842), em condição corporal ideal (ECC 5), EMM 2 ou 3 e gordura corporal máxima de 15%. O esquema representado na figura 1 caracteriza os grupos experimentais (Grupo de animais Obesos, Grupo de animais Emagrecidos e Grupo de animais Controle) incluídos no estudo. Na figura 2 estão alguns exemplos de animais do GO e GE e, na figura 3, exemplos de animais do GC.

Figura 1. Grupos experimentais incluídos no estudo.



Fonte: *World Small Animal Veterinary Association - Global Nutrition Commitee – Body condition score*. [1]Grupo experimental constituído por cães obesos; [2]Grupo experimental constituído pelos animais obesos após o emagrecimento (GO – 20% do peso inicial); [3]Grupo experimental constituído por cães em escore de condição corporal ideal.

Figura 2. Animais do Grupo obeso (A) e Grupo emagrecido (B).

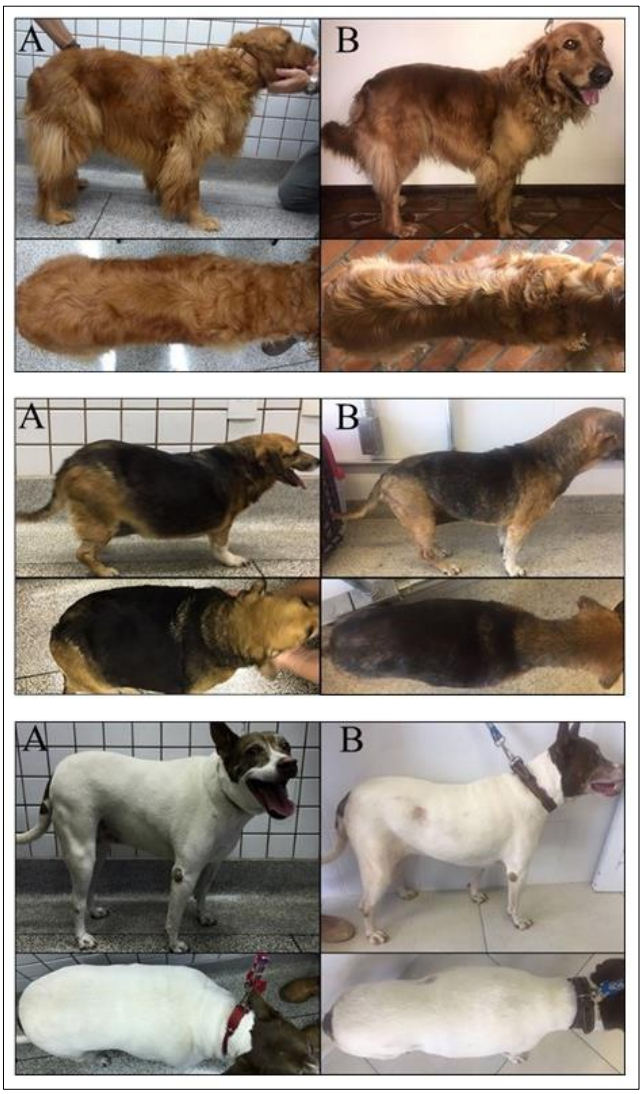


Figura 3. Animais do Grupo controle.

5.2 Triagem dos animais

O período de triagem teve início no dia 02 de agosto de 2017 e término no dia 23 de fevereiro de 2018. Todos os cães passaram por exame físico completo, avaliação nutricional, avaliação do ECC e realização de leucograma e eritrograma, perfil bioquímico [albumina, glicose, proteínas totais, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)]. Após esta fase, estes passaram por um período de padronização da dieta (vide item 5.4).

A inclusão dos animais no experimento foi feita com base nos resultados dos exames físicos, laboratoriais e nutricionais. Participaram do estudo indivíduos que estavam dentro do intervalo de referência para a espécie (para os cães não obesos) ou condizentes com a condição

de acúmulo de gordura corporal (para os cães obesos). Dessa forma, foram aceitos cães obesos por ingestão excessiva de alimento, excluindo-se as demais causas de obesidade.

Por fim, foram excluídos do estudo cães obesos que apresentavam limitação ao estabelecimento do protocolo terapêutico da obesidade, como distúrbios cardiorrespiratórios, do aparelho locomotor, hepáticos, gastroentéricos, renais, endócrinos (diabetes mellitus, hiperadrenocorticismo, hipotireoidismo) e, proprietários que não estavam dispostos a cumprir, rigorosamente, o manejo alimentar padrão proposto neste experimento.

5.3. Hemograma e perfil bioquímico

As amostras de sangue foram obtidas mediante coleta asséptica por venopunção das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas. Exceto para a realização do hemograma, para o qual uma alíquota de 4mL de sangue foi colocada em tubo de ensaio contendo EDTA com anti-coagulante, todos os demais exames foram realizados a partir de amostras de soro sanguíneo dos cães. Para avaliação da glicemia, uma alíquota de 3mL de sangue foi acondicionada em tubo de ensaio com fluoreto de sódio para conservação do conteúdo. Todas as colheitas foram realizadas com os animais em jejum de 12 horas.

Os hemogramas foram realizados no Laboratório Lab Animal – Diagnóstico Veterinário (Leme - SP) em contador eletrônico, para uso veterinário, da marca ABX® (ABC Vet, Horiba Medical, FR). Os hematócritos foram determinados por meio de tubos microcapilares e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, corados por panótipo rápido, no mesmo laboratório.

Todas as análises referentes ao perfil bioquímico foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ / USP, por meio do emprego de kits comerciais e conforme as metodologias e recomendações dos fabricantes. A creatinina sérica foi analisada através do emprego de kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil) pelo método picrato alcalino; a alanina aminotransferase (ALT) pelo emprego do kit comercial da marca Biosystems (Barcelona, Espanha), pelo método IFCC e; para a aspartato aminotransferase (AST) foi utilizado o kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil) utilizando a metodologia cinética-UV. A fosfatase alcalina foi analisada mediante o emprego de kit comercial da marca Biosystems (Barcelona, Espanha), pelo método IFCC/SEQC.

As análises de colesterol e triglicérides séricos foram realizadas com o emprego de kit comercial da marca Biosystems (Barcelona, Espanha), pelo método glicerol fosfato

oxidase/peroxidase e, as análises de proteínas totais foram realizadas através do kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil), pelo método do biureto.

A albumina foi determinada através do kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil), pelo método verde de bromocresol e; a ureia sérica através do método enzimático FS urease GLDH utilizando kit comercial da marca Diasys (Holzheim, Alemanha). Em relação a glicemia, esta foi analisada mediante o emprego de kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil), pelo método GOD-TINDER.

5.4. Período de padronização a dieta

Finalizada a triagem, tanto o grupo obeso, como o grupo controle passaram a receber um alimento de manutenção (Golden Fórmula – Cães Adultos / Frango e Arroz, Premier Pet Indústria e Comércio Ltda, Dourado, Brasil) por 28 dias, para padronização da dieta nas análises iniciais, cuja composição bromatológica na matéria natural e em ingredientes está apresentada na Tabela 2.

A necessidade energética de manutenção (NEM) de cada animal foi calculada pela equação: $NEM = 95 \times (PC)^{0,75} = Kcal/dia$ (FEDIAF, 2018). Quando necessário, o cálculo da necessidade energética, fornecido via dieta, foi ajustado para que os animais mantivessem o peso corporal durante este período.

A quantidade diária de alimento fornecida para cada animal foi determinada, por fim, pela divisão da necessidade energética individual e a energia metabolizável do alimento empregado no estudo.

Tabela 2. Composição bromatológica na matéria natural e em ingredientes[1] do alimento controle utilizado no estudo.

Item	%	unidade / kg	unidade / 1000 kcal de EM[2]
Umidade	7,96	79,6g	26,7g
Proteína bruta	25,51	255,1g	85,6g
Extrato etéreo	12,60	126,0g	42,3g
Matéria mineral	5,30	53,0g	17,8g
Matéria fibrosa	1,91	19,1g	6,4g
Cálcio	1,13	11,3g	3,7g
Fósforo	0,85	8,5g	2,8g
Energia metabolizável	-	3795kcal	-

[1]Farinha de carne, farinha de vísceras de frango, proteína isolada de suíno, milho integral moído, quirera de arroz, polpa de beterraba, farelo de arroz desengordurado, gordura de frango, gordura suína, semente de linhaça, hidrolisado de suíno e frango, ácido propiônico, antioxidantes BHA e BHT, cloreto de potássio, cloreto de sódio,

levedura seca de cervejaria, parede celular de levedura, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, cloreto de colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, iodeto de potássio, proteinato de selênio, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco.
[2]Energia metabolizável.

5.5. Composição corporal

A composição corporal dos animais foi determinada pelo método de diluição de isótopos de deutério. Os cães permaneceram em jejum alimentar por 8 horas antes do início desta avaliação e, hídrico por duas horas. Foi administrado 1mL/kg de peso corporal de uma solução de óxido de deutério diluído a 10%, por via subcutânea. Amostras de sangue (3mL) foram coletadas da veia jugular imediatamente antes e após 02 horas à inoculação de óxido de deutério. Estas foram processadas para extração de soro e armazenadas em temperatura -20°C até a análise.

O enriquecimento por deutério das amostras foi determinado por espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS, Calixto System - Sercon Ltda, Gateway, Reino Unido) no Laboratório de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto – SP. A composição corporal dos cães foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ferrier et al. (2002) e adaptada por Brunetto et al. (2011b).

Após a quantificação da água corpórea foi calculada a massa magra total e por diferença a massa gorda (expressa na forma de porcentagem). Esta avaliação foi realizada após o período de adaptação dos animais do GO e GC com o intuito de quantificar a porcentagem de massa gorda dos indivíduos incluídos no estudo. Posterior ao programa de perda de peso, os animais (agora GE) passaram pela mesma avaliação.

5.6. Avaliação da microbiota fecal

5.6.1. Coleta de fezes

Após a adaptação dos animais, os proprietários receberam um breve treinamento sobre colocação de luvas estéreis e coleta de material estéril. Todos os tutores fizeram a coleta das fezes em suas próprias residências. Cada um deles recebeu um par de luvas estéreis Dial – Mucambo n° 7,5 (São Paulo, Brasil) para utilizar no momento da coleta e um pote coletor

universal estéril J. Prolab (São José dos Pinhais, Brasil) para conservar o material. Além disso, os tutores foram instruídos a coletar as fezes no exato momento em que seus animais estivessem defecando, ou seja, sem que houvesse contato do mesmo com qualquer superfície possivelmente contaminada e, na sequência, fazer o armazenamento da amostra em freezer 20°C. Imediatamente após a coleta do material, foi solicitado a todos os participantes que entrassem em contato com o responsável do experimento para armazená-lo em freezer -80°C até a realização das análises.

5.6.2. Extração do material genético

As amostras a serem analisadas foram encaminhadas ao laboratório da BPI e o DNA total de cada amostra foi extraído através do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research cód. D6005) de acordo com protocolo do fabricante.

5.6.3. Amplificação da região 16S – V4

As reações de amplificação da região 16S foram feitas em triplicata de amostras, e obteve-se volume final de 20µL, contendo 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3µM de oligonucleotideo foward e 0,3µM de oligonucleotideo reverse, 1µL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para completar 20uL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95ºC por 5 min., seguida por 29 ciclos de desnaturação a 95ºC por 30 seg., anelamento a 55ºC por 1 min; extensão a 72ºC por 1 min. 30 seg. e uma extensão final a 72ºC por 10 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de PCR, a amplificação de cada amostra foi comprovada através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com Gel Red (Uniscience).~300bp (tamanho do amplicon).

5.6.4. Purificação e quantificação da biblioteca

As PCRs foram submetidas às etapas de purificação utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers e reação. Após essa etapa, realizou se a quantificação pela metodologia de PCR em tempo real em termociclador QuantStudio 3 Real

Time (Applied Biosystems) e Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), todos de acordo com protocolo do fabricante.

Gerou-se um Pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 3nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent Kit V2 Micro 300 ciclos – leitura de 2 x 150pb.

5.6.5. Bioinformática

As análises foram realizadas através da plataforma QIIME2 ver 2019.10. As sequências foram filtradas por qualidade e agrupas em unidades taxonômicas (OTUs) utilizando-se 97% de similaridade entre as sequências. Uma sequência representativa de cada OTU foi utilizada para a construção de uma árvore filogenética que foi utilizada nas análises de beta-diversidade. A proporção de cada OTU em cada amostra foi utilizada para as análises de alfa e beta-diversidade. Os índices de alfa-diversidade foram calculados: Shannon's diversity index (índice quantitativo que mede a riqueza de cada amostra); quantidade de OTUs em cada amostra e Evenness (ou Pielou's Evenness; uma medida da uniformidade de cada amostra). As sequências também foram comparadas com banco de dados (Green Genes, versão 13.5) para a análise taxonômica.

5.7. Protocolo de emagrecimento dos cães

Para o emagrecimento, os cães obesos foram alimentados com a NEPP estimada de acordo com a seguinte equação: $NEPP = 70 \times (PM)^{0,75} = Kcal/dia$ (BRUNETTO et al., 2011b).

O PM foi calculado com base no peso inicial de cada cão subtraindo-se 20% (CARCIOFI et al., 2005; BRUNETTO et al., 2011b; PEREIRA NETO et al., 2018) e a quantidade diária de alimento fornecida foi determinada pela divisão da NEPP pela energia metabolizável do alimento hipocalórico empregado no estudo (PremieR Nutrição Clínica Obesidade – Cães Médio e Grande Porte, PremieR Pet Indústria e Comércio Ltda, Dourado, Brasil). A composição bromatológica na matéria natural e em ingredientes do alimento utilizado no estudo está apresentada na Tabela 3.

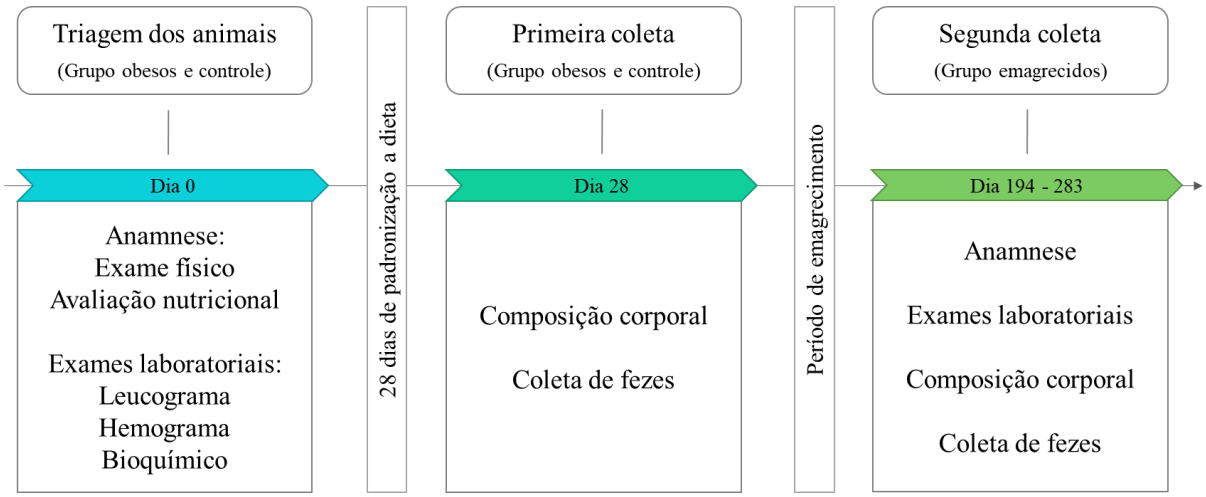
Tabela 3. Composição bromatológica na matéria natural e em ingredientes[1] do alimento hipocalórico utilizado no estudo.

Item	%	unidade / kg	unidade / 1000 kcal de EM[2]
Umidade	8,14	81,4g	27,3g
Proteína bruta	36,92	369,2g	123,9g
Extrato etéreo	10,27	102,7g	34,5g
Matéria mineral	5,61	56,1g	18,8g
Matéria fibrosa	10,37	103,7g	34,8g
Cálcio	0,98	9,8g	3,3g
Fósforo	0,79	7,9g	2,6g
Energia metabolizável	-	2979kcal	-

[1]Farinha de vísceras de frango, glúten de trigo, proteína isolada de suíno, plasma suíno em pó, ovo desidratado, farinha de ervilha, cevada, quirera de arroz, celulose, polpa de beterraba, gordura de frango, óleo de peixe, hidrolisado de suíno e frango, ácido propiônico, antioxidante BHA, β-glucano, cloreto de potássio, cloreto de sódio, extrato de yucca, frutoligossacarideos, gelatina hidrolisada (2,5%), L-carnitina, levedura seca de cervejaria, parede celular de levedura (fonte de MOS), taurina, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, cloreto de colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, ferro aminoácido quelato, iodeto de potássio, manganês aminoácido quelato, proteinato de selênio, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de zinco, sulfato de manganês, zinco aminoácido quelato, cobre aminoácido quelato.
[2]Energia metabolizável.

A quantidade calculada foi oferecida aos animais pelos tutores, de duas a três vezes ao dia, mediante o fornecimento de um pote medida previamente calculado. A dieta hipocalórica foi padronizada para todos os cães obesos que participaram do estudo. As avaliações dos animais, cálculos da taxa de perda de peso semanal e, reajustes na quantidade de alimento foram realizadas a cada 15 dias. Além disso, o estímulo para a prática de atividade física (em torno de 3 vezes por semana, por pelo menos 15 minutos) foi recomendada para todos os animais participantes do protocolo de emagrecimento. Na Figura 4 estão esquematizados todos os períodos, análises e os procedimentos experimentais que foram realizados no estudo.

Figura 4. Períodos, análises e os procedimentos experimentais que foram realizados.



5.8. Análise estatística

Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância a 5% de significância, utilizando-se também o PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.3 (SAS, 1995) e, quando detectadas diferenças entre as médias, essas foram comparadas pelo teste de Tukey. Para a caracterização da microbiota, as abundâncias observadas para cada Filo e Gênero foram avaliadas por Modelo Linear Generalizado, considerando distribuição binominal e por meio do emprego da função de ligação logit. O modelo incluiu efeitos fixos de Grupos (Controle, Obesos e Emagrecidos), além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. Todas as análises foram realizadas por meio do procedimento PROC GLIMMIX, do programa *Statistical Analysis System*, versão 9,3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Valores de P<0,05 foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1. Animais

Doze animais obesos foram triados no início do projeto, no entanto dois tutores não continuaram devido à distância, falta de tempo e, comprometimento com o emprego da dieta e retornos. Assim, dez cães do grupo obeso continuaram e terminaram o programa de perda de peso, atingiram o peso meta e, como previsto, compuseram o grupo emagrecido.

Para o grupo controle, foram triados animais e todos consumiram a dieta padronizada durante o período de 28 dias, sem interrupção, até a realização de todas as análises propostas. A caracterização completa dos animais do GO, GE e GC está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização dos cães incluídos no estudo.

Animal	**Raça**	**Peso (kg)**	**Idade (anos)**	**ECC[1]**	**EMM[2]**
		Grupo obeso (GO)			
A	SRD[3]	24,4	4,0	9	2
B	Yorkshire terrier	5,6	6,8	9	2
C	Golden retriever	39,5	4,5	9	3
D	Teckel	12,0	7,0	9	2
E	SRD[3]	38,4	5,8	9	2
F	SRD[3]	34,6	7,5	9	2
G	Border Collie	26,6	4,0	9	3
H	Pinscher miniatura	3,5	5,7	9	2
I	Pit bull	31,3	9,1	9	2
J	SRD[3]	13,1	8,5	9	2

		Grupo emagrecido (GE)			
A[4]	SRD[3]	19,3	4,5	6	3
B[4]	Yorkshire terrier	4,4	7,3	6	2
C[4]	Golden retriever	30,6	5,0	5	3
D[4]	Teckel	10,0	7,6	6	3
E[4]	SRD[3]	30,8	6,3	6	2
F[4]	SRD[3]	26,3	8,0	6	3
G[4]	Border collie	20,2	4,5	5	3
H[4]	Pinscher miniatura	2,7	6,2	6	2
I[4]	Pit bull	23,7	9,6	6	2
J[4]	SRD[3]	8,7	9	5	2
		Grupo controle (GC)			
K	Border colie	17,2	1,4	5	2
L	SRD[3]	16,4	1,7	5	3
M	SRD[3]	23,6	2,7	5	2
N	West higlhland white terrier	7,6	1,4	5	2
O	Husky siberiano	19,6	2,6	5	3
P	SRD[3]	12,3	2,0	5	2
Q	SRD[3]	9,5	1,4	5	2
R	SRD[3]	23,4	4,0	5	3
S	SRD[3]	10,3	1,4	5	2
T	Bulldog francês	10,1	2,3	5	3

[1] Escore de condição corporal; [2] Escore de massa muscular; [3] Sem raça definida; [4] Mesmos animais do grupo obeso após o emagrecimento.

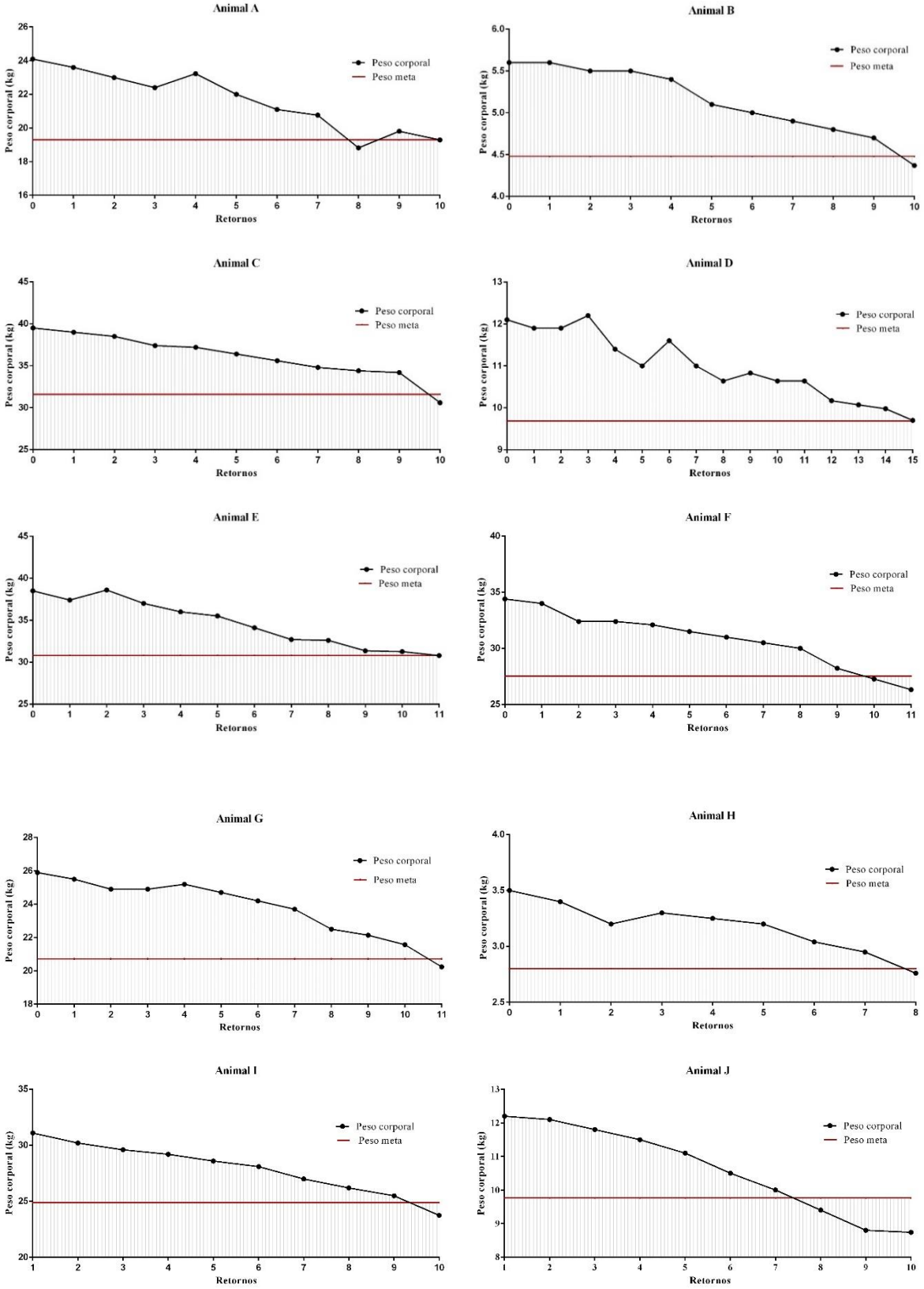
6.2. Eritrogramas e leucogramas

Os resultados dos eritrogramas e leucogramas realizados nos animais do grupo controle e grupo obeso para triagem e inclusão no estudo estão apresentados nos Apêndices 3 e 4, respectivamente. Os valores de referência adotados foram os descritos por Kaneko (2008).

6.3. Programas de perda de peso

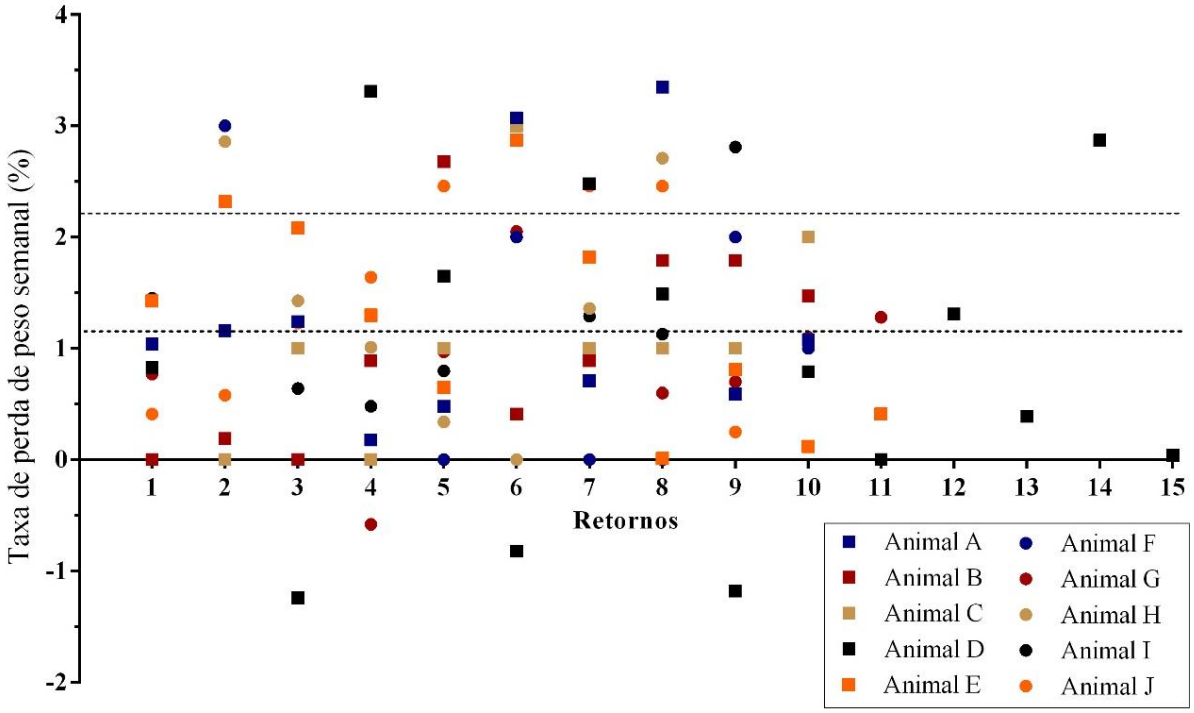
Os programas de perda de peso iniciaram no dia 13 de outubro de 2017 e finalizaram com o emagrecimento do último cão no dia 17 de julho de 2018. Os resultados do emagrecimento dos animais estão ilustrados na figura 5. A curva de emagrecimento ilustra o peso corporal e o peso meta dos animais do grupo obeso ao longo de todos os programas de perda de peso, respectivamente do animal A ao animal J.

Figura 5. Curvas de emagrecimento dos animais do Grupo obeso.



O período médio de emagrecimento dos animais incluídos no estudo foi de 184 ± 34, 94 dias e a taxa média de perda de peso semanal foi de 1,14 ± 0,28%. A distribuição completa das taxas de emagrecimento semanal está ilustrada na Figura 6.

Figura 6. Taxa de perda de peso semanal dos animais incluídos no estudo.



6.4. Exames bioquímicos

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos através do perfil bioquímico dos animais do GO, GE e GC. Os resultados das variáveis proteína total (P=0,037) e creatinina (P=0,023) do grupo emagrecido foram maiores em comparação com o grupo obeso. Com relação a alanina aminotransferase (P=0,055), os valores obtidos foram maiores no grupo de cães emagrecidos em relação aos animais do grupo controle e, quanto a aspartato aminotransferase (P=0,010) - o grupo obeso apresentou maior concentração sérica que os grupos emagrecido e controle. Nas demais determinações bioquímicas não foi observada diferença entre os grupos (P>0,05).

Tabela 5. Exames bioquímicos dos grupos obeso (GO), controle (GC) e emagrecido (GE).

Variável	GO	GE	GC	Intervalo referência[1]	EPM	*P*
Albumina (g/dL)	3.22	3,23	2,75	2,60 -3,30	0,282	0,393
Glicose (mg/dL)	86,28	88,63	87,86	65-118,00	4,163	0,867
Proteínas totais (g/dL)	6,5[A]	7,32[B]	6,6[AB]	5,4-7,10	0,234	0,037
Ureia (mg/dL)	32,06	37,62	36,1	21 -59,09	3,851	0,590
Creatinina (mg/dL)	0,957[AB]	0,93[B]	1,144[A]	0,5-1,50	0,563	0,023
FA[2] (UI/L)	21,62	19,4	18,21	20-156,00	3,534	0,789
Colesterol (mg/dL)	169,4	190,32	178,61	135 -270,00	20,904	0,786
Triglicérides (mg/dL)	67,07	57,2	49,38	20-112,00	8,257	0,319
AST[3] (UI/L)	18,17[A]	16,6A[B]	11,24[B]	10-88,00	1,207	0,010
ALT[4] (UI/L)	19,67[AB]	23,51[A]	13,39[B]	10-88,00	2,923	0,055

[A-B] Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.[1] Valores de referência segundo Kaneko (2008); [2]Fosfatase alcalina; [3]Aspartato aminotransferase; [4]Alanina aminotransferase.

6.5. Composição corporal

Os animais selecionados para compor o grupo obeso apresentaram escore de condição corporal superior aos animais do grupo controle (P<0,001) e, após o emagrecimento não houve diferença entre o grupo emagrecido em comparação ao controle (Tabela 6). Não foram observadas diferenças de peso entre os grupos avaliados e, ao exame de composição corporal, a porcentagem de massa gorda média, tanto em porcentagem (P<0,001) quanto em quilos (P=0,0053), foi superior no grupo obeso e, após o emagrecimento, esses valores foram semelhantes ao grupo controle. Além disso, o programa de emagrecimento resultou em aumento da massa magra (%) dos animais obesos (P<0,001).

Tabela 6. Peso, escore de condição corporal e composição corporal dos grupos obeso (GO), controle (GC) e emagrecido (GE).

Variável	GO	GC	GE	EPM	*P*
ECC[1]	9[A]	5[B]	5,7[B]	0,8819	<,0001
Peso corporal (kg)	22,8	14,96	17,67	3,309	0,2529
Gordura (kg)	8,42[A]	2,89[B]	4,34[B]	1,5978	0,0053
Massa magra (kg)	14,37	12,29	13,33	2,3602	0,8259
Gordura (%)	36,93[A]	17,21[B]	24,05[B]	2,0391	<,0001
Massa magra (%)	63,06[A]	82,48[B]	75,95[B]	2,0391	<,0001

Legenda: [1] Escore de condição corporal; [A-B] Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

6.6. Caracterização da comunidade bacteriana por Miseq Illumina

Com base nos resultados obtidos pela técnica de T-RFLP (diversidade e riqueza), 30 amostras fecais, sendo 10 amostras de animais obesos (ECC 9/9 e EMM 3/4), 10 amostras de animais emagrecidos (ECC 5/9 e EMM 3/4) e 10 animais controle (ECC 5/9 e EMM 3/4) foram escolhidas para a caracterização da comunidade bacteriana, as quais foram sequenciadas em "*multiplexing*" na plataforma MiSeq Illumina.

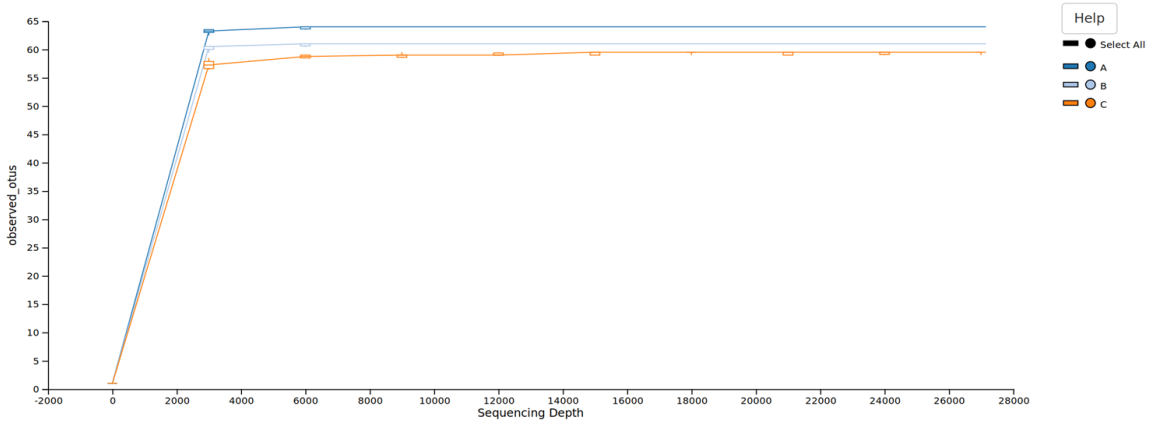
A tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS, em inglês, *next generation sequencing*) avançou rapidamente a compreensão da ecologia microbiana e, para a obtenção de uma base confiável são necessárias várias observações de uma mesma região. Dessa forma, a cobertura de sequenciamento, que descreve o número médio de leituras que cobrem as bases de referência conhecidas (ILLUMINA), deve ser ampla o suficiente para garantir a precisão das informações obtidas e diminuir possíveis erros. Neste estudo foram geradas 1.384.661 sequências e, estas foram agrupadas em OTUs por meio do uso do algoritmo UPARSE-OTU com 97% de similaridade. Na pesquisa filogenética e genética de populações, a unidade taxonômica operacional (OTU, em inglês, *operational taxonomic unit*) é o conjunto artificial de determinado táxon para facilitar a análise. O mínimo de OTUs e sequências geradas por amostra foi respectivamente de 27 e 27.057 e o máximo de 106 e 64.552, com média de 64,85 ± 19,41 e 46.155,37 ± 8.398,29. O número de sequências e OTUs observadas para cada amostra estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Número de sequencias e OTUs observadas em cada amostra experimental.

Animal	Contagem de sequências	OTUs observadas
Amostra 1 GO[1]	41.930	63,0
Amostra 2 GO	35.853	60,0
Amostra 3 GO	54.939	80,0
Amostra 4 GO	42.403	60,0
Amostra 5 GO	52.186	86,0
Amostra 6 GO	41.438	37,0
Amostra 7 GO	50.863	73,0
Amostra 8 GO	47.995	67,0
Amostra 9 GO	47.116	65,0
Amostra 10 GO	41.275	58,0
Amostra 1 GE[2]	38.432	70,0
Amostra 2 GE	33.587	51,0
Amostra 3 GE	55.784	80,0
Amostra 4 GE	47.686	59,0
Amostra 5 GE	36.979	49,0
Amostra 6 GE	40.459	27,0
Amostra 7 GE	64.552	96,0
Amostra 8 GE	57.344	81,0
Amostra 9 GE	47.106	63,0
Amostra 10 GE	44.020	43,0
Amostra 1 GC[3]	49.312	88,0
Amostra 2 GC	43.994	49,9
Amostra 3 GC	44.637	49,0
Amostra 4 GC	27.057	56,0
Amostra 5 GC	48.189	43,0
Amostra 6 GC	40.979	46,0
Amostra 7 GC	56.539	106,0
Amostra 8 GC	43.826	68,8
Amostra 9 GC	44.842	62,9
Amostra 10 GC	63.339	95,0

Legenda: [1]Grupo obeso; [2]Grupo emagrecido; [3]Grupo controle.

Figura 7. Número de leituras para cada grupo experimental.



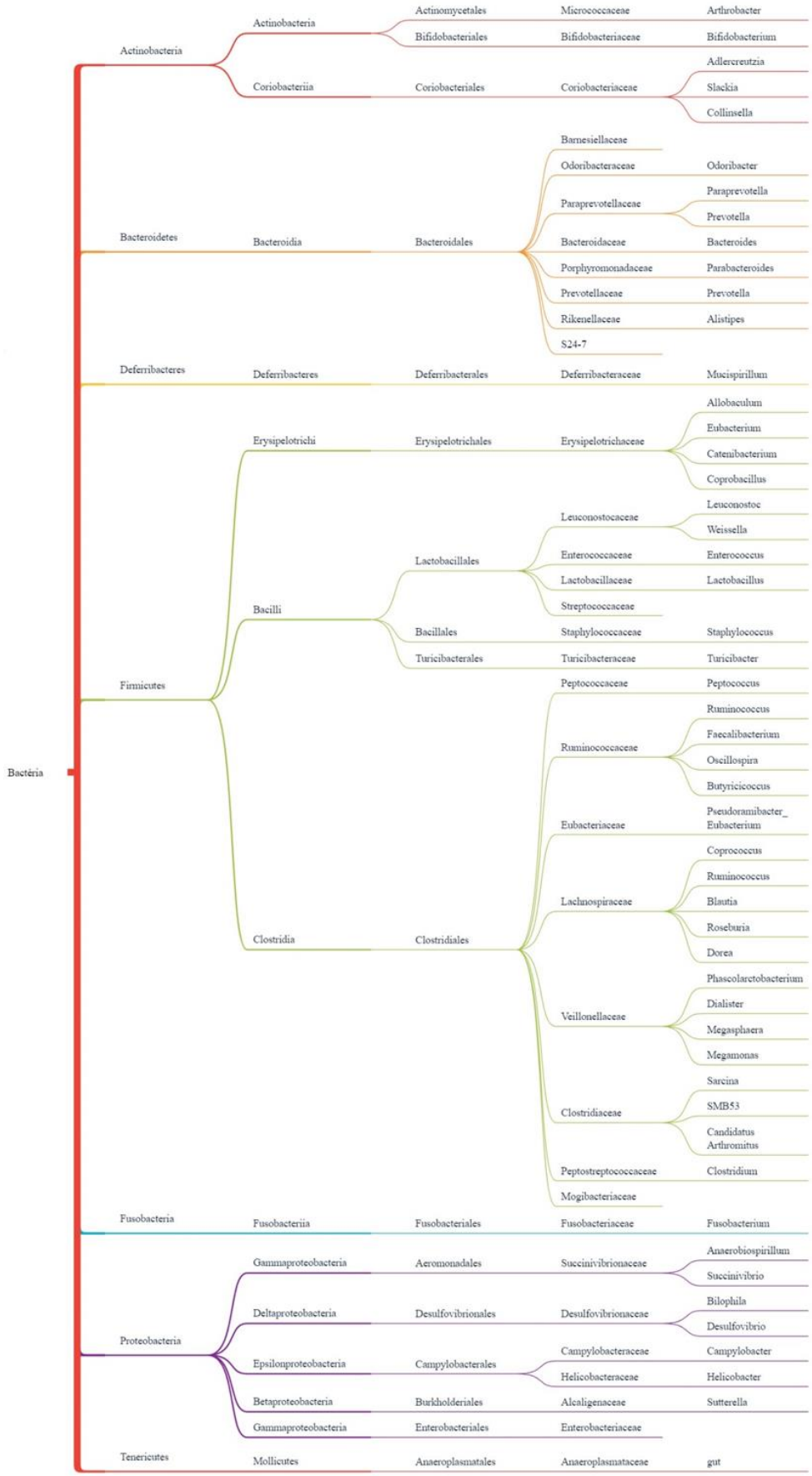
6.7 Taxonomia

Foram identificados 7 filos e 51 gêneros diferentes entre os 3 grupos experimentais. A representação gráfica da evolução filogenética bacteriana observada está ilustrada na figura 8.

Dentre os filos encontrados, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Fusobacteria foram detectados em todos os 3 grupos, o que não ocorreu para os filos Tenericutes e Deferribacteres, que não foram verificados em pelo menos um dos grupos. Assim, não foram incluídos nas análises estatísticas.

Dos gêneros obtidos, *Adlercreutzi, Alistipes, Arthrobacter, Bifidobacterium, Bilophila, Campylobacter, Candidatus, Clostridium, Arthromitus, Coprobacillus, Desulfovibrio, Dialister, Enterococcus, gut, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Megasphaera, Mucispirillum, Odoribacter, Oscillospira, Parabacteroides, Paraprevotella, Peptococcus, Pseudoramibacter_Eubacterium, Roseburia, Ruminococcus, Sarcina, Slackia, Staphylococcus, Streptococcus, Succinivibrio e Weissella* também foram excluídos das análises estatísticas pelo mesmo motivo citado anteriormente. Em especial, o gênero *Bifidobacteria* não foi encontrado em animais obesos, no entanto, foi identificado nos grupos emagrecido e controle. Desta forma, foram incluídos na análise estatística os seguintes gêneros: *Allobaculum, Anaerobiospirillum, Bacteroides, Blautia, Butyricicoccus, Catenibacterium, Clostridium, Collinsella, Coprococcus, Dorea, Eubacterium, Faecalibacterium, Fusobacterium, Helicobacter, Megamonas, Phascolarctobacterium, Prevotella, Ruminococcus, SMB53, Sutterella e Turicibacter.*

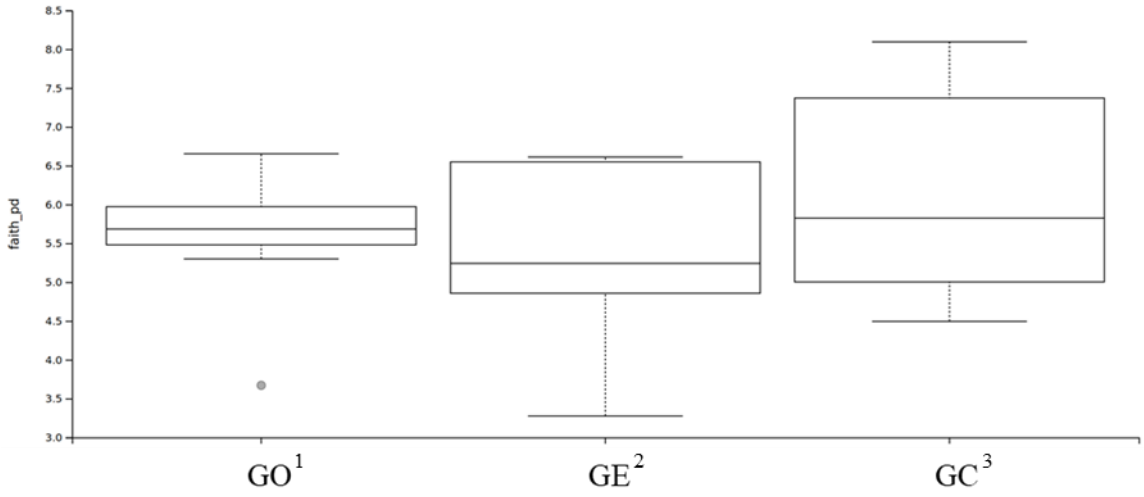
Figura 8. Árvore filogenética dos microrganismos encontrados nas amostras fecais dos três grupos experimentais.



6.8 Índices de diversidade

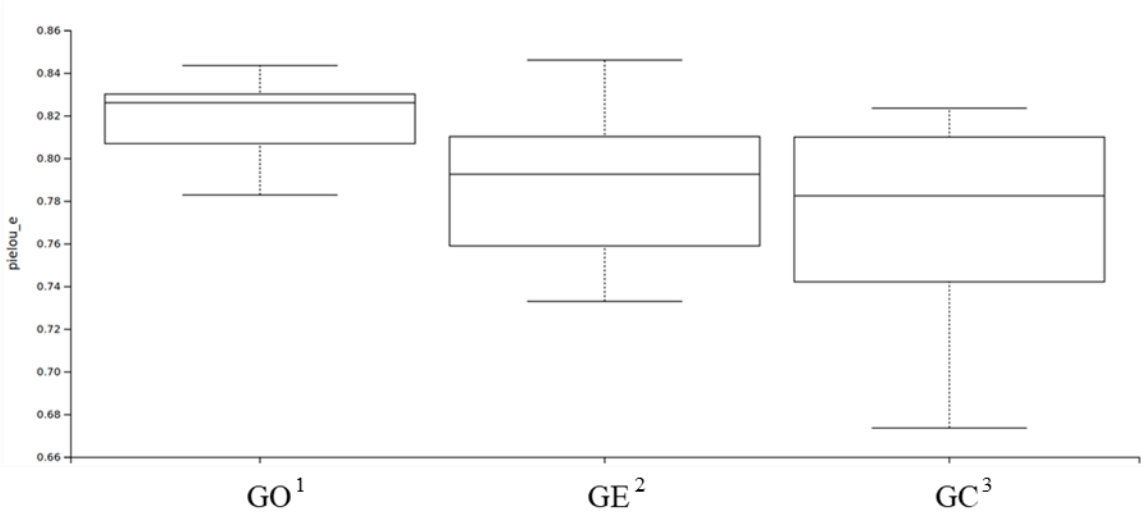
Não foram encontradas diferenças na riqueza de microrganismos por meio do índice de diversidade filogenética de Faith (*Faith's phylogenetic diversity index*) entre cães obesos, emagrecidos e controle (figura 9). No entanto, a uniformidade intestinal da microbiota (*Pielou's evenness index*) foi maior em cães obesos do que em cães emagrecidos (P=0,0493) e controle (P=0,0101) (figura 10). Não houve diferença nos índices de uniformidade de Pielou entre os cães emagrecidos e controle (P=0,6501).

Figura 9. Índice de diversidade filogenética de Faith dos grupos experimentais.



Legenda: [1]Grupo obeso; [2]Grupo emagrecido; [3]Grupo controle.

Figura 10. Índices de uniformidade de Pielou dos grupos experimentais.



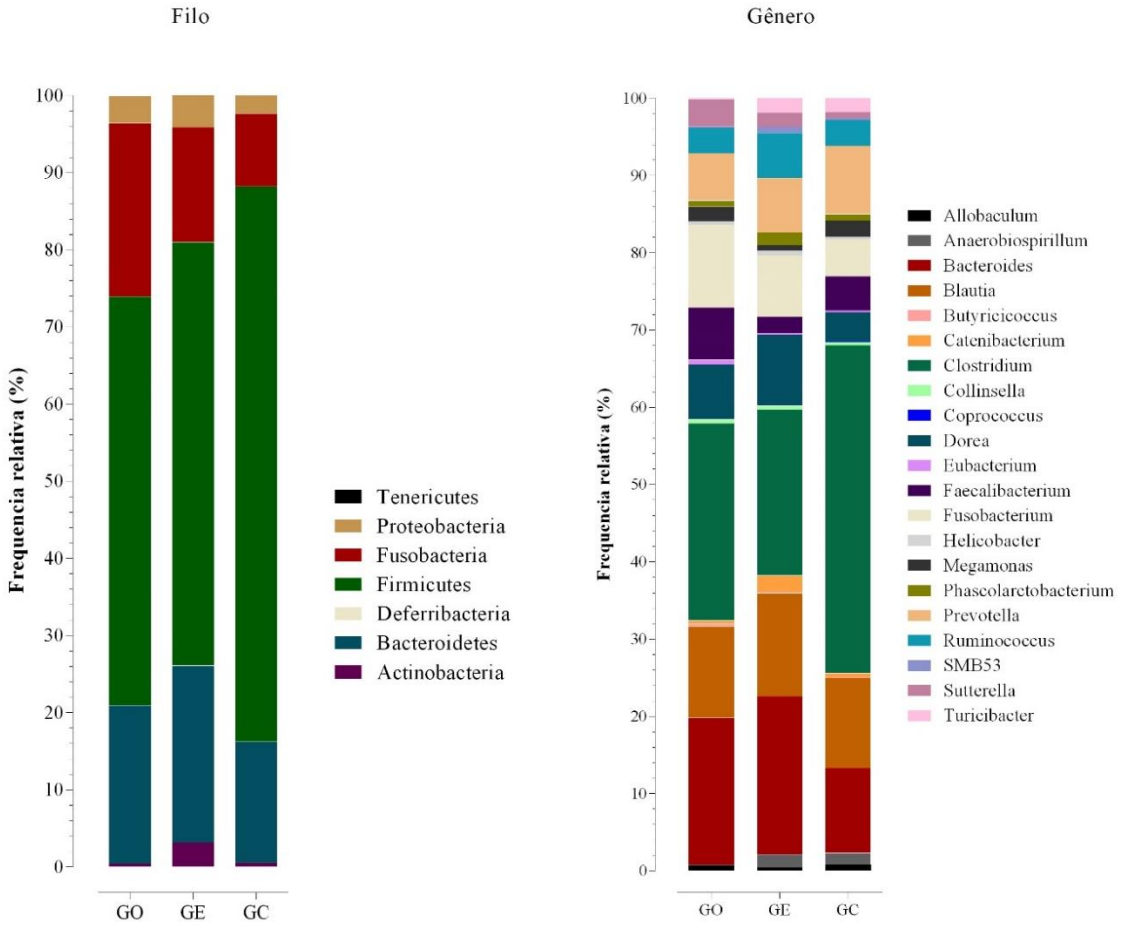
Legenda: [1]Grupo obeso; [2]Grupo emagrecido; [3]Grupo controle.

6.9 Filos

A frequência relativa dos filos para cada grupo experimental está representada na figura 11. O padrão de distribuição dos filos bacterianos dentro de cada grupo denota a heterogeneidade dos microrganismos encontrados.

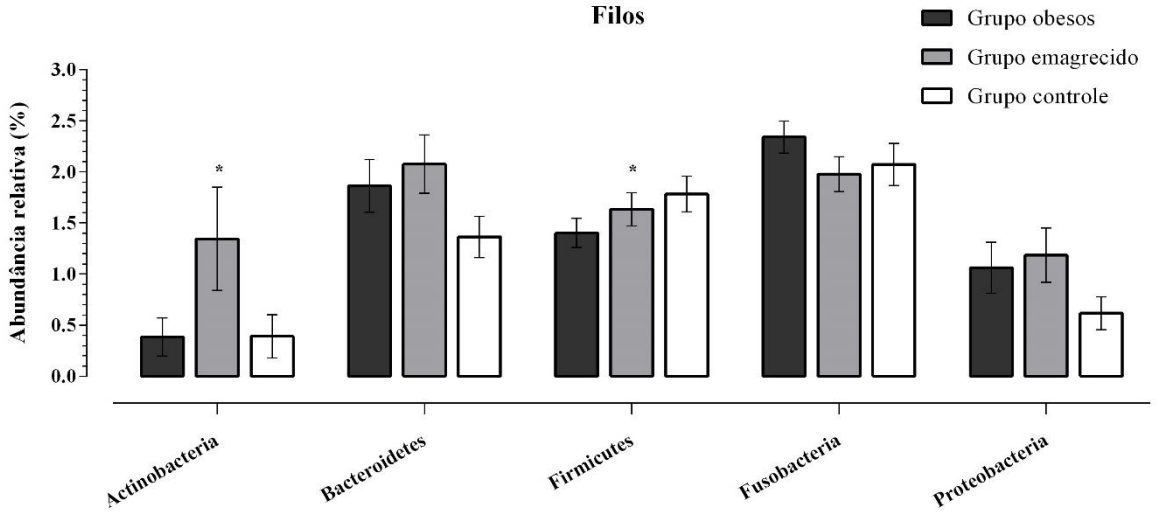
A abundância relativa dos filos encontrados nos grupos experimentais está apresentada na figura 12. Os filos predominantes entre os grupos obesos, emagrecidos e controle foram o Firmicutes (53,01%; 54,82%; 71,98%), seguido de Bacteroidetes (20,47%; 22,88%; 15,66%) e Fusobacteria (22,45%; 14,85%; 9,45%). Dentre todos, o programa de perda de peso modulou de forma positiva os filos Actinobacteria (P=0,0128) e Firmicutes (P=0,0189). O filo Firmicutes foi encontrado em maior quantidade no grupo controle, quando comparado com o grupo obeso e, em quantidade semelhante ao grupo emagrecido. Em relação ao filo Actinobacteria, não foi observada diferença do grupo controle com obesos e emagrecidos. Ao nível de 10% de significância, a abundância relativa do filo Bacteroidetes (P=0,0942) foi superior em animais emagrecidos, no entanto, não foi observada diferença quando comparado o grupo obeso com os outros dois grupos. Também não foi observada diferença entre os grupos para os filos Fusobacteria (P=0,2664) e Proteobacteria (P=0,1644).

Figura 11. Distribuição dos filos e gêneros bacterianos entre os grupos experimentais.



Legenda: GO, Grupo obeso; GE, Grupo emagrecido; GC, Grupo controle.

Figura 12. Abundância relativa dos filos encontrados nos grupos experimentais.



6.10 Gêneros

Na figura 11 é possível verificar a frequência relativa dos gêneros bacterianos nos três grupos experimentais e pode-se observar grande heterogeneidade entre eles. Na figura 13 estão apresentadas as abundâncias relativas aos gêneros pertencentes aos filos Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria e Proteobacteria; e na figura 14, os gêneros pertencentes ao filo Firmicutes. O gênero predominante, independente da condição corporal foi *Clostridium* (42,43 – 25,51%), seguido de *Bacteroides* (20,48 – 19,03%) e *Blautia* (13,31 – 11,85%). O programa de perda de peso modulou de forma positiva o gênero *Dorea* (P<,0001) e negativamente o *Faecalibacterium* (P=0,0114). A respeito do gênero *Dorea*, foi observada maior concentração no grupo emagrecido em comparação com os obesos e, semelhança do grupo controle com o obeso e emagrecido. Resultado semelhante ocorreu com o gênero *Faecalibacterium*, onde a concentração do grupo controle foi similar aos grupos obesos e emagrecidos, mas o grupo emagrecido apresentou menor concentração em relação aos obesos. Para o gênero *Bacteroidetes* (P=0,0243), a concentração relativa foi maior no grupo emagrecido em relação ao controle, mas semelhante entre obesos e os outros dois grupos. O mesmo aconteceu para o gênero *Clostridium* (P=0,0414), com a diferença de que a concentração do grupo controle foi superior em relação ao GE. No gênero *Sutterella* (P=0,0095), o grupo obeso diferiu do grupo controle, mas foi semelhante ao grupo emagrecido. Para os demais gêneros não houve diferença entre os grupos estudados (tabela 8).

Figura 13. Abundância relativa dos gêneros pertencentes aos filos Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria e Proteobacteria.

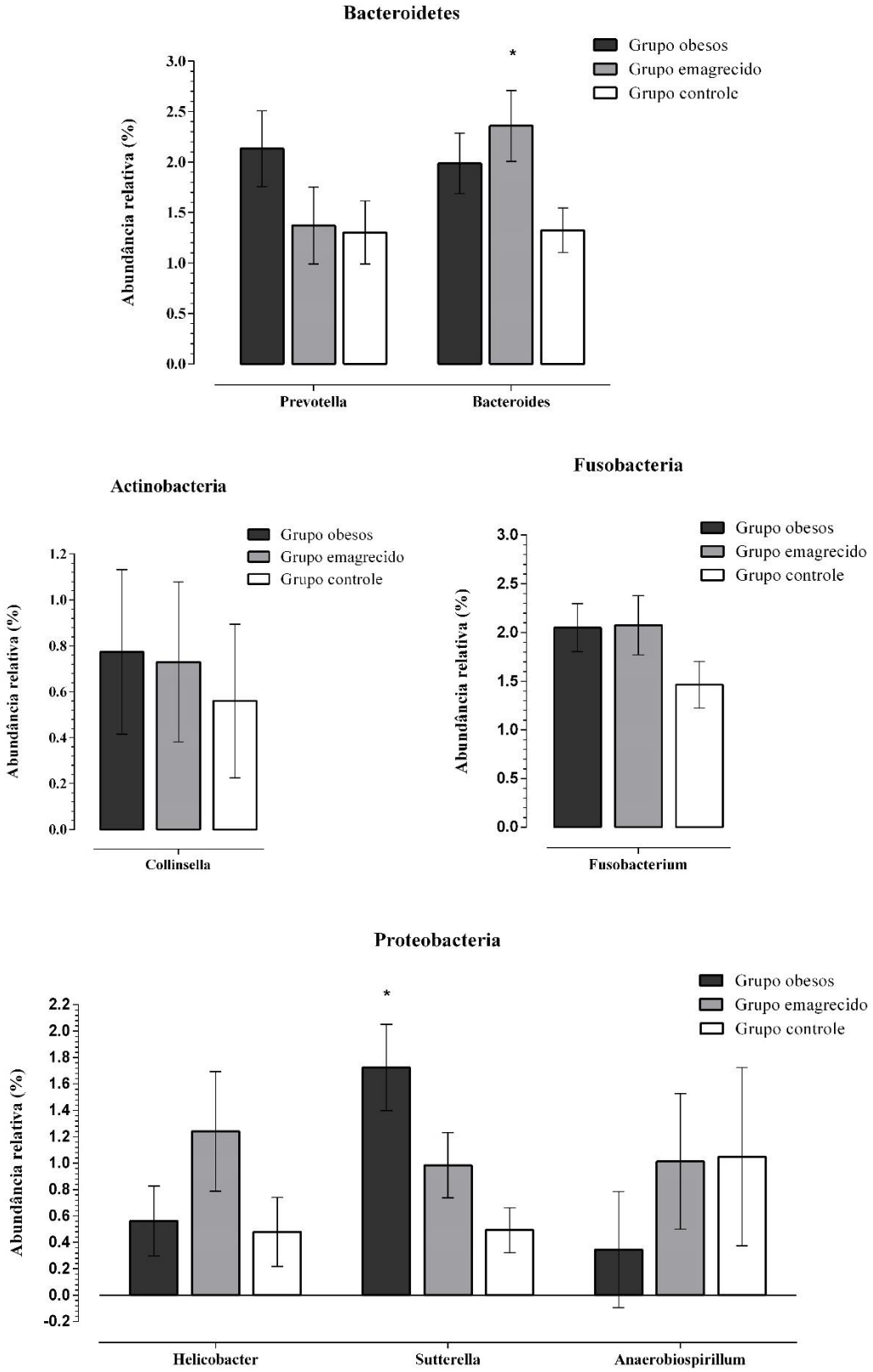


Figura 14. Abundância relativa dos gêneros pertencentes ao filo Firmicutes.

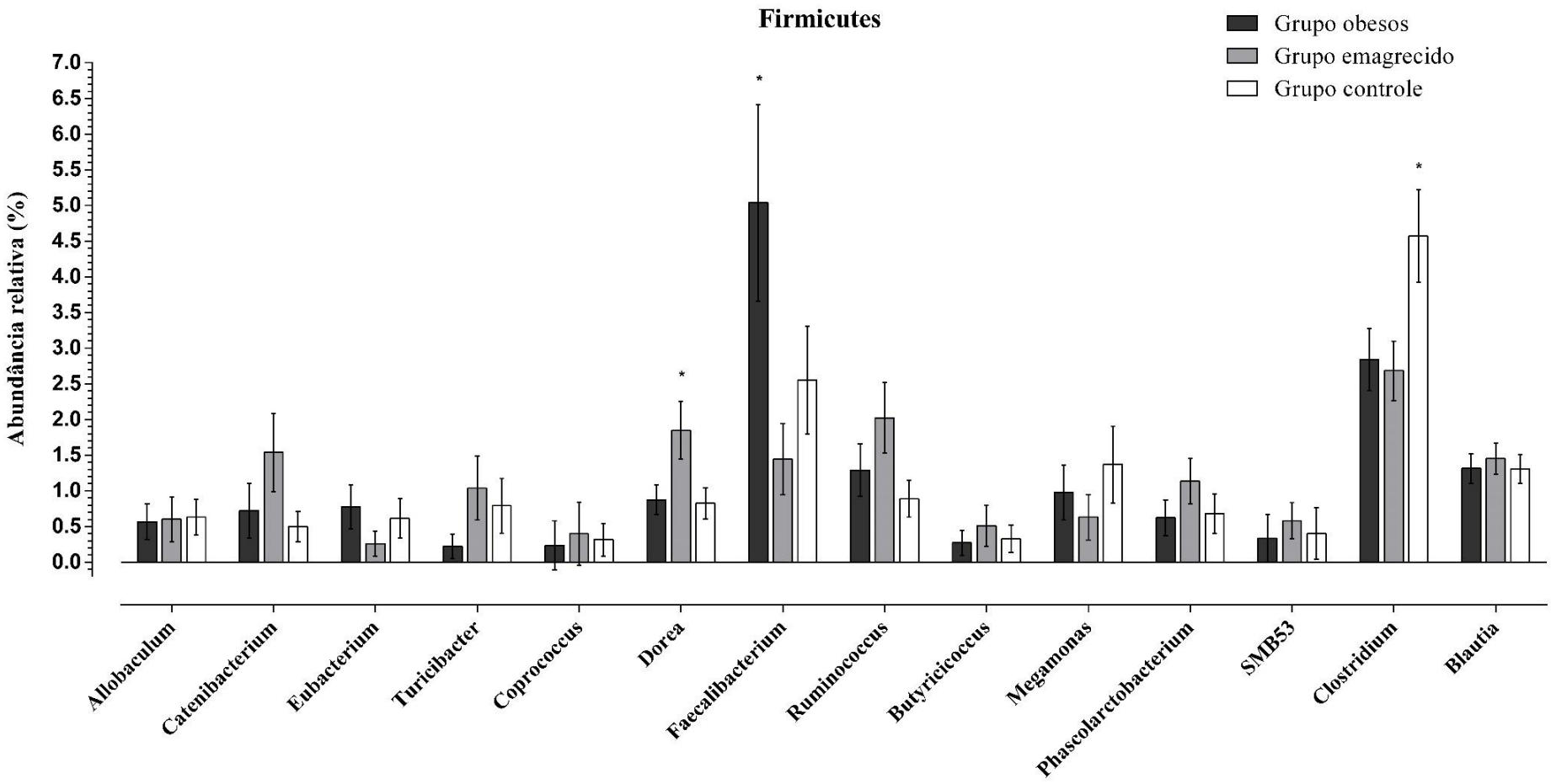


Tabela 8. Abundância relativa de filo, família e gênero bacteriano encontrados nos grupos experimentais.

Filo	Família	Gênero	GO	GE	GC	*P*
Actinobacteria			0,385 ± 0,186^{B}	1,344 ± 0,505^{A}	0,392 ± 0,213^{AB}	0,0128
	Coriobacteriaceae	Collinsella	0,774 ± 0,358	0,730 ± 0,348	0,560 ± 0,334	0,9088
Fusobacteria			2,340 ± 0,156	1,977 ± 0,170	2,073 ± 0,206	0,2664
	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	2,049 ± 0,246	2,075 ± 0,304	1,464 ± 0,240	0,1949
Proteobacteria			1,063 ± 0,248	1,185 ± 0,266	0,617 ± 0,161	0,1644
	Helicobacteraceae	Helicobacter	0,563 ± 0,265	1,241 ± 0,452	0,480 ± 0,261	0,2982
	Alcaligenaceae	Sutterella	1,725 ± 0,326^{A}	0,984 ± 0,247^{AB}	0,493 ± 0,170^{B}	0,0095
	Succinivibrionaceae	Anaerobiospirillum	0,345 ± 0,439	1,013 ± 0,514	1,048 ± 0,675	0,7046
Bacteroidetes			1,864 ± 0,258^{ab}	2,076 ± 0,286^{a}	1,365 ± 0,201^{b}	0,0942
	Paraprevotellaceae	Prevotella	2,133 ± 0,377	1,371 ± 0,381	1,303 ± 0,312	0,1859
	Bacteroidaceae	Bacteroides	1,987 ± 0,300^{AB}	2,359 ± 0,351^{A}	1,325 ± 0,220^{B}	0,0243
Firmicutes			1,403 ± 0,141^{B}	1,634 ± 0,163^{A}	1,785 ± 0,175^{AB}	0,0189
	Erysipelotrichaceae	Allobaculum	0,564 ± 0,250	0,601 ± 0,316	0,630 ± 0,250	0,9828
		Catenibacterium	0,720 ± 0,383	1,536 ± 0,550	0,498 ± 0,216	0,1408
		Eubacterium	0,773 ± 0,310	0,257 ± 0,179	0,612 ± 0,276	0,4243
	Turicibacteraceae	Turicibacter	0,220 ± 0,173	1,035 ± 0,448	0,790 ± 0,385	0,1836
	Lachnospiraceae	Coprococcus	0,236 ± 0,343	0,398 ± 0,445	0,316 ± 0,229	0,9603
		Dorea	0,874 ± 0,208^{B}	1,846 ± 0,405^{A}	0,824 ± 0,219^{AB}	<.0001
	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	5,038 ± 1,379^{A}	1,445 ± 0,495^{B}	2,553 ± 0,755^{AB}	0,0114
		Ruminococcus	1,290 ± 0,367	2,024 ± 0,495	0,887 ± 0,256	0,0386
		Butyricicoccus	0,270 ± 0,173	0,509 ± 0,291	0,326 ± 0,190	0,7489
	Veillonellaceae	Megamonas	0,975 ± 0,385	0,630 ± 0,319	1,368 ± 0,540	0,4776
		Phascolarctobacterium	0,621 ± 0,248	1,133 ± 0,319	0,678 ± 0,274	0,4020
	Clostridiaceae	SMB53	0,333 ± 0,333	0,579 ± 0,253	0,400 ± 0,365	0,8480
	Peptostreptococcaceae	Clostridium	2,841 ± 0,433^{AB}	2,683 ± 0,414^{B}	4,569 ± 0,649^{A}	0,0414
	Lachnospiraceae	Blautia	1,313 ± 0,207	1,451 ± 0,217	1,303 ± 0,201	0,7442

Legenda: $^{A-B}$ Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey-Kramer;
$^{a-b}$ Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 10% no Teste de Tukey-Kramer.

7. DISCUSSÃO

Todos os cães que participaram do programa de perda de peso apresentaram consumo satisfatório do alimento hipocalórico utilizado, o que demonstra boa aceitação, sendo características do alimento o alto teor proteico e, boa palatabilidade, mesmo com baixos teores de gordura em sua composição. Durante o emagrecimento, os cães foram pesados e avaliados a cada 15 dias e nenhuma alteração clínica foi observada. A frequência quinzenal de avaliação possibilitou acompanhar e avaliar a qualidade das fezes, cujas alterações não foram observadas em nenhum momento do período experimental. Por fim, apesar da diferença encontrada para a proteína total, creatinina, AST e ALT, todos os valores dos grupos avaliados encontraram-se dentro do intervalo de referência para a espécie (KANEKO, 2008).

A porcentagem de perda de peso corporal média por semana ficou dentro do recomendável para cães, entre 1 e 2% (LAFLAMME et al., 1997b). Estes resultados são de suma importância, pois demonstram que o programa de emagrecimento em todos os animais foi realizado de maneira saudável e adequada. Trabalhos em geral, com animais de proprietário, resultaram em taxa semanal inferior a 1,0% (CARCIOFI et al., 2005; GERMAN et al., 2007; BRUNETTO et al., 2008; BRUNETTO, 2010). Os estudos citados encontraram taxas de perda de peso semanal de 0,75%; 0,85%; 0,80% e 0,70% respectivamente; a menor porcentagem de perda de peso dos cães domiciliados pode ser explicada principalmente devido a indisponibilidade dos mesmos em cumprir o protocolo terapêutico estabelecido, fornecendo mais calorias do que o calculado para os animais (BRUNETTO, 2010), aspecto não observado em nosso estudo, pois os tutores seguiram adequadamente o protocolo estabelecido.

Todos os animais do grupo obeso apresentavam ECC 9, o que indica obesidade. Ao exame de composição corporal, a porcentagem média de massa gorda desses animais foi superior a 40% e, é importante salientar que estes cães estavam obesos há pelo menos 2 anos. O ponto-chave de um programa de perda de peso é a redução da ingestão energética (LINDER et al., 2012; LINDER et al., 2013), a fim de promover o balanço energético negativo associado à manutenção da massa magra (MICHEL, 2012), e isto foi observado em nosso estudo, pois apesar da diferença de composição de massa gorda, a massa magra não apresentou diferenças após o emagrecimento, exceto quando expressa em porcentagem, onde a diferença é apenas observada por um quesito de relação percentual. Isso é essencial, pois o tecido muscular corporal é metabolicamente ativo e garante maior gasto energético (LAFLAMME et al., 1997b).

Ao estudar a microbiota intestinal, diversos fatores como método de sequenciamento, tipo de amostra, genótipo, idade e sexo do hospedeiro, ambiente e dieta podem interferir nos resultados (BENSON et al., 2010; YATSUNENKO et al., 2012; BOLNICK et al., 2014; XU e KNIGHT, 2015). Dessa forma, além dos cuidados com a padronização dos animais e métodos de coleta e sequenciamento, neste estudo, o delineamento foi realizado de forma que tivéssemos atenção especial em dois momentos: o período de padronização da dieta e do programa de perda de peso. O período de padronização da dieta, no qual os cães obesos e controle foram incluídos no início do estudo, teve como proposta diminuir a variação de composição entre os diferentes alimentos consumidos pelos animais antes de participarem do estudo, fator citado como importante na caracterização da microbiota fecal (HANDL et al., 2013; XU e KNIGHT, 2015). Dessa forma, pode-se afirmar com mais certeza que os resultados do perfil de microrganismos observado entre os animais obesos e controle apresentaram menor influência dietética, mesmo se tratando de animais de diferentes proprietários. Outro importante cuidado no delineamento do estudo foi com relação aos programas de perda de peso. As estratégias utilizadas durante este período para garantir o sucesso do emagrecimento envolvem o perfil do alimento (CARCIOFI et al., 2005; BRUNETTO et al., 2011b; BROOKS et al., 2014; PEREIRA-NETO et al., 2018) e, portanto, os efeitos do consumo de dietas hipocalóricas, com alto teor de proteína e reduzido teor de gordura, associado a restrição energética não puderam ser separados dos nossos resultados. Assim, foi possível avaliar os efeitos do emagrecimento e todas as estratégias atreladas a ele. Além disso, vale ressaltar que este estudo é um dos poucos que avaliaram o efeito do emagrecimento na microbiota fecal de cães naturalmente obesos (KIELER et al., 2017). O presente trabalho forneceu uma comparação experimental detalhada de filos e gêneros bacterianos encontrados nas fezes de cães na condição obesa e após a redução de 20% do peso corporal dos mesmos animais e de cães em escore de condição corporal ideal.

Embora ainda controverso, é ao nascimento que o trato gastrintestinal dos mamíferos passa a ser colonizado pelos microrganismos, o que leva também à colonização de praticamente todas as estruturas do hospedeiro que estão em contato direto com o ambiente externo (PALMER, 2007; DOMINGUEZ-BELLO, 2010; HEISS, 2018). O intestino, particularmente o cólon, possui maior abundância em bactérias, vírus, fungos e archea (ECKBURG et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2007; SUCHODOLSKI, 2011; ZHAO, 2013; SHREINER et al., 2015). A microbiota intestinal é composta por milhões de microrganismos e varia ao longo do órgão, principalmente devido as diferenças de pH e concentração de oxigênio. Estes fatores afetam a capacidade de diferentes bactérias colonizarem o intestino, levando a variações regionais na

composição da microbiota (DONALDSON et al., 2016). O ambiente luminal e mucosas do intestino delgado apresentam em maior parte microrganismos facultativos anaeróbicos e aero tolerantes, enquanto no cólon, observa-se principalmente microrganismos estritamente anaeróbicos (DONALDSON et al., 2016). Em humanos, a maioria dos microrganismos pertencem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes e, em menor grau, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria e Euryarchaeota (BACKHED et al., 2015). Em trabalho realizado por Suchodolski et al. (2008), os autores identificaram em cães saudáveis a predominância da ordem *Clostridiales*, do filo Fimicutes, no duodeno (40%) e jejuno (39%), e estes eram altamente abundantes no íleo (25%) e no cólon (26%). Além disso, os gêneros *Clostridium cluster XI* e *Clostridium cluster XIVa*, do mesmo filo, eram mais abundantes no intestino delgado e cólon proximal, respectivamente. Fusobacteriales e Bacteroidales foram a ordem bacteriana mais abundante no íleo (33%) e no cólon (30%). As Enterobacteriales foram mais comumente observadas no intestino delgado do que no cólon e Lactobacillales foram identificadas em todos os segmentos do intestino. Honneffer et al. (2017), por meio de análise molecular de sequenciamento 16S rRNA de amostras do duodeno, íleo, cólon e reto de cães adultos saudáveis, encontraram prevalência nos filos Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria e Bacteroidetes. Exceto Fusobacteria, todos os filos demonstraram abundância alterada nas diferentes porções do intestino após a correção para múltiplas comparações e, quando contrastados em pares de região, o filo Actinobacteria teve menor concentração em íleo comparado ao reto e, Proteobacteria apresentou maior concentração em duodeno comparado a reto. Semelhante ao encontrado nos estudos citados, no presente trabalho foram encontrados os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria nos três grupos experimentais, de forma que, a prevalência em cães com escore de condição corporal ideal foi de Firmicutes (71,98%), seguido de Bacteroidetes (15,66%) e Fusobacteria (9,45%). Neste mesmo grupo de cães em escore ideal, a predominância do gênero *Clostridium* foi observada.

A estreita interação entre o hospedeiro e a microbiota intestinal pode influenciar no desenvolvimento, fisiologia e metabolismo do hospedeiro (ZEISEL, 2004; SONNENBURG, 2005; NRC, 2006; CHANG et al., 2009; FUKUDA, 2011 TIZARD et al., 2018). Em adição a esta estreita relação, as alterações na composição das comunidades comensais residentes em relação à comunidade encontrada em indivíduos saudáveis também estão relacionadas com diversas alterações fisiológicas já descritas neste trabalho. Assim, evidências demonstraram que os membros da microbiota têm contribuições diversas e não redundantes para a saúde do hospedeiro, como microrganismos que promovem o desenvolvimento de redes anti-

inflamatórias, enquanto outros induzem respostas inflamatórias protetoras (FAITH, 2014) ou estão relacionados ao metabolismo de ácidos graxos (TURNBAUGH et al., 2006; SAMUEL et al., 2008), outros participam da biossíntese de vitaminas (NICHOLSON et al., 2012), metabolizam lipídeos (CANI et al., 2007; SERINO et al., 2012) e ácidos biliares (SWANN et al., 2011). Além disso, embora algumas interações entre hospedeiro e microbiota possam ser iniciadas por várias espécies, outras envolvem um relacionamento mais intenso com membros exclusivos da comunidade (FAITH, 2014). Sob este aspecto, segundo Petersen e Round (2014), um importante fator relacionado à disbiose pode ser a perda da diversidade microbiana total. Em estudo realizado por Li et al. (2017), os autores apontaram que o aumento da diversidade pode ser um fator importante ou até um marcador de microbiota saudável do microbioma canino, contudo, mais estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese em cães. Em trabalho realizado por Handl et al. (2013), os autores ao avaliarem cães Beagle de proprietários, tanto em condição corporal ideal quanto obesos, não observaram diferenças no índice de diversidade de Shannon (diversidade alfa), uniformidade (homogeneidade) e no número de unidades taxonômicas operacionais (OTU), quando compararam cães obesos e magros; porém, os autores não correlacionaram estas informações como algo desejável ou não. Salas et al. (2018), utilizaram a metodologia de sequenciamento de próxima geração (*next generation system - NSG*) para avaliar as fezes de seis cães Beagle de um centro de pesquisa antes e após o emagrecimento. Neste estudo, os pesquisadores encontraram menor número de OTUs para gênero e espécie em cães emagrecidos, no entanto, o número total estimado de espécies foi maior nestes mesmos animais (por meio do índice Chao), apesar da manutenção da uniformidade (medida de diversidade relacionada a homogeneidade da distribuição de abundância) e diversidade de espécies (índice de diversidade de Shanon). O trabalho concluiu que a biodiversidade da microbiota aumentou entre o início do emagrecimento e o fim. Em nosso estudo, o emagrecimento resultou em diminuição do número de OTUs e não houve alteração na diversidade alfa (riqueza e diversidade das espécies em um determinado habitat) das fezes entre os grupos controle, obesos e emagrecidos, entretanto, a uniformidade foi semelhante entre os animais controle e emagrecidos e maior nas fezes de cães obesos em comparação com as fezes dos cães emagrecidos e em condição corporal ideal. Esse resultado pode sugerir que o emagrecimento aumentou a biodiversidade dos cães emagrecidos, descrito acima como possível marcador de microbiota saudável do microbioma canino.

Fortes evidências reforçam a ligação etiológica entre obesidade e certas formas de disbiose intestinal em humanos e animais modelo (BACKHED et al., 2004; TURNBAUGH et al., 2006; LEY et al., 2010) e cães (HANDL et al., 2013; KIELER et al., 2017; SALAS et al.,

2018). Para Barko et al. (2018), as células dos microrganismos e do hospedeiro compõem um organismo híbrido multiespecífico que atua de forma dinâmica e simbiótica em termos de composição celular, diversidade genética e capacidade metabólica. O genoma destes microrganismos que habitam o trato gastrointestinal (o microbioma) codificam capacidades metabólicas não desenvolvidas pelos seres humanos (TURNBAUGH et al., 2006; BACKHED et al., 2015). Assim, as alterações na microbiota intestinal, que ocorrem pela diminuição da diversidade de espécies, mudanças no ambiente inflamatório intestinal e sistêmico e as relações metabólicas alteradas entre os microrganismos e hospedeiro (BARKO et al., 2018), podem ter associação com a obesidade. Estes mecanismos podem ser explicados pelo aumento do aproveitamento da energia da dieta (BACKHED et al., 2004; TURNBAUGH et al., 2006), alterações induzidas por microrganismos no metabolismo lipídico do hospedeiro, sinalização microbiana através dos sistemas endócrinos do hospedeiro e inflamação crônica de baixo grau, levando à resistência à insulina (CANI et al., 2007; LEY, 2010).

Um estudo metagenômico conduzido por Turnbaugh et al. (2006) descobriu que a microbiota fecal de seres humanos obesos possui maior quantidade de genes que determinam o aproveitamento de energia da dieta através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os AGCCs são uma fonte de energia direta, mas também são moléculas de sinalização, que atuam em receptores (GPR41) nas células enteroendócrinas para diminuir o tempo de trânsito intestinal, aumentar a recuperação de AGCCs e promover a adiposidade (SAMUEL, 2008). Além disso, a capacidade aprimorada da microbiota intestinal em degradar compostos indigestíveis da dieta pode ter um impacto no balanço energético, ou seja, afeta o equilíbrio entre a quantidade de energia ingerida como alimento e a quantidade gasta durante o metabolismo em repouso, bem como o efeito térmico da comida, atividade física e perda nas fezes e na urina (TURNBAUGH et al., 2006). Os mesmos autores apontaram que o aproveitamento da energia da dieta produzida por mudanças na ecologia microbiana intestinal não precisa ser grande para contribuir no ganho de peso (TURNBAUGH et al., 2006). Em seres humanos, pequenas alterações no balanço energético, ao longo de um ano, podem resultar em mudanças significativas no peso corporal (FLEGAL & TROIANO, 2000). Em estudo conduzido com animais modelo (camundongos), os autores verificaram que a microbiota suprime, no intestino, a expressão do fator de adipócito induzido pelo jejum (Fiaf, em inglês, *Fasting-induced adipocyte factor*), um inibidor da lipoproteína lipase (LPL). A presença dos microrganismos no trato gastrointestinal resulta, portanto, no aumento da LPL, que nos adipócitos melhora o armazenamento de triglicerídeos derivados do fígado (BACKHED et al.,

2004). Esta pesquisa sugere que animais livres de microrganismos são “protegidos” da obesidade induzida pelo consumo de alimentos com alto teor de gordura e açúcar. Além disso, o transplante de microbiota convencional nos camundongos adultos livres de microrganismos resultou em aumento importante na gordura corporal, apesar da restrição energética (BACKHED et al., 2004).

O aumento da adiposidade, assim como o metabolismo alterado de lipídeos e carboidratos, pode estar relacionado à mudanças no microbioma através de vários mecanismos, incluindo interações com o sistema imune inato e inflamação através de receptores *toll-like*, absorção intestinal e permeabilidade aos lipopolissacarídeos (LPS) e modificações bacterianas do ácido biliar (CAESAR, 2010; JOYCE, 2014). O lúmen intestinal humano serve como reservatório de LPS, que é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas (BERG, 1996). Estudo em humanos, sugere que o LPS é absorvido continuamente a uma taxa baixa no intestino (CREELY, 2007); e Cani et al. (2007) ao avaliarem camundongos, demonstraram ligação direta entre concentrações plasmáticas de LPS e doenças metabólicas por infusão crônica de baixas concentrações de LPS por via subcutânea, por 4 semanas. O aumento de LPS circulante correspondeu às concentrações observadas em camundongos alimentados com dieta com alta gordura e resultou em aumentos similares na glicemia de jejum e insulinemia. As concentrações aumentadas de LPS correlacionaram-se com o aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo e resistência insulínica. Em um recente trabalho, com objetivo de determinar a importância destes metabólitos na modulação da saúde intestinal, camundongos *germ-free* foram colonizados com uma cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* deficiente em esfingolipídeos (BROWN et al., 2019). Os esfingolipídeos são amino-alcóois alifáticos que servem como componentes estruturais ubíquos de todas as membranas celulares eucarióticas e algumas procarióticas (HANNUN e OBEID, 2018), as quais são importantes moléculas sinalizadoras na regulação da inflamação, imunidade, autofagia, crescimento e sobrevivência (SPIEGEL & MILSTIEN, 2011; MACEYKA & SPIEGEL, 2014; MERRILL & CARMAN, 2015; HANNUN & OBEID, 2018). A deficiência de esfingolipídeos derivados de bacteroides em camundongos resultou em inflamação intestinal e alteração de ceramidas do hospedeiro, sugerindo que a produção de esfingolipídeos derivados de Bacteroides é essencial para a manutenção da homeostase e relação simbiótica com hospedeiros mamíferos (BROWN et al., 2019). Em nosso estudo, não houve diferença de abundância do gênero Bacteroides em animais obesos e controle quando comparados entre si, entretanto, os cães emagrecidos tiveram

maior concentração em relação ao grupo controle. Este resultado pode indicar possível melhora na relação simbiótica entre hospedeiro e microbiota intestinal.

Estudos observaram que o aumento na proporção do filo Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes podem ter relação com o desenvolvimento da obesidade. Ley et al. (2006), compararam camundongos geneticamente obesos e camundongos selvagens e, descobriram mudança marcante na composição microbiana de ratos obesos, caracterizada por aumento proporcional em Firmicutes e redução na abundância do filo Bacteroidetes. Diversos estudos descreveram resultados semelhantes em animais modelo (TURNBAUGH et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2009b), humanos (TURNBAUGH et al., 2009a) e cães (MIDDELBOS et al., 2010; HANDL et al., 2013). No entanto, com os avanços das ciências "ômicas" de avaliação, verificou-se que a explicação da obesidade baseada somente em uma relação proporcional de níveis taxonômicos não é a mais adequada. Schwiertz et al. (2009) verificaram que a proporção de Firmicutes e Bacteroidetes não é determinante para ocorrência de obesidade, mas pode ser devido a quantidade de AGCC produzida por cada grupo bacteriano. No mesmo estudo (SCHWIERTZ et al. 2010), ao compararem dois grupos de pessoas, os autores encontraram menor concentração de Firmicutes no grupo obeso, resultado semelhante ao nosso estudo, no qual houve maior abundância de Firmicutes em animais obesos emagrecidos. Assim, uma das interpretações para a manifestação da obesidade consiste na excessiva produção de AGCC a partir dos carboidratos não digestíveis, aspecto que precisa ser melhor estudado em cães. Tagliabue e Elli (2013) apontaram que essa hipótese de maior "aproveitamento de energia" por pessoas obesas vai contra algumas informações publicadas em estudos epidemiológicos humanos, que sugerem que a alta ingestão de fibra alimentar (a principal fonte de AGCCs, produzidos por fermentação) inibe o desenvolvimento da obesidade. Em nosso estudo, a maior relação de Fimicutes e Bacteroiodetes foi observado em animais controle e o emagrecimento aumentou esta proporção nos animais emagrecidos ao consumir a dieta de emagrecimento contendo altos teores de fibra alimentar (6,4g/1000kcal no alimento controle e 34,8g/1000kcal no alimento coadjuvante para emagrecimento).

Ainda sobre emagrecimento e dieta, Li et al. (2017) encontraram diminuição na razão de Firmicutes e Bacteroidetes ao avaliarem Beagles e Labradores retrievers obesos e alimentados com dietas formuladas com altos teores de carboidratos em comparação com alimento de alta proteína. Em humanos, Damms-Machado et al. (2015) verificaram que o consumo de dietas com baixo teor de gordura resulta em aumento da razão Bacteroidetes/Firmicutes. Entretanto, resultados contrários já foram observados também em

seres humanos adultos, onde alguns autores verificaram diminuição entre Firmicutes e Bacteroidetes, após a perda de peso, quando comparados com aqueles que foram alimentados com dieta de baixa caloria (REMELY et al., 2015). Além disso, Ridaura et al. (2013) ao avaliarem a adição de microrganismos em animais modelo (camundongo), com a microbiota intestinal de gêmeos humanos magros e obesos, observaram que a colonização por Bacteroidetes nos animais modelo transplantados com a microbiota dos gêmeos obesos resultou em diminuição da adiposidade, quando comparado com animais magros que habitavam o mesmo ambiente e alimentados com dietas de baixo teor de gorduras e polissacarídeos vegetais. Estes resultados sugerem que espécies específicas da microbiota intestinal contribuem para a supressão da obesidade e que a gênese desta doença tem interferência da dieta também. Em nosso estudo, altas concentrações de Bacteroidetes (ao nível de significância de 10%) foram observadas e, portanto, desejada no grupo de cães emagrecidos. Outros autores não encontraram diferenças nas concentrações de Bacteroidetes entre seres humanos adultos magros, obesos e até seis meses após cirurgia gástrica do tipo *by-pass* (ZHANG et al., 2009) e crianças obesas e magras (BALAMURUGAN et al., 2010). Em nosso trabalho, cães obesos não apresentaram diferença em relação ao filo Actinobacteria quando comparado com o grupo de cães em ECC ideal, entretanto, já foi relatado aumento deste filo em cães obesos e em sobrepeso (HANDL et al., 2013, FORSTER et al., 2018).

No estudo realizado por Li et al. (2016), os autores compararam cepas desenvolvidas em laboratório de *Bifidobacterium bifidum BGN4* e *Bifidobacterium longum BORI* com cepas de *Lactobacillus casei IBS041* e *Lactobacillus acidophilus AD031* para avaliar seus possíveis efeitos anti-obesidade. Os animais modelo, que consumiram dietas de baixa gordura, alta gordura ou alta gordura associada a uma das cepas, não apresentaram diferença na quantidade de alimento consumida, entretanto a cepa de *Bifidobacterium longum BORI* inibiu o ganho de peso nos camundongos, sem afetar a ingestão de alimentos e, os grupos suplementados apresentaram adipócitos com tamanhos significativamente menores do que os do grupo que consumiram dieta de alta gordura. Estudos anteriores relataram que algumas cepas de lactobactérias e bifidobactérias poderiam suprimir o ganho de peso de murinos alimentados com uma dieta rica em gorduras (AN et al., 2011; WANG et al., 2015). Hamad et al. (2009) relataram diminuição na absorção linfática de triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol em ratos alimentados com leite fermentado por *Lactobacillus gasseri* SBT2055. Em nosso estudo, o grupo obeso não apresentou contagem para o gênero *Bifidobacterium* e, portanto, não foi possível de ser comparado com os grupos controle e emagrecidos. Entretanto, após o

emagrecimento houve o aparecimento deste gênero bacteriano, grupo importante para a manutenção do peso corporal após o programa de perda de peso.

Kieler et al. (2017) avaliaram a microbiota de 18 cães adultos durante o emagrecimento por um período de 12 semanas e encontraram como maior prevalência o gênero *Fusobacterium*, seguido de *Bacteroides*, independente do programa de perda de peso (dieta associada a atividade física ou apenas dieta). O mesmo estudo também apontou diferenças na microbiota entre o início e a sexta semana, assim como entre o início e a décima segunda semana de emagrecimento, para os gêneros *Sutterella, Fusobacterium* e *Megamonas*; no entanto, não foi observada diferença para o gênero *Faecalibacterium*. Além disso, os autores avaliaram possível correlação entre a taxa de perda de peso e a microbiota. A redução de contagem no gênero *Megamonas* apresentou correlação com taxa de perda de peso mais rápida (≥ 1% por semana) entre a semana zero e a sexta semana; e não foi encontrada correlação entre a taxa de perda de peso e as mudanças nos gêneros *Suterella* e *Fusobacterium*. Em nosso estudo, os gêneros *Megamonas* e *Suturella* não variaram entre os três grupos.

Em estudo realizado por Remely et al. (2015), o qual avaliou a influência da dieta na microbiota fecal de trinta e três pessoas adultas obesas com base no 16S rDNA com PCR quantitativo em tempo real, foi observado aumento das espécies *Clostridium cluster IV* e *Faecalibacterium prausnitti* produtores de butirato, durante a intervenção dietética recomendada pelas diretrizes da Sociedade Alemã, Austríaca e Suíça de Nutrição para "prevenção e terapia da obesidade". Nossos resultados indicam redução da concentração relativa do gênero *Faecalibacterium* em cães emagrecidos em relação ao grupo obeso. Em humanos, os grupos bacterianos *Roseburia spp*. e *Faecalibacterium prausnitzii* são os principais produtores de butirato (LOUIS e FLINT, 2009) e o *Faecalibacterium prausnitzii* é uma das espécies microbianas mais comuns no trato gastrointestinal saudável (SCOTT et al., 2013). Esta espécie foi descrita como menos abundante em pessoas obesas e correlacionada de forma negativa com marcadores inflamatórios (SOKOL et al., 2008) por meio de mecanismos que envolvem a inibição da secreção de interleucina-8 (IL-8) ou indução de interleucina-10 (IL-10), o que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa ou interferon-gama (MURAI et al., 2009). Em resultados obtidos pelos mesmos cães deste estudo, Vendramini et al. (2019) observaram menor expressão gênica de mRNA para IL-8 nos cães emagrecidos quando comparado ao grupo obeso, o que pode indicar redução do estado inflamatório e melhora da saúde intestinal destes animais. O mesmo estudo não verificou diferença para TNF-alfa e IL-10 entre os três grupos avaliados.

Assim como os demais trabalhos que avaliaram a microbiota intestinal e fecal de cães, esta pesquisa ainda possui limitações que podem servir de ensinamento e direcionamento para futuros estudos. As principais limitações foram: o pequeno número de amostras, a grande variedade de raças e ampla diferença de idade entre os animais, a falta de uma segunda avaliação da microbiota fecal dos cães em escore ideal, após a ingestão da dieta com alta proteína e baixa gordura.

8 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados, nas condições de realização do presente estudo, confirmam a hipótese de que a composição da microbiota fecal de cães obesos é diferente da microbiota de cães em escore de condição corporal ideal. Além disso, o programa de perda de peso constituído de restrição energética associada ao emprego de um alimento hipocalórico comercial (baixa energia e alta fibra e proteína) promoveu mudanças na microbiota fecal, no entanto, sua constituição se manteve diferente da microbiota fecal de cães em escore corporal ideal. Ao final do estudo, os cães emagrecidos apresentaram composição microbiana com maior biodiversidade, maior abundância de Actinobacteria, Firmicutes e Dorea e menor de Faecalibacterium.

9 REFERÊNCIAS

AHIRWAR, R.; MONDAL, P. R. Prevalence of obesity in India: a systematic review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2019.

AN, H.M.; PARK, S.Y.; LEE, D.K.; KIM, J.R.; CHA, M.K.; LEE, S.W.; LIM, H.T.; KIM, K.J.; HA, N.J. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 116, 2011.

ARMOUGOM, F.; HENRY, M.; VIALETTES, B.; RACCAH, D.; RAOULT, D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients. **PloS one**, v. 4, n. 9, p. e7125, 2009.

ARPAIA, N.; CAMPBELL, C.; FAN, X., DIKIY, S.; VAN DER VEEKEN, J.; DEROOS, P.; LIU, H.; CROSS J. R.; PFEFFER, K.; COFFER, P. J.; RUDENSKY, A. Y. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature,** v. 504, p. 451, n. 7480, 2013.

ARRIETA, M.C.; FINLAY, B.; The intestinal microbiota and allergic asthma. **The Journal of Infection**, v. 69, p.53-55, 2014.

BACH, J. F.; ROZANSKI, E. A.; BEDENICE, D.; CHAN, D. L.; FREEMAN, L. M.; LOFGREN, J. L.; OURA, T. J.; HOFFMAN, A. M. Association of expiratory airway dysfunction with marked obesity in healthy adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 670- 675, 2007.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BACKHED, F.; ROSWALL, J.; PENG, Y.; FENG, Q.; JIA, H.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 5, p. 690-703, 2015.

BALAMURUGAN, R.; GEORGE, G.; KABEERDOSS, J.; HEPSIBA, J.; CHANDRAGUNASEKARAN, A. M.; RAMAKRISHNA, B. S. Quantitative differences in intestinal Faecalibacterium prausnitzii in obese Indian children. **British journal of nutrition,** v. 103, n. 3, p. 335-338, 2010.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. **The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity Related Inflammatory Diseases**. Mediators of Inflammation. 2010.

BANSAL, T.; ALANIZ, R. C.; WOOD, T. K.; JAYARAMAN, A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. **Proc Natl Acad Sci USA,** v. 107, n. 1, p. 228-233, 2010.

BARKO, P. C.; MCMICHAEL, M.A.; SWANSON, K.S.; WILLIANS D. A. The gastrointestinal microbiome: a review. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 32, n. 1, p. 9-25, 2018.

BENSON, A. K.; KELLY, S. A.; LEGGE, R.; MA, F.; LOW, S. J.; KIM, J.; ZHANG, M.; OH, P. L.; NEHRENBERG, D.; HUA, K.; KACHMAN, S. D.; MORIYAMA, E. N.; WALTER, J.; PETERSON, D. A.; POMP, D. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 44, p. 18933-18938, 2010.

BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in microbiology**, v. 4, n. 11, p. 430-435, 1996.

BRIGNARDELLO, J.; MORALES, P.; DIAZ, E.; ROMERO, J.; BRUNSER, O.; GOTTELAND, M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 32, n. 11-12, p. 1307-1314, 2010.

BROOKS, D.; CHURCHILL, J.; FEIN, K.; LINDER, D.; MICHEL, K. E.; TUDOR, K.; WITZEL, A. 2014 AAHA weight management guidelines for dogs and cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 50, n. 1, p. 1-11, 2014.

BROWN, C.T.; DAVIS-RICHARDSON, A.G.; GIONGO, A.; GANO, A. K.; CRABB, D. V.; MUKHERJEE, N.; CASELLA, G.; DREW, J. C.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYÖTY, H.; VEIJOLA, R.; SIMELL, T.; NEU, J.; WASSERFALL, C. H.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M. A.; TRIPLETT, E. W. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 257- 292, 2011.

BROWN, D. C., CONZEMIUS, M. G., SHOFER, F. S. Body weight as a predisposing factor for humeral condylar fractures, cranial cruciate rupture and intervertebral disc disease in Cocker Spaniels. **Veterinary Compedium Orthopedic**, v. 9, p. 75-78, 1996.

BROWN, E. M., KE, X., HITCHCOCK, D., JEANFAVRE, S., AVILA-PACHECO, J., NAKATA, T., ARTHUR, T. D.; FORNELOS, N.; HEIN, C.; FRANZOSA, E. A.; WATSON, N.; HUTTERNHOWER, C.; HAISER, H. J.; DILLOW, G.; GRAHAN, D. B.; FINLAY, B. B.; KOSTIC, A. D.; PORTER, J. A.; VLAMASKIS, H.; CLISH, C. B.; AVIER, R. J. Bacteroides-Derived Sphingolipids Are Critical for Maintaining Intestinal Homeostasis and Symbiosis. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 5, p. 668-680. e7, 2019.

BRUNETTO, M. A. **Perda de peso, indicadores do metabolismo de carboidratos e produção de citocinas em cães.** 95p. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2010.

BRUNETTO, M. A.; NOGUEIRA, S.; SÁ, F. C.; PEIXOTO, M.; VASCONCELLOS, R. S.; FERRAUDO, A. J.; CARCIOFI, A. C. Correspondência entre obesidade e hiperlipidemia em cães. **Ciência Rural**, v. 41, p. 266-271, 2011a.

BRUNETTO, M. A.; PEREIRA NETO, G. B.; TORTOLA, L.; PALUMBO, G. R.; JEREMIAS, J. T.; CAMACHO, A. A.; CARCIOFI, A. C. Taxas de perda de peso em cães obesos domiciliados e de canil submetidos a um mesmo protocolo de perda de peso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 26-28, 2008.

BRUNETTO, M. A.; SÁ, F. C.; NOGUEIRA, S. P.; GOMES, M. D. O. S.; PINAREL, A. G.; JEREMIAS, J. T.; PAULA, F. J. A.; CARCIOFI, A. C. The intravenous glucose tolerance and

postprandial glucose tests may present different responses in the evaluation of obese dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 194-197, 2011b.

BURKHOLDER, W. J. Precision and practicality of methods assessing body composition of dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 23, p. 1–10, 2001.

BURKHOLDER, W. J.; TOLL, P. W.; OBESITY IN: HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSH, P.; NORVOTNY, B. J. eds; **Small Animal Clinical Nutrition**, 4th ed. Mark Morris Institute, Topega, Ka, USA. 2000; p. 401-430.

CAESAR, R.; FÅK, F.; BÄCKHED, F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. **Journal of internal medicine,** v. 268, n. 4, p. 320-328, 2010.

CANI, P. D.; GEURTS, L.; MATAMOROS, S.; PLOVIER, H.; DUPARC, T. Glucose metabolism: focus on gut microbiota, the endocannabinoid system and beyond. **Diabetes & metabolism**, v. 40, n. 4, p. 246-257, 2014.

CANI, P.D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M.A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINCK, A.M.; FAVA, F.; TUOHY, K.M.; CHABO, C.; WAGET, A.; DELMÉE, E.; COUSIN, B.; SULPICE, T.; CHAMONTIN, B.; FERRIÈRES, J.; TANTI, JF.; GIBSON, G.R.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N.M.; ALESSI, M.C.; BURCELIN, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.

CARCIOFI, A. C.; GONÇALVES, K. N. V.; VASCONCELLOS, R. S.; BAZOLLI, R. S.; BRUNETTO, M. A.; PRADA, F. A weight loss protocol and owners participation in the treatment of canine obesity. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1331-1338, 2005.

CHANG C-Y, KE D-S, CHEN J-Y. Essential fatty acids and human brain. **Acta Neurol Taiwan,** v. 18, n. 4, p. 231-41, 2009.

CHIKAMUNE, T.; KATAMOTO, H.; OHASHI, F.; SHIMADA, Y. Serum lipid and lipoprotein concentrations in obese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, p. 595–598, 1995.

COLLIARD, L.; ANCEL, J.; BENET, J. J.; PARAGON, B.; BLANCHARD, G. Risk factors for obesity in dogs in France. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1951S-1954S, 2006.

CREELY, S.J.; MCTERNAN, P.G.; KUSMINSKI, C.M.; et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 3, p. E740-E747, 2007.

DAMMS-MACHADO, A.; MITRA, S.; SCHOLLENBERGER, A. E.; KRAMER, K. M.; MEILE, T.; KONIGSRAINER. A.; HUSUN, D. H.; BISCHOFF, C. Effects of surgical and dietary weight loss therapy for obesity on gut microbiota composition and nutrient absorption. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. **Annual review of nutrition,** v. 31, p. 15-31, 2011.

DEVITO, F. C.; PATRICIO, G. C. F.; RIZZO, M. F. C. I.; PACHECO, P. F.; FLOR, P. B.; BRUNETTO, M. A.; CORTOPASSI, S. R. G. Anestesia e obesidade canina? revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, v. 20, p. 42-52, 2015.

DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; COSTELLO, E.K.; CONTRERAS, M.; et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11971-11975, 2010.

DONALDSON, G.P.; LEE, S.M.; MAZMANIAN, S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20-32, 2016.

DUBOC, H.; RAJCA, S.; RAINTEAU, D.; BENAROUS, D.; MAUBERT, M. A.; QUERVAIN, E.; THOMAS, G.; BARBU, V.; HUMBERT, L.; DESPRAS, G.; BRIDONNEAU, C.; DUMETZ, F.; GRIL, J-P.; MASLIAH, J.; BEAUGERIE, L.; COSNES, J.; CHAZOUILLÈRES, O.; POUPON, R.; WOLF, C.; MALLET, J-M.; LANGELLA, P.; TRUGNAN, G.; SOKOL, H.; SEKSIK, P. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 531-539, 2013.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science,** v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

EDNEY, A. T. B.; SMITH, P. M. Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 118, p. 391–396, 1986.

FAITH, J.J.; AHERN, P.P.; RIDAURA, V.K.; CHENG, J.; GORDON, J.I. Identifying gut microbe–host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. **Science translational medicine**, v. 6, n. 220, p. 220ra11-220ra11, 2014.

FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.** The European Pet Food Industry Federation, Bruxelas, 2018.

FERRIER, L.; ROBERT, P.; DUMON, H.; MARTIN, L.; NGUYEN, P. Evaluation of body composition in dogs by isotopic dilution using a low-cost technique, Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1725-1727, 2002.

FLEGAL, K.M.; TROIANO, R.P. Changes in the distribution of body mass index of adults and children in the US population. **International journal of obesity**, v. 24, n. 7, p. 807-818, 2000.

FONSECA-ALANIZ, M. H., TAKADA, J., ALONSO-VALE, M. I. C., LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FORSTER, G. M.; STOCKMAN, J.; NOYES, N.; HEUBERGER, A. L.; BROECKLING, C. D.; BANTLE, C. M.; RYAN, E. P. A comparative study of serum biochemistry, metabolome and microbiome parameters of clinically healthy, normal weight, overweight, and obese companion dogs. **Topics in companion animal medicine**, v. 33, n. 4, p. 126-135, 2018.

FUKUDA, S.; TOH, H.; HASE, K.; OSHIMA, K.; NAKANISHI, Y.; YOSHIMURA, K.; TOBE, T.; CLARKE, J.M.; TOPPING, D.L; SUZUKI, T.; TAYLOR, T.D.; ITOH, K.;

KIKUCHI, J.; MORITA, H.; HATTORI, M.; OHNO, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, v. 469, p. 543-549, 2011.

GAYET, C., BAILHACHE, E., DUMON, H., MARTIN, L., SILIART, B., NGUYEN, P. Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNF, IGF-1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, p. 157-165, 2004.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1940-1946, 2006.

GERMAN, A. J., RYAN, V. H., GERMAN, A. C., WOOD, I. S., TRAYHURN, P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. **Veterinary Journal**, v. 185, p. 4–9, 2010.

GERMAN, A. J.; HOLDEN, S. L.; BISSOT, T.; HACKETT, R. M.; BIOURGE, V. Dietary energy restriction and successful weight loss in obese client-owned dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 1174-1180, 2007.

GIARETTA, P.R. et al. Bacterial Biogeography of the Colon in Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy. **Veterinary Pathology**, p. 0300985819891259, 2020.

GIL-CARDOSO K.; GINÉS, I.; PINENT, M.; ARDÉVOL, A.; BLAY, M.; TERRA, X. Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity. **Nutrition research reviews,** v. 29, n. 2, p. 234-248, 2016.

GONZALEZ-MUNIESA, P.; MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.; HU, F. B.; DESPRES, J. P.; MATSUZAWA, Y.; LOOS, R. J. F.; MORENO, L. A.; BRAY, G. A.; MARTINEZ, J. A. Obesity. **Nat Rev Dis Primers,** v. 3, n. 17034, 2017.

GOSSELLIN, J.; WREN, J. A.; SUNDERLAND, S. J. Canine obesity – an overview. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v. 30, p. 1-10, 2007.

HAMAD, E.M.; SATO, M.; UZU, K.; YOSHIDA, T.; HIGASHI, S.; KAWAKAMI, H.; KADOOKA, Y.; MATSUYAMA, H.; ABD EL-GAWAD, I.A.; IMAIZUMI, K. Milk fermented by Lactobacillus gasseri SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. **British journal of nutrition**, v. 101, n. 5, p. 716-724, 2009.

HANDL S.; DOWD S. E.; GARCIA-MAZCORRO J. F.; STEINER J. M.; SUCHODOLSKI J. S. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. FEMS microbiology ecology, v. 76, n. 2, p. 301-310, 2011.

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 microbiology ecology, v. 84, n. 2, p. 332-343, 2013.

HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nature reviews Molecular cell biology**. v. 9, n. 2, p. 139, 2008.

HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 3, p. 175, 2018.

HEISS, C.N.; OLOFSSON, L.E. Gut microbiota-dependent modulation of energy metabolism. **Journal of innate immunity,** v. 10, n. 3, p. 163-171, 2018.

HENDRICKS, J. C. Brachycephalic airway syndrome. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 22, p. 145-1153, 1992.

HOLMES, K. L.; MORRIS, P. J.; ABDULLA, Z.; HACKETT, R.; RAWLINGS, J. M. Risk factors associated with excess body weight in dogs in the UK. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, v. 91, n. 3-4, p. 166-167, 2007.

HONNEFFER, J. B.; GUARD, B.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Mo1805 Untargeted metabolomics reveals disruption within bile acid, cholesterol, and tryptophan metabolic pathways in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 148, n. 4, p. S-715, 2015.

HONNEFFER, J. B.; STEINER, J. M.; LIDBURY, J. A.; SUCHODOLSKI, J. S. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. **Metabolomics**, v. 13, n. 3, p. 26, 2017.

HUTCHINSON, D.; FREEMAN, L.; SCHREINER, K. Requirements of sênior dogs and analysis of nutrient profiles of commercially available diets for senior dogs. **Intern J Appl Res Vet Med,** v. 9, n. 1, p. 68-79, 2011.

ISAIAH A.; PARAMBETH J. C.; STEINER J. M.; LIDBURY J. A.; SUCHODOLSKI JS. The fecal microbiome of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. **Anaerobe,** v. 45, p. 50-58, 2017.

JEFFERY, N. D.; BARKER, A. K.; ALCOTT, C. J.; LEVINE, J. M.; MEREN, I.; WENGERT, J.; JERGENS, A. E.; SUCHODOLSKI, J. S. The association of specific constituents of the fecal microbiota with immune-mediated brain disease in dogs. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170589, 2017.

JEUSETTE, J.; DETILLEUX, J. D.; SHIBATA, H.; SAITO, M.; HONJOH, T.; DELOBEL, A.; ISTASSE, L.; DIEZ, M. Effects of chronic obesity and weight loss on plasma gherlin and leptin concentrations in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 169–175, 2005.

JOYCE, S. A.; MACSHARRY, J.; CASEY, P. G.; KINSELLA, M.; MURPHY, E. F.; SHANAHAN, F.; HILL, C.; GAHAN, C. G. Regulation of host weight gain and lipid metabolismo by bacterial bile acid modification in the gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 111, n. 20, p. 7421-7426, 2014.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. K.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6 ed., San Diego: Academic Press, 928p, 2008.

KATHRANI, A.; HOLDER, A.; CATCHPOLE, B.; ALVAREZ, L.; SIMPSON, K.; WERLING, D.; ALLENSPACH, K. TLR5 risk-associated haplotype for canine inflammatory bowel disease confers hyper-responsiveness to flagellin. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30117, 2012.
KEALY, R. D.; LAWLER D. F.; BALLAM, J. M.; LUST, G.; SMITH, G. K.; BIERY, D. N.; OLSSON, S. E. Five-year longitudinal study on limited food consumption and development of osteoarthritis in coxofemural joints of dogs. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 210, p. 222-225, 1997.

KEALY, R. D.; LAWLER, D. F.; BALLAM, J. M.; MANTZ, S. L.; BIERY, D. N.; GREELEY, E. H.; LIST, G.; SEGRE, M.; SMITH, G. K.; STOWE, H. D. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 1315–1320, 2002.

KEALY, R. D.; LAWLER, D. F.; BALLAM, J. M.; LUST, G.; BIERY, D. N.; SMITH, G. K.; MANTZ, S. L. Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, p. 1678-168 0, 2000.

KIELER, I. N.; KAMAL, S. S.; VITGER A. D.; NIELSEN D. S.; LAURIDSEN C.; BJORNVAD, C. R. Gut microbiota composition may relate to weight loss rate in obese pet dogs. **Veterinary medicine and science**, v. 3, n. 4, p. 252-262, 2017.

KNIGHT, R.; CALLEWAERT, C.; MAROTZ, C.; HYDE, E. R.; DEBELIUS, J. W.; MCDONALD, D.; SOGIN, M. L. The microbiome and human biology. **Annual review of genomics and human genetics**. v. 18, p. 65-86, 2017.

KÖBERLIN, M. S.; SNIJDER, B.; HEINZ, L.X.; BAUMANN, C. L.; FAUSTER, A.; VLADIMER, G. I.; GAVIN, A. C.; SUPERTI-FURGA, G. A conserved circular network of coregulated lipids modulates innate immune responses. **Cell**, v. 162, n. 1, p. 170-183, 2015.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635, 2000.

LAFLAMME, D. P. Companion Animals Symposium: obesity in dogs and cats: What is wrong with being fat? **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1653-1662, 2012.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, v. 22(3), p. 10- 15, 1997a.

LAFLAMME, D. P.; KUHLMAN, G.; LAWLER, D. F. Evaluation of weight loss protocols for dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 33, p. 253-259, 1997b.

LARSEN, J. A.; VILLAVERDE, C. Scope of the problem and perception by owners and veterinarians. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 46, n. 5, p. 761-772, 2016.

LARSEN, N.; VOGENSEN, F. K.; VAN DEN BERG, F. W.; NIELSEN, D. S.; ANDREASEN, A. S.; PEDERSEN, B. K.; AL-SOUD, W. A.; SORENSEN, S. J.; HANSEN, L. H.; JAKOBSEN, M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PLoS One**, v.5, n.2, p.e9085, 2010.

LEE, W.J.; HASE, K. Gut microbiota–generated metabolites in animal health and disease. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 6, p. 416, 2014.

LEY, R. E.; TURNBAUGH. P.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Human gut microbes associated with obesity. **Nature,** v. 444, n. 7122, p. 1022, 2006.

LEY, R.E. Obesity and the human microbiome. **Current opinion in gastroenterology**, v. 26, n. 1, p. 5-11, 2010.

LI, Q.; LAUBER, C. L.; CZARNECKI-MAULDEN, G.; PAN, Y.; HANNAH, S. S. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. **MBio**, v. 8, n. 1, p. e01703-16, 2017.

LI, Z.; JIN, H., OH, S. Y.; JI, G. E. Anti-obese effects of two Lactobacilli and two Bifidobacteria on ICR mice fed on a high fat diet. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 480, n. 2, p. 222-227, 2016.

LINDER, D. E.; FREEMAN, L. M.; MORRIS, P.; GERMAN, A. J.; BIOURGE, V., HEINZE, C.; ALEXANDER, L. Theoretical evaluation of risk for nutritional deficiency with caloric restriction in dogs. **The Veterinary Quarterly**, v. 9, p. 123–129, 2012.

LINDER, D. E.; FREEMAN, L. M.; HOLDEN, S. L.; BIOURGE, V.; GERMAN, A. J. Status of selected nutrients in obese dogs undergoing caloric restriction. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 219, 2013.

LOUIS, P; FLINT, H.J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. **FEMS microbiology letters**, v. 294, n. 1, p. 1-8, 2009.

LUND, E. M.; ARMSTRONG, P. J.; KIRK, C. A.; KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factor for obesity in adult cats from private US veterinary practices. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, p. 88-96, 2005.

LYU Y.; LIU D.; VAN DE WIELE T.; VILCHEZ-VARGAS R.; PIEPER D.; HESTA M. **Obese dogs display higher abundance of fecal microbial genera Bacteroides, Sutterella and Fusobacterium than lean dogs.** In Proceedings of 23° Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, 2019, Turim.

MACEYKA, M., AND SPIEGEL, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. **Nature,** v. 510, n. 7503, p. 58, 2014.

MANCHESTER, A. C.; HILL, S.; SABATINO, B.; ARMENTANO, R.; CARROLL, M.; KESSLER, B.; MILLER, M.; DOGAN, B.; SIMPSON, K. W. Association between granulomatous colitis in French Bulldogs and invasive Escherichia coli and response to fluoroquinolone antimicrobials. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 1, p. 56-61, 2013.

MAO, J.; XIA, Z.; CHEN, J.; YU, J. Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, p. 438-442, 2013.

MCCRORY, M. A.; FUSS, P. J.; SALTZMAN, E.; ROBERTS, S. B. Dietary determinants of energy intake and weight regulation in healthy adults. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 276S-279S, 2000.

MCGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; PRIDE, C.; FAWCETT, A.; GRASSI, T.; JONES, B. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. **Veterinary Record**, v. 156(22), p. 695-702, 2005.

MERRILL, A. H.; CARMAN, G. M. Introduction to thematic minireview series: novel bioactive sphingolipids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 25, p. 15362-15364, 2015.

MICHEL, K. E. **Nutritional management of body weight**. In: FASCETTI, A. J.; DELANEY, S. J. editors. Apllied veterinary clinical nutrition. Chichester (United Kingdom): Wiley-Blackwell, 109-124, 2012.

MICHEL, K. E.; ANDERSON, W.; CUPP, C.; LAFLAMME, D. P. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy x-ray absorptiometry. **British Journal of Nutrition**, 106, 57–59, 2011.

MIDDELBOS, I. S.; BOLER, B. M. V.; QU, A.; WHITE, B. A.; SWANSON, K. S.; FAHEY JR, G. C. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9768, 2010

MINAMOTO, Y. et al. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 4, p. 1608-1618, 2019.

MINAMOTO, Y.; OTONI, C. C.; STEELMAN S. M.; BÜYÜKLEBLEBICI, O.; STEINER, J. M.; JERGENS, A. E.; SUCHODOLSKI J. S. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut microbes**, v. 6, n. 1, p. 33-47, 2015.

MONTOYA-ALONSO, J. A.; BAUTISTA-CASTAÑO, I.; PEÑA, C.; SUÁREZ, L. M.; JUSTE, C.; TVARIJONAVICIUTE, A. Prevalence of canine Obesity, Obesity-related Metabolic Dysfunction, and relationship with Owner Obesity in an Obesogenic region of spain. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 59-65, 2017.

MURAI, M.; TUROVSKAYA, O.; KIM, G.; MADAN, R.; KARP, C.; CHEROUTRE, H.; KRONENBERG, M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nature immunology**, v. 10, n. 11, p. 1178, 2009.

NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E.; KINROSS, J.; et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 2012.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC. **Nutrient requirements of dogs**. Washington: National Academy Press, 398p, 2006.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Obesity and overweight**. Disponível em: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight, 2018.

OSTO, M.; LUTZ, T. A. Translational value of animal models of obesity – Focus on dogs and cats. **European Journal of Pharmacology**, p. 759, v. 240-252, 2015.

PARK H.J.; LEE S.E.; KIM H.B.; ISAACSON R.E.; SEO K.W.; SONG K.H. Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in beagle dogs. Journal of veterinary internal medicine, v. 29, n. 1, p. 43-50, 2015.

PEREIRA-NETO, G. B., BRUNETTO, M. A., OBA, P. M., CHAMPION, T., VILLAVERDE, C., VENDRAMINI, T. H. A., BALIEIRO, J. C. C., CARCIOFI, A. C. ; CAMACHO, A. A. Weight loss improves arterial blood gases and respiratory parameters in obese dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, p. 1743-1748, 2018.

PEREIRA-NETO, G. B.; BRUNETTO, M. A.; CHAMPION, T., ORTIZ, E., CARCIOFI, A. C.; CAMACHO, A. A. Avaliação da pressão arterial sistêmica em cães obesos: comparação entre os métodos oscilométrico e doppler ultrassônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 87-91, 2014.

PEREIRA-NETO, G. B.; BRUNETTO, M. A.; SOUSA, MARLOS G.; CARCIOFI, A. C.; CAMACHO, A. A. Effects of weight loss on the cardiac parameters of obese dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 167-171, 2010.

PETERSEN, C.; ROUND, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cell Microbiology**, v. 16, n.70, p. 1024-1033, 2014.

PIANTEDOSI, D., DI LORIA, A., GUCCIONE, J., DE ROSA, A., FABBRI, S., CORTESE, L., CARTA, S., CIARAMELLA, P. Serum biochemistry profile, inflammatory cytokines, adipokines and cardiovascular findings in obese dogs, **The Veterinary Journal**, v. 216, p. 72-78, 2016.

PORSANI, M.; F. A. Teixeira; V. Vasques Oliveira; V. Pedrinelli; C. Marinelli Martins; Brunetto M. A. **Frequency of canine obesity in veterinary hospitals in Sao Paulo – Brazil**. In Proceedings of 23° Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, 2019, Turim.

QUIGLEY, E. M. Gut bacteria in health and disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 9, p. 560, 2013.

REMELY, M.; TESAR, I.; HIPPE, B.; GNAUER, S.; RUST, P.; HASLBERGER, A. G. Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 4, p. 431-439, 2015.

RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., CHENG, J., DUNCAN, A. E., KAU, A. L.; GRIFFIN, N. W.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B.; BAIN, J. R.; MUEHLBAUER, M. J.; ILKAYEVA, O.; SEMEKOVICH C. F.; FUNAI, K.; HAYASHI D. K.; LYLE, B. J.; MUEHLBAUER, M. J.; GORDON, J. L. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science.** v. 341, n. 6150, p. 1241214, 2013.

ROBERTSON, I. D. The association of exercise, diet and other factors with owner- perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan Perth, WA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, p. 75-83, 2003.

ROCHA, I. E. G. M.; VICTOR, E. G., BRAGA, M.C., BARBOSA e SILVA, O., BECKER, M.M.C. Avaliação ecocardiográfica em obesos assintomáticos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 52-58, 2007.

ROUND J.L.; MAZMANIAN S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature reviews immunology**, v. 9, n. 5, p. 313-323, 2009

RONDEAU, M. P.; MELTZER, K.; MICHEL, K. E.; MCMANUS, C. M., WASHABAU, R. J. Short chain fatty acids stimulate feline colonic smooth muscle contraction. **Journal of feline medicine and surgery,** v. 5, n. 3, p. 167-173, 2003**.**

ROSENFELD, C.S. Microbiome Disturbances and Autism Spectrum Disorders. **Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals**, v. 43, n. 10, p. 1557-1571, 2015.

SALAS, A.; JEUSETTE, I.; CASTILLO, I.; MANUELIAN, C. L.; LIONNET, C.; IRACULIS, N.; SANCHEZ, N.; FERNANDEZ S.; VILASECA, L.; TORRE, C. Fecal microbiota composition changes after a BW loss diet in Beagle dogs. **Journal of animal Science**, v. 96, n. 8, p. 3102-3111, 2018.

SAMUEL, B.S.; SHAITO A.; MOTOIKE T.; et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16767-16772, 2008.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; SCHÄFER, K.; BEIJER, S.; BOS, N. A.; DONUS, C.; HARDT, P. D. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 190-195, 2010.

SCOTT, K.P; GRATZ, S.W.; SHERIDAN, P.O.; FLINT, H.J.; DUNCAN, S.H. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological research**, v. 69, n. 1, p. 52-60, 2013.

SERINO, M.; LUCHE, E.; GRES, S.; BAYLAC, A.; BERGÉ, M.; CENAC, C.; WAGET, A.; KLOPP, P.; IACOVONI, J.; KLOPP, C.; MARIETTE, J.; BOUCHEZ, O.; LLUCH, J.; OUARNÉ, F.; MONSAN, P.; VALET, P.; ROQUES, C.; AMAR, J.; BOULOUMIÉ, A.; THÉODOROU, V.; BURCELIN, R. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. **Gut**, v. 61, n. 4, p. 543-553, 2012.

SHEN Z, ZHU C, QUAN Y, YUAN W, WU S, YANG Z, LUO W, TAN B, WANG X. Update on intestinal microbiota in Crohn's disease 2017: mechanisms, clinical application, adverse reactions, and outlook. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 32, n. 11, p. 1804-1812, 2017.

SHREINER A. B.; KAO J. Y.; YOUNG V. B. The gut microbiome in health and in disease. **Current opinion in gastroenterology,** v. 31, n. 1, p. 69, 2015.

SILVA, C. G. P. **Efeitos de um protocolo de exercício físico regular sobre a taxa de perda de peso, composição corporal e capacidade antioxidante total em cães obesos** [Effects of a regular physical exercise protocol on weight loss rate, body composition and total antioxidant capacity in obese dogs]. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

SOKOL, H.; PIGNEUR, B.; WATTERLOT, L.; LAKHDARI, O.; BERMUDEZ-HUMARAN, L.; GRATADOUX, J.; BLUGEON, S.; BRIDONNEAU, C.; FURET, J.; CORTHIER, G.; GRANGETTE, C.; VASQUEZ, N.; POCHART, P.; TRUGNAN, G.; THOMAS, G.; BLOTTIÉRE, H.; DORÉ, J.; MARTEAU, P.; SEKSIK, P; LANGELLA, P. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16731-16736, 2008.

SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 403, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 261-272, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S., RUAUX, C. G., STEINER, J. M., FETZ, K., & WILLIAMS, D. A. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. **American journal of veterinary research**, v. 66, n. 9, p. 1556-1562, 2005.

SUCHODOLSKI, J. S.; CAMACHO, J.; STEINER, J. M. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. **FEMS microbiology ecology**, v. 66, n. 3, p. 567-578, 2008.

SUCHODOLSKI, Jan S. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. **The Veterinary Journal**, v. 215, p. 30-37, 2016.

SUCHODOLSKI, Jan S.; MEDVET, DrMedVet. Gut Brain Axis and Its Microbiota Regulation in Mammals and Birds. **Exotic Animal Neurology, An Issue of Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, E-Book**, v. 21, n. 1, p. 159, 2017.

SWANN, J.R.; WANT, E.J.; GEIER, F.M.; SPAGOU, K.; WILSON, I.D.; SIDAWAY, J.E.; NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4523-4530, 2011.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 23, n. 3, p. 160-168, 2013.

TIZARD, I.R.; JONES, S.W. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 307-322, 2018

TOLL, P.; YAMKA, R. M.; SCHOENHERR, W. D.; HAND, M. S.; OBEISTY. IN: THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSH, P.; NORVOTNY, B. J., eds. Small Animal Clinical Nutrition, 5th ed. Topeka: Mark Morris Institute; 2010, p. 502–542

TRAYHURN, P. Adipose tissue in obesity – an inflammatory issue. **Endocrinology**, v. 146, p. 1003–1005, 2005.

TROPF, M.; NELSON, O. L.; LEE, P. M.; WENG, H. Y. Cardiac and metabolic variables in obese dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, p. 1000-1007, 2017.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, L. M.; JONES, B. A.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEALTH, A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature. 2009;457(7228): 480–4. 2009a

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804, 2007.

TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. Science translational medicine, v. 1, n. 6, p. 6ra14-6ra14, 2009b.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**. v. 444, p. 1027–1031, 2006.

USUI, S.; YASUDA, H.; KOKETSU, Y. Characteristics of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinics. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 338–343, 2016.

VENDRAMINI, T.H.A. **Gene expression of the immunoinflammatory response and immunological status of obese dogs and after weight loss.** 2019. 100 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

VITGER, A. D.; STALLKNECHT, B.M.; NIELSEN, D. H.; BJØRNVAD, C. R. Integration of a physical training program in a weight loss plan for overweight pet dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.248, p.82-174, 2016.

WANG, J.; TANG, H.; ZHANG, C.; ZHAO, Y.; DERRIEN, M.; ROCHER, E.; VAN-HYLCKAMA VLIEG, J.E.; STRISSEL, K.; ZHAO, L.; OBIN, M.; SHEN, J. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 1, 2015.

WEBER, M.; BISSOT, T.; SERVET, E.; SERGHERAERT, R.; BIOURGE, V.; GERMAN, A. J. A high-protein, high-fiber diet designed for weight loss improves satiety in dogs. **Journal of veterinary internal medicine.** v. 21, n. 6, p. 1203-1208, 2007.

WHITESIDE, S. A.; RAZVI, H.; DAVE, S.; REID, G.; BURTON, J. P. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. **Nature Reviews Urology**, v. 12, n. 2, p. 81, 2015.

XU, Z.; KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S1, p. S1-S5, 2015.

YATSUNENKO T.; REY F. E.; MANARY M. J.; TREHAN I.; DOMINGUEZ-BELLO M. G.; CONTRERAS M.; MAGRIS M.; HIDALGO G.; BALDASSANO R. N.; ANOKHIN A. P.; Heath AC. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n 7402, p. 222-227, 2012.

ZEISEL, S. H. Nutritional importance of choline for brain development. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. sup6, p. 621S-626S, 2004.

ZHANG, H.; DIBAISE, J. K.; ZUCCOLO, A.; KUDRNA, D.; BRAIDOTTI, M.; YU Y., PARAMESWARAN, P.; CROWELL, M. D.; WING, R.; RITTMANN, B. E.; KRAJMALNIK-BROWN, R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 7, p. 2365-2370, 2009.

ZHAO, L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 639-647, 2013.

ZORAN, D. L. Obesity in dogs and cats: A metabolic and endocrine disorder. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, p. 221-239, 2010.

Apêndice 1. Valores de eritrogramas encontrados nos grupos experimentais obesos e controle no início do estudo.

Animal	Eritrócitos (milhões/mm^3)	Eritroblastos (%)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M.[1] (mm^3)	H.C.M.[2] (pg)	C.H.C.M.[3] (g/dL^3)	Prot. Plasm. Total[4] (g/dL)	Plaquetas (mm^3)
				Grupo obeso					
A	7,16	0	52	18,30	72,80	25,60	35,10	6,60	209.000
B	7,60	0	53	17,30	69,74	22,76	32,64	8,00	248.000
C	7,00	0	49	16,30	70,00	23,29	33,27	7,80	239.000
D	7,60	0	53	17,00	69,74	22,63	32,45	7,40	270.000
E	7,60	0	53	17,60	69,74	14,30	23,16	7,60	246.000
F	7,00	0	49	16,30	70,00	23,29	33,27	8,40	277.000
G	7,00	0	47	16,50	67,14	23,57	35,11	8,40	110.000
H	7,60	0	50	16,80	65,79	22,11	33,60	6,80	417.000
I	7,60	0	53	17,60	69,74	14,30	23,16	7,60	246.00
J	7,60	0	53	17,60	70,01	23,25	33,21	8,40	210.00
				Grupo controle					
I	6,40	0	45	15,00	70,31	23,44	33,33	7,00	258.000
J	8,00	0	53	18,00	66,25	22,50	33,96	7,40	190.000
K	7,20	0	50	16,66	69,44	23,14	33,32	7,00	175.000
L	7,48	0	49	16,30	65,51	21,79	33,27	7,80	223.000
M	6,28	0	42	14,00	66,88	22,29	33,33	7,40	265.000
N	7,12	0	47	16,50	66,01	23,17	35,11	7,80	269.000
O	7,31	0	50	16,10	68,40	22,02	32,20	7,00	373.000
P	6,80	0	51	16,30	75,00	23,97	31,96	8,00	375.000
Q	7,15	0	50	17,20	69,93	24,06	34,4	7,00	376.000
R	6,90	0	48	17.00	69,57	23,00	35,42	6,80	315.000

[1] Volume corpuscular médio. [2] Hemoglobina corpuscular média. [3] Concentração da hemoglobina corpuscular média. [4] Proteína plasmática total.

Apêndice 2. Valores de leucogramas encontrados nos grupos experimentais obesos e controle no início do estudo.

	Leucócitos	Bastonetes		Segmentados		Linfócitos		Monócitos		Eosinófilos		Basófilos	
Animal	(mm^3)	(%)	(células/mm^3)	(%)	(células/mm^3)	(%)	(células/mm^3)	(%)	(células/mm^3)	(%)	(células/mm^3)	(%)	(células/mm^3)
						Grupo obeso							
A	7.900	0	0	59	4.661	28	2212	3	237	10	790	0	0
B	6.100	0	0	45	2.745	38	2318	0	0	17	1.037	0	0
C	12.400	0	0	42	5.208	28	3472	4	496	26	3.224	0	0
D	6.000	0	0	70	4.200	18	1080	2	120	10	600	0	0
E	7.700	0	0	62	4.774	18	1386	0	0	20	1.540	0	0
F	10.100	0	0	46	4.646	20	2020	4	404	30	3.030	0	0
G	12.400	0	0	61	7.564	10	1240	4	496	23	2.852	2	248
H	9.900	3	297	63	6.237	24	2376	6	594	4	396	0	0
I	7.700	0	0	62	4.4774	18	1.386	0	0	20	1.540	0	0
J	15.200	1	152	78	11.856	6	912	9	1.368	6	912	0	0
						Grupo controle							
I	8.100	0	0	62	5022	13	1053	6	486	19	1539	0	0
J	6.900	0	0	38	2622	41	2829	0	0	21	1449	0	0
K	12.000	0	0	49	5880	16	1920	1	120	34	4080	0	0
L	9.300	0	0	47	4371	22	2046	0	0	31	2883	0	0
M	10.900	0	0	60	6540	25	2725	3	327	12	1308	0	0
N	16.100	4	644	38	6118	34	5474	3	483	21	3381	0	0
O	10.000	0	0	51	5100	30	3000	10	1000	9	900	0	0
P	10.700	0	0	46	4922	27	2889	3	321	24	2568	0	0
Q	11.200	0	0	50	5600	12	1344	5	560	33	3696	0	0
R	6.700	0	0	68	4556	18	1206	9	603	5	335	0	0