

PEDRO HENRIQUE MARCHI

**Avaliação dos efeitos de crescentes teores de ingestão de β -
glucanos sobre parâmetros digestivos, imunológicos e microbiota
de cães adultos**

Pirassununga

2023

PEDRO HENRIQUE MARCHI

**Avaliação dos efeitos de crescentes teores de ingestão de β -
glucanos sobre parâmetros digestivos, imunológicos e microbiota
de cães adultos**

VERSÃO CORRIGIDA

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 (VNP)

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto

Pirassununga

2023

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)

4290
FMVZ

Marchi, Pedro Henrique
Avaliação dos efeitos de crescentes teores de ingestão de β -glucanos sobre parâmetros digestivos, imunológicos e microbiota de cães adultos / Pedro Henrique Marchi. – 2023.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto.

1. Canino. 2. Fermentação. 3. Microbioma. 4. Nutrição. 5. Prebiótico. I. Título.



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 10th February 2023

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Evaluation of the effects of increasing levels of β -glucans intake on digestive, immunological parameters and microbiota of adult dogs*", protocol number CEUAx 2866090223 (ID 002459), under the responsibility Marcio Antonio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day February 10, 2023.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Avaliação dos efeitos de crescentes teores de ingestão de β -glucanos sobre parâmetros digestivos, imunológicos e microbiota de cães adultos*", protocolado sob o CEUAx nº 2866090223, sob a responsabilidade de Marcio Antonio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 10 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARCHI, Pedro Henrique

Título: **Avaliação dos efeitos de crescentes teores de ingestão de β -glucanos sobre parâmetros digestivos, imunológicos e microbiota de cães adultos**

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: _____

À minha falecida e amada avó Elisabeth Marcelino Faustino,

Ao meu falecido e amado avô Aldemiro Luiz Marchi,

À minha amada avó Maria José Bueno Marchi,

Aos meus pais Claudinei Marchi e Nilce Elena Faustino Marchi,

Aos meus irmãos Lucas Filipe Marchi e Juliana Marchi,

Aos meus eternos companheiros peludos Rudy, Filé, Faísca, Tizzy, Stacy e Pilca,

Aos meus grandes amores Gabriela Luiza Fagundes Finardi e Farofa Carlson,

Destes sonhos meus, dedico cada pedacinho a vocês.

AGRADECIMENTOS

Com grande sorriso estampado no rosto, coração pulsando nas pontas dos dedos e apoiado na certeza de que andorinha só não faz verão, serão postos meus singelos agradecimentos.

E, por óbvias razões de apoio e amor incondicionais a mim entregues, agradeço meus pais Claudinei e Nilce. Obrigado por todo o esforço que desde sempre dedicaram a mim, pois foi base para que eu empilhasse os blocos da minha evolução. Sei que os privei da minha companhia em muitos momentos importantes ao longo destes anos e, por isso agradeço por todos os abraços apertados e lágrimas derramadas em meus muitos momentos de ida e volta. Vocês são tudo para mim, obrigado! Aos meus irmãos Lucas e Juliana, meu muito obrigado por todo o suporte e por sempre desejarem sucesso para mim, independente das minhas decisões. Que nossa parceria somente evolua e seja perene!

Gostaria de registrar meu amoroso agradecimento a minha parceira, Gabriela, por sempre me estimular a me manter no caminho da evolução, por todo o amor, por proporcionar momentos incríveis e carregados de leveza e por ser ombro e ouvido para toda e qualquer hora. Que você saiba como é maravilhoso te ter ao meu lado! Estendo meus agradecimentos ao meu sogro, sogra, cunhados e toda a base familiar, que sempre me receberam com muita alegria e prazer!

Farofinha, você é o próximo! Sei que você nunca vai ler isso, mas tudo que será escrito aqui, tenho certeza que você já sabe! Te amo, coisa mais linda do mundo! Obrigado por existir e por ser essa coisinha maluca que você é! Você é o momento mais feliz do meu dia, sempre!

Gostaria de agradecer aos meus irmãos de caminhada. Estes que a vida me permitiu chamar de “amigo” por tantos anos. Meu mais sincero agradecimento aos meus grandes irmãos Orelha e Bola, por sempre serem luz, verdade e apoio em minha vida e, proporcionarem momentos que só verdadeiros amigos, aqueles para vida toda, podem oferecer! Sem me estender muito, mas com a ânsia de escrever mensagens de agradecimento específicas para cada um, ficam meu sincero muito obrigado por toda a parceria e amizade dos meus irmãos: Celso, Ivan, João Paulo, Malvezzi, Rômulo, Tefs, Thia e Vitão.

Obrigado aos meus irmãos de faculdade, que formaram a minha segunda família ao longo de todos estes anos em Pirassununga. São eles os caras mais loucos

da república Tatu Currido e para a velharada da república Caipira. Muito obrigado, meus queridos amigos! Fica meu agradecimento especial para os dois que mais têm que aturar as maluquices que eu falo e são sempre parceiros para uma cervejinha no final da tarde, Jack e Kumi. Valeu!

Com toda a admiração que posso ter, agradeço ao Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto. O senhor é o responsável por reunir tantos destinos em um só local e, este é um dos motivos pelo qual serei sempre grato. Obrigado por depositar em mim a sua confiança e, junto dela, por repassar seus ensinamentos, por toda a dedicação e companheirismo e por disponibilizar tantos recursos que podemos utilizar para alçar voo nesta área tão linda que é a Nutrição de Cães e Gatos.

Aos professores que foram sempre parceiros nesta caminhada chamada mestrado, meu muito obrigado! Em especial aos professores Julio Balieiro e Cristina Massoco, por toda a contribuição e esforço na garantia de um estudo executado com muito brio.

Meu muito obrigado aos meus grandes irmãos Cati e Pajé por também serem, em algum grau, meus mentores. Agradeço aos ensinamentos e estímulos, não só para garantir minha evolução como profissional, mas também como pessoa. Cada momento de alegria e risada fica guardado no meu peito, obrigado!

Aos meus “colegas de trabalho”: Cinthia, Dani Boy, Dri, Léo, Rafa e Peri. Obrigado por tantos momentos de alegria, apoio, dedicação e, principalmente, pela amizade! Sou muito feliz por trabalhar ao lado de vocês!

Aos funcionários mais dedicados e boa gente que um centro de pesquisa pode ter: Chicão, Ciça, Didi e Lu. Obrigado por toda a amizade e por trazerem leveza ao nosso dia-a-dia. Somos muito sortudos em ter vocês trabalhando conosco! Ficam meus agradecimentos especiais a Lu, a quem considero mãe desta segunda família, e ao meu grande amigo Didi, pela amizade sincera que sempre teremos!

Declaro o meu mais sincero respeito e minha mais intensa gratidão aos cães e gatos do CEPEN Pet, os quais são nossos parceiros diários e que possibilitaram a realização deste projeto de pesquisa. O desejo de melhorar ainda mais a qualidade de vida dos cães e gatos, baseado no amor que possuímos por todos estes, é a nossa real motivação!

Agradeço à Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e Departamento de Nutrição e Produção Animal, tal como todo o seu corpo docente e de funcionários.

À Premier Pet, pela construção e manutenção do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos da FMVZ/USP.

À Biorigin, por financiar todo este projeto, confiar em nosso trabalho e permitir esta parceria.

De modo geral, agradeço a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, me auxiliaram ao longo desta jornada.

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

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

MARCHI, P.H. **Avaliação dos efeitos de crescentes teores de ingestão de β -glucanos sobre parâmetros digestivos, imunológicos e microbiota de cães adultos.** 2023. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Os β -glucanos obtidos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* podem modular o sistema imunológico e o microbioma de cães, no entanto, o teor de inclusão ideal em alimentos secos extrusados permanece desconhecido. Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de β -glucanos (0,0%; 0,07%; 0,14%; 0,28%) em alimento seco extrusado sobre parâmetros digestivos, imunológicos e microbiota de cães adultos saudáveis e definir a recomendação ideal para inclusão deste ingrediente. Oito cães border collies machos e fêmeas [n=4; escore de condição corporal (ECC)=5] e cockers spaniel inglês (n=4; ECC=5), com idade de $3,5 \pm 0,5$ anos, foram distribuídos aleatoriamente em dois quadrados latinos balanceados. Cada período apresentou duração total de 35 dias, os quais foram divididos em 28 dias para adaptação às dietas e sete dias para a coleta de amostras fecais e sanguíneas. Foram determinados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes, concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, nitrogênio amoniacal, ácido láctico, IgA e pH; imunofenotipagem de linfócitos, intensidade e porcentagem de fagocitose, *burst* oxidativo e microbiota fecal. Os dados obtidos foram analisados por meio do software computacional *Statistical Analysis System* (SAS, versão 9.4) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As concentrações fecais dos compostos avaliados e o pH não diferiram após o consumo dos β -glucanos em todas as porcentagens. Maior CDA da proteína bruta foi observado após o consumo de 0,14 e 0,28% de β -glucanos ($p < 0,0001$) pelos cães, mas nenhuma diferença foi encontrada para os demais nutrientes. Porcentagem e intensidade de fagocitose, *burst* oxidativo e populações linfocitárias não foram moduladas por nenhum dos tratamentos. No entanto, a inclusão de 0,14% de β -glucanos foi capaz de modular a relação linfócitos T CD4+:CD8+ ($p = 0,0368$). Não foram observadas diferenças nos índices de diversidade alfa de Faith e Pielou entre os tratamentos. Contudo, o índice de diversidade beta entre a microbiota fecal dos animais controle diferiu do tratamento com inclusão de 0,14% de β -glucanos ($p = 0,047$). Todos os cinco filos analisados

(Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria) foram modulados pelos tratamentos com inclusão de β -glucanos ($p < 0,0001$). Também foram observadas diferenças para 15 famílias e 25 gêneros ($p < 0,05$). A inclusão de 0,14% de β -glucanos resultou nas melhores respostas e foi a dose de inclusão ideal.

Palavras-chave: canino, fermentação, microbioma, nutrição, prebiótico.

ABSTRACT

MARCHI, P.H. **Evaluation of the effects of increasing levels of β -glucans intake on digestive, immunological parameters and microbiota of adult dogs.** 2023. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Saccharomyces cerevisiae cell wall β -glucans can modulate the immune system and microbiome of dogs, however, the optimal inclusion dose in dry extruded food remains unknown. In view of the above, the present study aimed to evaluate the effects of the inclusion of increasing levels of β -glucans (0.0%; 0.07%; 0.14%; 0.28%) in dry extruded food on digestible, immunity and fecal microbiota variables of healthy adult dogs and define the ideal inclusion of this ingredient. Eight male and female border collies [n=4; body condition score (BCS)=5] and english cockers spaniel (n=4; BCS=5), aged 3.5 ± 0.5 years, were randomly distributed into two balanced latin squares. Each period had a total duration of 35 days, which were divided into 28 days for diet acclimation and seven days for fecal and blood sample collection. Apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients, fecal concentrations of short and branched chain fatty acids, ammoniacal nitrogen, lactic acid, IgA, and pH; lymphocyte immunophenotyping, intensity and percentage of phagocytosis, oxidative burst and fecal microbiota were determined. The data obtained were analyzed by Statistical Analysis System computational software (SAS, version 9.4) and p values <0.05 were considered significant. Fecal concentrations of the evaluated compounds and the pH did not differ after the consumption of β -glucans at all percentages. Higher crude protein ADC was found after 0.14 and 0.28% β -glucans consumption ($p<0.0001$), but no difference was found for other nutrients. The percentage and intensity of phagocytosis, oxidative burst, and lymphocyte populations were not modulated by any of the treatments. However, the inclusion of 0.14% β -glucans was able to modulate lymphocyte T CD4+:CD8+ ratio ($p=0.0368$). No differences were observed in Faith and Pielou alpha diversity indices between treatments. However, the beta diversity index among the fecal microbiota of control animals differed from the treatment with 0.14% β -glucans inclusion ($p=0.047$). All five phyla analyzed (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, and Proteobacteria) were modulated by treatments with the inclusion of β -glucans ($p<0.0001$). Other differences were observed for 15 families and 25 genera ($p<0.05$). The inclusion of 0.14% β -glucans resulted in the best responses and was the optimal inclusion dose.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental em quadrado latino	43
Figura 2. Procedimentos realizados em cada um dos quatro períodos experimentais	44
Figura 3. Índice de diversidade filogenética de Faith observado nos grupos experimentais.....	55
Figura 4. Índice de uniformidade de Pielou observado nos grupos experimentais....	55
Figura 5. Análise tridimensional de componentes principais por meio dos dados relativos obtidos por meio do sequenciamento das amostras fecais dos grupos experimentais.....	56
Figura 6. Distribuição dos filos bacterianos observados nos grupos experimentais..	58
Figura 7. Distribuição das famílias bacterianas observadas nos grupos experimentais	60
Figura 8. Distribuição dos gêneros bacterianos observados nos grupos experimentais	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição em ingredientes (%) dos alimentos experimentais	42
Tabela 2. Composição química dos alimentos experimentais.....	52
Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (%) das dietas experimentais	53
Tabela 4. Produtos fermentativos, ácidos graxos e pH fecal observados no estudo	53
Tabela 5. Resultados dos testes de imunofenotipagem de linfócitos (porcentagem das células T CD4+, T CD8+ e relação T CD4+:CD8+), fagocitose, <i>burst</i> oxidativo e IgA fecal observados no estudo.....	54
Tabela 6. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão das abundâncias relativas dos filos observados nos grupos experimentais	59
Tabela 7. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão das abundâncias relativas das famílias observadas nos grupos experimentais	61
Tabela 8. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão das abundâncias relativas dos gêneros observados nos grupos experimentais.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Categorias taxonômicas das principais bactérias habitantes do microbioma intestinal canino.....	24
Quadro 2. Principais estudos que avaliaram a inclusão de prebióticos em diversos teores sobre parâmetros digestivos, metabólicos, imunológicos e microbiota de cães	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL CANINA	21
2.2 FIBRAS PREBIÓTICAS NA NUTRIÇÃO CANINA	26
2.3 β -GLUCANOS.....	35
3. HIPÓTESE.....	40
4. OBJETIVOS	40
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 Local	40
5.2 Animais	40
5.3 Alimentação	41
5.4 Protocolo experimental	42
5.5 Digestibilidade aparente dos nutrientes	44
5.6 Avaliação dos produtos fermentativos	45
5.6.1 Determinação da concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta e cadeia curta ramificada	45
5.6.2 Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal fecal.....	46
5.6.3 Determinação da concentração de ácido láctico fecal	46
5.6.4 Determinação do pH fecal	47
5.7 Avaliação da imunidade	47
5.7.1 Imunofenotipagem de linfócitos	47
5.7.2 Teste de fagocitose e <i>burst</i> oxidativo	48
5.7.3 Determinação de IgA fecal	48
5.8 Microbiota.....	49
5.10 Análise estatística	50
6. RESULTADOS	52
7. DISCUSSÃO.....	65

8. CONCLUSÕES.....	75
---------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

Em consonância com a crescente atribuição dos cães como membros da família, a saúde e bem-estar destes animais tornaram-se uma preocupação constante para os tutores, os quais buscam promover qualidade de vida e prolongar a longevidade de seus animais de estimação (ABINPET, 2022; IPB, 2018). Desta forma, é possível constatar aumento no interesse dos tutores quanto as diversas opções de alimentos para seus cães, tal como na exigência por dietas seguras e de qualidade (ROCHA, 2008; BUCHANAN et al., 2011). Esta demanda impacta de maneira sólida a indústria de alimentos para animais de estimação, que hoje desempenha papel importante no que diz respeito ao manejo nutricional de animais de estimação. Decorrem destes propósitos, mudanças na finalidade da nutrição, a qual não mais deve apenas suprir a necessidade nutricional dos animais, mas também proporcionar bem-estar, saúde e prevenção de determinadas enfermidades (BUCHANAN et al., 2011; DI CERBO et al., 2017).

Dentre os ingredientes empregados nas formulações de dietas para cães e gatos, os prebióticos são um grupo funcional muito utilizado. Esses são definidos como o substrato utilizado de forma seletiva por microrganismos benéficos do intestino, os quais conferem benefícios à saúde intestinal e geral do hospedeiro (GIBSON et al., 2017); são incluídos nas dietas de acordo com a composição dos ingredientes utilizados ou por fontes exógenas e, desempenham função como moduladores do microbioma intestinal (OUZGUN et al., 2017). Tal modulação é dada por meio da ativação metabólica ou do estímulo ao crescimento de bactérias benéficas, as quais são responsáveis por competir com estirpes patogênicas e reduzi-las (ROBERFROID et al., 2010). Os prebióticos comumente utilizados em nutrição de cães e gatos são os mananoligossacarídeos (MOS), frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e os β -glucanos.

Os β -glucanos são polissacarídeos compostos por polímeros de glicose, considerados como fibras solúveis fermentáveis e, principais constituintes das paredes celulares de cereais, como aveia e cevada, algas, bactérias, fungos e leveduras (RAHAR, 2011). A depender de sua fonte, estes prebióticos apresentam diferenças quanto sua estrutura, solubilidade, peso molecular e tipos de ligação (BROWN; GORDON, 2005). Sabe-se que a parede extracelular da *Saccharomyces cerevisiae* é caracterizada por apresentar alta concentração de β -glucanos, que apresentam ligações glicosídicas β -1,3/1,6 (MANNERS et al., 1973). Este tipo de β -

glucano já foi demonstrado como um potencial suplemento para a redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias e do estado inflamatório em suínos saudáveis e cães com osteoartrite (LI et al., 2006; BEYNEN; LEGERSTEE, 2010). Outros estudos, realizados com a inclusão de β -glucanos na alimentação de cães saudáveis, demonstraram efeitos benéficos sobre a saúde dos animais por meio da alteração do metabolismo da glicose (VETVICKA; OLIVEIRA, 2014) e de lipídeos (PHARM et al., 2016; FERREIRA et al., 2022). Ademais, os β -glucanos foram associados a melhoras no *status* imune de cães, o que corrobora sua função como agentes imunomoduladores (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008; STUYVEN et al., 2010, RYCHLIK et al., 2013; DE OLIVEIRA; VETVICKA; ZANUZZO, 2019; RENTAS et al., 2020). Contudo, dentre os estudos realizados, nenhum buscou avaliar níveis crescentes de inclusão na alimentação de cães saudáveis sobre os efeitos benéficos deste prebiótico. Isto, somado às evidências encontradas até então, demonstra a necessidade e importância da realização de novos estudos para tal definição na nutrição de cães.

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da ingestão de teores crescentes (0,0%; 0,07%; 0,14%; 0,28%) de β -glucanos adicionados em alimento seco extrusado sobre variáveis digestivas, imunológicas e microbiota de cães adultos saudáveis e, por meio da comparação entre os resultados, definir a recomendação ideal para inclusão deste prebiótico na alimentação de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL CANINA

Os mamíferos são habitados por uma grande densidade e diversidade de microrganismos, os quais formam comunidades consideradas essenciais para o funcionamento regular dos sistemas biológicos do hospedeiro (BARKO et al., 2018). Desta forma, as funções fisiológicas dos animais ocorrem em equilíbrio dinâmico e simbiótico entre suas próprias células e unidades microbianas (MACKIE; WHITE; ISAACSON, 1997; TURNBAUGH et al., 2007). Este consórcio de microrganismos é composto por uma abundância de archeas, bactérias, fungos, protozoários e vírus (TURNBAUGH et al., 2007; SHREINER; KAO; YOUNG, 2015). Em situações cuja finalidade é referir-se a um grupo de microrganismos presentes em um determinado habitat ou sistema, utiliza-se o termo microbiota (SUCHODOLSKI, 2017). Já o termo microbioma refere-se ao ecossistema geral, que incorpora fatores bióticos e abióticos, tais quais o hospedeiro, as condições ambientais e todo o genoma microbiano (WHITESIDE et al., 2015).

O trato gastrointestinal dos cães é habitado por uma microbiota complexa constituída de trilhões de microrganismos, população que extrapola cerca de dez vezes a quantidade de células do organismo canino (SUCHODOLSKI, 2016). Em consequência de tamanha pluralidade, são encontradas tanto espécies consideradas benéficas para o hospedeiro, quanto espécies correlacionadas com o desenvolvimento de doenças e manifestações clínicas indesejáveis (ROBERFROID et al., 2010). Ademais, esta característica torna o microbioma do trato gastrointestinal suscetível a diversos fatores que podem influenciar e modular a população das espécies habitantes (PANASEVICH et al., 2015). Dentre os fatores conhecidos diante da literatura científica, pode-se citar a genética, condições ambientais, idade, porte, estado de saúde, intervenções terapêuticas e, principalmente, a dieta (HANDL et al., 2013; DENG; SWANSON, 2015; BARKO et al., 2018).

Em condições ideais, a modulação dinâmica do microbioma intestinal preserva uma condição de equilíbrio entre os microrganismos, com predominância de espécies benéficas, estado denominado eubiose (IEBBA et al., 2016). Enquanto eubiótica, a microbiota intestinal colabora com os processos digestivos, metabólicos, imunológicos e fisiológicos (HOOPER et al., 2001; OUWEHAND et al., 2005). No

entanto, em situações nas quais os fatores moduladores se apresentam em desequilíbrio, há aumento da abundância de bactérias potencialmente patogênicas em detrimento das bactérias consideradas favoráveis. Esta condição é definida como disbiose e pode estar correlacionada com a etiopatogenia de distúrbios gastrointestinais e em outros órgãos (SUCHODOLSKI, 2016). As bactérias benéficas pertencem principalmente aos filos Firmicutes e Bacteroidetes e gêneros *Lactobacillus* (Firmicutes) e *Bifidobacterium* (Actinobacteria) (REDFERN; SUCHODOLSKI; JERGENS, 2017). Já as bactérias potencialmente patogênicas pertencem principalmente ao filo Proteobacteria e aos gêneros *Clostridium* (Firmicutes) e *Escherichia* (Proteobacteria) (STRICKLING et al., 2000; MIDDELBOS et al., 2007a). De forma geral, as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas distribuem-se em maior concentração no intestino delgado, enquanto no intestino grosso predominam bactérias anaeróbias (SUCHODOLSKI, 2011a).

De acordo com Suchodolski (2011a), os filos Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria compreendem mais de 99% das espécies identificadas na microbiota gastrointestinal dos cães (Quadro 1). Nos estudos de Handl et al. (2013) e Macedo et al. (2022), os dados de quantificação e sequenciamento de amostras fecais apontaram que o filo Firmicutes é o mais abundante no microbioma intestinal de cães saudáveis, seguido em ordem pelos filos Bacteroidetes e Fusobacteria. Em ensaio realizado por Santos et al. (2022), a abundância relativa dos Firmicutes corroborou os resultados anteriores, porém o filo Fusobacteria ocupou a segunda maior população encontrada. No entanto, Middelbos et al. (2010) demonstraram achados bastante distintos, pois a maior abundância relativa quantificada foi de Fusobacteria, seguido de Bacteroidetes e, por fim, Firmicutes. De forma geral, estes filos ocupam espaço entre as três maiores populações do microbioma do trato gastrointestinal dos cães. Os filos Proteobacteria e Actinobacteria foram demonstrados, nesta ordem, ocupando as menores abundâncias relativas em todos os quatro estudos citados (MIDDELBOS et al., 2010; HANDL et al., 2013; MACEDO et al., 2022; SANTOS et al., 2022). Estas diferenças entre os estudos são reflexo da complexidade e da característica multifatorial envolvidas na modulação das populações microbianas que habitam o trato gastrointestinal. Isto pois, além das diferenças individuais entre os animais e do ambiente onde os estudos foram realizados, a coleta e preparo das amostras e o método de quantificação empregado podem contribuir para mudanças nestes grupos.

A evolução dos métodos utilizados para a determinação das populações microbianas intestinais é marcada por um período pré e pós desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Os estudos mais antigos que avaliaram o microbioma intestinal de mamíferos utilizavam o método de cultura para identificar as populações de bactérias presentes no órgão (GREETHAM et al., 2002). No entanto, há um limite bastante demarcado em relação ao número de bactérias que são passíveis de serem isoladas em meios de cultura laboratoriais, tal como na capacidade de classificação de grande parte dos microrganismos que caracterizam o microbioma (GREETHAM et al., 2002; ECKBURG et al., 2005). Portanto, atualmente, os métodos pautados em sequenciamento são considerados padrão para a investigação do microbioma intestinal dos cães (SUCHODOLSKI, 2011a). Os classificados como métodos de sequenciamento de última geração (NGS, em inglês, *next generation sequencing*) consistem na extração do DNA contido na amostra e, posterior amplificação dos genes RNA ribossomal (rRNA) 16S por meio da confecção de primers bacterianos universais (HANDL et al., 2011). Desta forma, são altamente eficazes em identificar e classificar as principais categorias taxonômicas das bactérias, conhecidas e desconhecidas, presentes nas amostras submetidas ao processo (KNIGHT et al., 2017). A plataforma de sequenciamento *Illumina Fluidigm Array Technology* permite a realização desta técnica e, é capaz de realizar a análise de milhares de sequências em poucas horas, o que proporciona resultados de amplo escopo do microbioma intestinal canino. No entanto, até o momento não há um consenso em relação ao procedimento que melhor caracteriza as reais abundâncias dos microrganismos habitantes (BHARTI; GRIMM, 2021).

Quadro 1. Categorias taxonômicas das principais bactérias habitantes do microbioma intestinal canino

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
			<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i> <i>Faecalibacterium</i>
			<i>Eubacteraceae</i>	<i>Eubacterium</i>
	Bacilli	Lactobacilliales	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
			<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>
	Erysipelotrichia	Erisipelotrichales	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Turibacter</i> <i>Catenibacterium</i> <i>Coprobacillus</i> <i>Allobaculum</i>
	Negativicutes	Selenomonadales	<i>Selenomonadaceae</i>	<i>Megamonas</i>
		Veillonellales	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialister</i> <i>Megasphaera</i> <i>Veillonella</i>
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>

			<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Collinsella</i>
			<i>Atopobiaceae</i>	<i>Olsenella</i>
		Eggerthellales	<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Slackia</i>
	<i>Eggerthella</i>			
Actinobacteria	Bifidobacteriales	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	<i>Enterobacteraceae</i>	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i>
		Aeromonadales	<i>Succinivibrionaceae</i>	<i>Anaerobiospirillum</i> <i>Succinivibrio</i>

Fonte: Adaptado de Barko et al. (2018)

2.2 FIBRAS PREBIÓTICAS NA NUTRIÇÃO CANINA

Nas últimas décadas, o propósito da nutrição canina evoluiu ao ponto em que fornecer os nutrientes em seus teores mínimos e respeitar os limites máximos tornou-se o básico, uma vez que a dieta pode modular diversas funções e sistemas do organismo canino (BONTEMPO, 2005). Uma forte linha de pesquisa foca em estudar os benefícios da inclusão de fibras na alimentação dos cães e, ademais, compreender a influência destas na modulação do microbioma desses animais (DE GODOY, KERR, FAHEY, 2013). Apesar do conhecimento sobre a microbiota intestinal canina ser limitado, o uso de fibras denominadas prebióticas como promotoras da saúde, bem-estar e longevidade e como coadjuvantes ao tratamento e prevenção de doenças, está tornando-se cada vez mais usual (GRZEŚKOWIAK et al., 2015; JUGAN et al., 2017; DI CERBO et al., 2017).

São considerados prebióticos os ingredientes que são fermentados por ação da microbiota gastrintestinal, de modo a conferir benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro (ROBERFROID, 2007). Portanto, para serem considerados prebióticos, necessitam ser capazes de suportar a ação das enzimas digestivas através do trato gastrintestinal e, uma vez que alcançarem o cólon, estimular a proliferação de espécies microbianas consideradas benéficas por meio da fermentação (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Estes alimentos funcionais são classificados como carboidratos não-digeríveis, uma vez que apresentam estruturação de monômeros ligados por meio de β -ligações, o que os torna resistentes à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal (ROBERFROID, 2010). Em maior proporção, encontram-se oligossacarídeos de baixo grau de polimerização com estas características, o que promove maior seletividade fermentativa (da SILVA; NORBERG, 2003). Dentre os mais comumente estudados e incluídos na formulação das dietas, pode-se citar os frutooligossacarídeos (FOS), mananoligossacarídeos (MOS) (GHOSH; MEHLA, 2012; GRAND et al., 2013; KARA et al., 2015), galactooligossacarídeos (RENTAS et al., 2020), oligofrutose (HERNOT et al., 2008) e β -glucanos (VETVICKA; OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA, VETVICKA; ZANUZZO, 2019). Podem ser obtidos por meio da extração de matérias-primas vegetais (FRANCK; BOSSCHER, 2009), por síntese enzimática a partir da sacarose e lactose (SPIEGEL et al., 1994) ou por hidrólise enzimática parcial (DE BRUYN et al., 1992). Compreendem um dos ingredientes funcionais mais utilizados na indústria de alimentos para animais de estimação.

Ademais, os próprios ingredientes empregados na extrusão dos alimentos para cães podem conter certo teor de prebióticos naturais (VAN LOO et al., 1995; MOSHFEGH et al., 1999).

Os principais benefícios relacionados ao uso de prebióticas estão associados à sua capacidade de modulação benéfica da microbiota intestinal nativa do hospedeiro, o que estimula o crescimento e o metabolismo de grupos de bactérias do trato gastrointestinal (MACARI; MAIORKA, 2000). Os estudos que sustentam os benefícios do uso de prebióticos em cães estão tornando-se mais frequentes (KANAKUPT et al., 2011). No entanto, os ensaios realizados são muito distintos entre si, em termos de formulação da dieta, número amostral, teor de inclusão e tempo de ingestão, o que torna difícil a comparação dos resultados e, desta forma, chegar a um consenso (JUGAN et al., 2017). Portanto, é importante a análise de diferentes estudos para definição do tipo e em quais condições um prebiótico deve ser suplementado. Para tal, os principais estudos encontrados na literatura científica estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Principais estudos que avaliaram a inclusão de prebióticos em diversos teores sobre parâmetros digestivos, metabólicos, imunológicos e microbiota de cães

Autor	Tratamento	Teor de inclusão	Número amostral	Principais resultados
STRICKLING et al. (2000)	FOS, MOS e XOS	0,5%	7 cães adultos (cânulas ileais)	Não foram observadas diferenças sobre parâmetros de digestibilidade da matéria seca e do nitrogênio, amônia ileal e fecal, escore das fezes, glicemia ou pH ileal. Com significância a 10%, observou-se aumento de butirato ileal após consumo da dieta controle, aumento de propionato ileal e redução de <i>Clostridium perfringens</i> pós ingestão da dieta com MOS.
SWANSON et al. (2002a)	FOS, MOS e FOS + MOS	1,0g em cápsulas	4 cães adultos (cânulas ileais)	Animais suplementados com MOS apresentaram menor abundância de bactérias aeróbicas fecais e maior concentração de linfócitos; Animais suplementados com FOS demonstraram menor concentração fecal de indóis e fenóis; Animais suplementados com FOS + MOS apresentaram maiores concentrações de IgA ileal, comparado ao controle e, menor concentração fecal de indóis e fenóis.
SWANSON et al. (2002b)	FOS + MOS	2,0g de FOS + 1,0g de MOS em cápsulas	8 cães adultos (cânulas ileais)	Aumento nas populações de <i>Bifidobacterium</i> (fecal) e <i>Lactobacillus</i> (ileal e fecal).
ZENTEK, MARQUAT & PIETRZAK (2002)	MOS, TGOS, lactose e lactulose	1,0g/kg de PC por dia	4 cães adultos	A suplementação com MOS resultou na redução da digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta e extrativos não-nitrogenados, pH fecal e excreção de amônia.

FLICKINGER et al. (2003)	FOS e oligofrutose	0,0; 0,3; 0,6; 0,9% de oligofrutose; 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0g de FOS	11 cães machos adultos e 4 cães fêmeas adultas (cânulas ileais)	Cães suplementados com oligofrutose apresentaram redução da digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica e extrato etéreo. Já os animais suplementados com FOS apresentaram aumento nas concentrações fecais de bactérias aeróbias e redução na concentração de <i>Clostridium perfringens</i> .
PROPST et al. (2003)	Inulina e oligofrutose	0,0; 0,3; 0,6 e 0,9%	7 cães adultos (cânulas ileais)	A inclusão de inulina e oligofrutose reduziu a digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta; aumentou a concentração de amônia fecal, ácidos graxos de cadeia curta e isovalerato. Os tratamentos com suplementação de oligofrutose apresentaram aumento linear em aminos biogênicos. Os resultados mais positivos foram correlacionados com os maiores teores de inclusão.
GRIESHOP et al. (2004)	Chicória, MOS e chicória + MOS	1,0%	34 cães seniores	Cães suplementados com MOS demonstraram aumento na concentração de Bifidobacteria fecal e redução na concentração de <i>E. coli</i> fecal. Por outro lado, os animais suplementados com chicória apresentaram apenas aumento na concentração de Bifidobacteria fecal.
APANAVICIUS et al. (2007)	FOS e inulina	1,0%	30 cães filhotes	Foi observado aumento da concentração fecal de acetato e <i>Lactobacillus spp</i> nos cães suplementados com inulina. No entanto, após desafio imunológico com <i>Salmonella</i> , os cães suplementados com ambos os frutanos demonstraram maior consumo alimentar e melhores indicadores de saúde intestinal, quando comparados com os filhotes infectados que consumiram o alimento controle.

MIDDELBOS, FASTINGER & FAHEY (2007b)	Celulose, polpa de beterraba e três <i>blends</i> prebióticos (celulose + FOS + PCL)	2,5%	6 cães adultos (cânulas ileais)	<p>Tratamento Celulose: menor digestibilidade aparente de matéria seca e matéria orgânica;</p> <p>Tratamento Polpa de Beterraba: aumento na concentração de <i>Bifidobacterium spp.</i> e ácidos graxos de cadeia curta, comparado ao controle;</p> <p><i>Blends</i>: menor digestibilidade aparente de proteína bruta e aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta.</p>
BARRY et al. (2009)	Celulose + FOS e celulose + inulina	0,2 e 0,4%	5 cães adultos (cânulas ileais)	<p>Animais suplementados com celulose + FOS apresentaram aumento linear da digestibilidade aparente de matéria seca e matéria orgânica e redução linear da concentração de fenóis fecais. Redução quadrática das concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta. Por outro lado, cães suplementados com celulose + inulina demonstraram redução linear da concentração de fenóis fecais. Aumento quadrático da digestibilidade aparente de matéria seca e matéria orgânica e concentração fecal de butirato e isobutirato.</p>
FABER et al. (2011)	GGMO	0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0%	6 cães adultos	<p>Foi observado aumento linear na digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica, porém diminuição linear do aproveitamento de proteína bruta. As concentrações de acetato, propionato e ácidos graxos de cadeia curta aumentaram de forma linear e, as concentrações de butirato, pH, fenóis e indóis fecais apresentaram redução linear. Por fim, foi observado aumento quadrático na concentração de <i>Bifidobacterium spp.</i></p>

PANASEVICH et al. (2015)	Fibra de batata	0,0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0%	10 cães adultos	Foi observado aumento na população do filo Firmicutes e gênero <i>Faecalibacterium</i> e redução do filo Fusobacteria.
GARCIA-MAZCORRO et al. (2017)	Blend (MOS e inulina)	0,45% e 3,1%	22 cães adultos	Foi observado aumento na abundância da família <i>Staphylococcaceae</i> após a suplementação com dosagem mais baixa. Em dosagem mais alta, o <i>blend</i> aumentou a abundância de <i>Megamonas</i> e <i>Veillonellaceae</i> e reduziu a família <i>Clostridiaceae</i> .
PAWAR et al. (2017)	MOS	1,5%	10 cães filhotes	Não foi observada diferença entre os grupos sobre os parâmetros de palatabilidade, consumo alimentar, digestibilidade aparente dos nutrientes e produtos fermentativos fecais. Foi observada modulação na imunidade adaptativa dos animais suplementados, marcada pelo aumento de subpopulações de linfócitos CD4 ⁺ e relação CD4 ⁺ :CD8 ⁺ . Por fim, os animais suplementados apresentaram redução nas concentrações séricas de colesterol total e LDL.
FERREIRA et al. (2018)	β -glucanos (origem de aveia com 70% de pureza)	1,0%	14 cães adultos	Os animais suplementados demonstraram menores concentrações séricas de colesterol total, LDL e VLDL, menor digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral e extrato etéreo, maior produção fecal e menor consistência destas fezes. Em relação ao sistema imunológico, os animais suplementados apresentaram menor concentração sérica de IL-4 após vacinação.

PINNA et al. (2018)	FOS e teores de proteína	FOS: 1,5g/kg Baixa proteína: 22,9% Alta proteína: 30,4%	12 cães adultos	A suplementação de FOS resultou em maior digestibilidade aparente de matéria seca e diversos minerais. Ademais, foi possível observar interação entre FOS e os teores de proteína em relação ao pH fecal, propionato, acetato e população de Bifidobacteria.
LIN et al. (2019)	Produto fermentativo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fonte de β -glucanos)	125, 250 e 500mg por dia, em cápsulas	12 cães adultos	A suplementação não resultou em diferenças sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes e variáveis fecais. No entanto, resultou em maior abundância relativa do gênero <i>Bifidobacterium</i> e menor abundância relativa do gênero <i>Fusobacterium</i> . Em teores crescentes, foi observado aumento linear de células auxiliares secretoras de IFN- γ , T citotóxicas e IgE sérica. Ademais, as células imunes dos cães suplementados produziram menos TNF- α e apresentaram redução linear da concentração de fenóis e indóis fecais.
NOGUEIRA et al. (2019)	Celulose, <i>blend</i> prebiótico, sacarina + eugenol e <i>blend</i> prebiótico + sacarina + eugenol	5,0% de celulose; 5,0% de <i>blend</i> e 0,02% de sacarina e eugenol	8 cães adultos	Todos os animais apresentaram digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta semelhantes. Cães suplementados com <i>blend</i> + sacarina + eugenol apresentaram maior coeficiente para fibra dietética total. Os cães alimentados com ambos os tratamentos com <i>blend</i> apresentaram maior concentração de acetato e propionato fecal e os cães alimentados com a dieta controle demonstraram maior concentração de isobutirato e isovalerato.

THEODORO et al. (2019)	PCL e PCL + MOS de alta solubilidade (fontes de 25% de β -glucanos)	0,3%	24 cães adultos	Cães suplementados com parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> apresentaram redução da concentração sérica de IL-6 e aumento do índice de fagocitose de monócitos. Ademais, a ingestão de PCL + MOS de alta solubilidade reduziu a digestibilidade aparente do extrato etéreo e concentração de ácido láctico fecal e aumentou as concentrações fecais de butirato e putrescina.
RENTAS et al. (2020)	<i>Blend</i> prebiótico (contém 15% de β -glucanos) e GOS	<i>Blend</i> prebiótico: 0,5% ou 1,0% GOS: 1,0%	24 cães adultos	A suplementação não resultou em diferenças na digestibilidade aparente dos nutrientes, produção, escore e pH fecais e concentrações de amônia, ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta e ramificada. Cães que ingeriram a dieta com a maior inclusão do blend apresentaram aumento na concentração de células polimorfonucleares, reação de <i>burst</i> oxidativo dos fagócitos e aumento do processo de fagocitose das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .
RUMMEL et al. (2022)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> concentrada (fonte de β -glucanos)	7mg/kg de PC por dia	20 cães adultos domiciliados (Huskies)	A suplementação resultou em menor concentração do marcador inflamatório haptoglobina e aumento da concentração de arabinose fecal. Ao considerar significância a 10%, os animais que consumiram a dieta tratamento apresentaram “redução” da permeabilidade intestinal.

SANTOS et al. (2022)	Cultura desidratada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fonte de β -glucanos)	0,3 e 0,6%	18 cães adultos	A suplementação resultou em aumento da população dos filos Actinobacteria e Firmicutes e gênero <i>Clostridium</i> e redução do filo Fusobacteria e gêneros <i>Allobaculum</i> e <i>Fusobacterium</i> . Ademais, cães alimentados com as dietas teste apresentaram maior coeficiente de digestibilidade aparente da fibra bruta e menor para proteína bruta, extrativos não-nitrogenados e energia metabolizável. Por fim, as dietas testes resultaram em modulação do índice de fagocitose dos animais que as consumiram.
WILSON et al. (2022)	Produto de fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fonte de β -glucanos)	0,13%	16 cães adultos (antes e depois de estresse por transporte em van)	A suplementação resultou em redução dos marcadores de estresse oxidativo COX-2 e malondialdeído após o transporte, em comparação com os animais que receberam a dieta controle.

Fonte: Marchi (2023)

Legenda: FOS: frutooligossacarídeos; MOS: mananoligossacarídeos; TGOS: transgalactooligossacarídeos; XOS: xilooligossacarídeos; PC: peso corporal; PCL: parede celular de levedura; GGMO: oligossacarídeo galactoglucomanano; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa; IFN- γ : interferon-gama; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; COX-2: ciclooxigenase-2.

2.3 β -GLUCANOS

β -glucanos são homopolissacarídeos constituídos por ligações β -glicosídicas entre monômeros de glicose e compõem a parede celular de leveduras, fungos e determinadas bactérias (ŠVAJCER, 2017). Estes prebióticos também estão presentes nas paredes celulares do endosperma de cereais como a cevada e a aveia (BROWN et al., 2003). Todos os β -glucanos apresentam cadeia polimérica principal composta por ligações do tipo (1 \rightarrow 3), estrutura molecular que caracteriza e define a atividade destas fibras prebióticas (FRIEDMAN, 2016; ZHANG et al., 2018; HAN et al., 2020). Devido a relação estrutura-atividade observada nestas fibras, diferentes composições moleculares e estruturais são capazes de determinar funcionalidades distintas entre os β -glucanos (KAUR et al., 2020). Tais diferenças são responsáveis por alterar a atividade metabólica dos β -glucanos, pois modificam o padrão e o grau de ramificação e solubilidade em água, peso molecular, formação helicoidal e conformação do anel estrutural (DAOU; ZHANG, 2012). Como estas características físico-químicas são totalmente dependentes da fonte pela qual os β -glucanos são extraídos, esses podem ser classificados de acordo com sua origem. De forma geral, os β -glucanos provenientes de cereais apresentam ligações β -glicosídicas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) lineares, o que se distingue das fontes não-cerealíferas, como as leveduras, que são compostas por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) que apresentam ou não ramificações (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008; ŠIMIĆ et al., 2019). As fibras β -glucanas originárias das bactérias, apesar de consideradas fontes não-cerealíferas, são conformadas em ligações β -glicosídicas (1 \rightarrow 3) lineares (BROWN; GORDON, 2003).

As fontes de β -glucanos mais estudadas são provenientes de determinados fungos e leveduras, os quais apresentam altas concentrações desta fibra em sua composição (ŠIMIĆ et al., 2019). A principal levedura utilizada pela indústria é a *Saccharomyces cerevisiae*, cuja parede extracelular apresenta os β -glucanos como principais componentes em sua estruturação (MANNERS et al., 1973). Esta é composta por uma fração interna formada por ligações β -glicosídicas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) e quitina; e outra fração externa, caracterizada pela presença de mananoligossacarídeos e mananoproteínas (KIM; YUM, 2006). A extração da parede celular de levedura (PCL) pode resultar em concentração média de 30% de β -glucanos (FLEET et al., 1991). De forma geral, existem quatro métodos de extração utilizados, que são: extração alcalina, extração ácida, extração enzimática e extração

com água quente (MURPHY et al., 2021). Este último método é o mais comumente utilizado para fontes de β -glucanos não-cerealíferas (YAN; WANG; WU, 2014) e consiste na moagem prévia do ingrediente, posterior extração com água e, por fim, precipitação por meio de solventes (BHANJA et al., 2014). No entanto, não há procedimento considerado padrão para a extração completa deste prebiótico, o que infere na presença de outras substâncias ao final do processo, como proteínas.

Os β -glucanos provenientes da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* são utilizados há muitos anos na medicina humana (MURPHY; DAVID; CARMICHAEL, 2010) e, seus benefícios aparentam estender-se para várias espécies animais, como cavalos (KRAKOWSKI et al., 1999), galinhas (TIAN et al., 2016), peixes (JORGENSEN; ROBERTSEN, 1995; BAGNI et al., 2005), roedores (HETLAND; SANDVEN, 2002; INSTANES et al., 2004), suínos (STUYVEN et al., 2009) e invertebrados (MAZZEI et al., 2016; WU et al., 2016). Dentre suas funções, sabe-se que os β -glucanos possuem mecanismos de ação imunomoduladores, antioxidantes, antitumorais, hipoglicemiantes e hipocolesteromiantes e agem como modulares do microbioma intestinal (NAUMANN et al., 2006; LAZARIDOU; BILIADERIS; 2007; de OLIVEIRA; VETVICKA; ZANUZZO, 2019). Em cães, melhores respostas do sistema imunológico e efeitos prebióticos sobre a microbiota intestinal foram encontrados em estudos recentes (LIN et al., 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Além destas funções, Vetvicka & Oliveira (2014) foram capazes de observar redução na glicemia de cães hiperglicêmicos induzidos, alimentados com dieta enriquecida com 15mg/kg e 25mg/kg por dia de β -glucanos. Além disso, a ingestão via oral deste prebiótico foi capaz de aumentar a atividade fagocitária de monócitos e neutrófilos. Efeitos que beneficiam a glicemia, insulinemia, colesterolemia e trigliceridemia de cães obesos também foram evidenciados por Ferreira et al. (2022), após suplementação de 0,1% de β -glucanos. Estas evidências estão relacionadas com o fato de que os β -glucanos também são classificados como fibras solúveis, e, portanto, possuem capacidade de aumentar a viscosidade do conteúdo alimentar no intestino (JAYACHANDRAN et al., 2018).

Os β -glucanos apresentam potencial prebiótico bastante demarcado, o que significa que desempenham papel importante na modulação do microbioma intestinal (GIBSON et al., 2017). Dentre as principais funções da microbiota intestinal saudável, é destacada aquela de proteção do organismo contra patógenos e infecções. Para tal, são estudados mecanismos relacionados a competição por metabólitos e nutrientes,

modificação do ambiente intestinal quanto ao pH e concentração de oxigênio e indução de respostas imunes intestinais, o que promove a redução populacional de bactérias indesejadas (KAMADA et al., 2013; TIZARD; JONES, 2018).

A fermentação de fibras prebióticas no cólon gera uma série de metabólitos, tais quais amônia, indóis, fenóis, aminas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR) (SLAVIN, 2013). Estudo de Theodoro et al. (2019) em cães demonstrou que fibras β -glucanas foram eficazes em aumentar a concentração fecal do ácido graxo de cadeia curta butírico. Os AGCC são compostos considerados benéficos, pois são importantes fontes energéticas para o metabolismo e proliferação dos colonócitos, reduzem o pH do lúmen intestinal, fator desfavorável para microrganismos patogênicos e desempenham propriedades anti-inflamatórias (WALKER; DUFFY, 1998; SWANSON et al., 2002a; ADAMS, 2003; MORRISON; PRESTON, 2016).

Ademais, sabe-se que existe relação intrínseca entre microrganismos e o sistema imunológico, uma vez que o *gut associated lymphoid tissue* (GALT) é considerado o maior órgão imune do organismo e localiza-se no intestino (SWANSON; FAHEY, 2007). Este tecido é constituído por estruturas linfoides, denominadas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e a lâmina própria intestinal, nas quais estão presentes todos os tipos de células imunológicas (STOKES; WALY, 2006; SWANSON; FAHEY, 2007). Portanto, o GALT participa da modulação do sistema imunológico do organismo ao capturar, processar e apresentar os antígenos presentes no lúmen intestinal, tal como produzir anticorpos, como as IgAs e desencadear as respostas imune mediadas por células (FIELD et al., 1999; GERMAN; HALL; DAY, 1999). Por meio da fermentação e da produção de metabólitos, a microbiota eubiótica fornece nutrientes para o hospedeiro e garante o funcionamento ótimo de tecidos como, por exemplo, o GALT (SUCHODOLSKI, 2011b).

O sistema imunológico é capaz de defender o organismo contra microrganismos por meio do equilíbrio entre as reações inatas e adaptativas. A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa do organismo, cujos componentes incluem: barreiras epiteliais e químicas, células denominadas neutrófilos, monócitos e linfócitos *natural killer* (NK) e proteínas mediadoras da inflamação presentes na corrente sanguínea (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008). Por outro lado, a imunidade adaptativa caracteriza-se por apresentar resposta específica aos microrganismos, em principal, após a primeira exposição. É composta,

portanto, por células linfocitárias do tipo B, produtoras de anticorpos e, células linfocitárias do tipo T, as quais são responsáveis por eliminar patógenos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008).

Nas duas últimas décadas, o interesse por compreender e utilizar-se do potencial imunomodulatório dos β -glucanos tem crescido. É sabido que este polissacarídeo estimula a proteção contra o desenvolvimento tumoral e uma variedade de infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias (HUNTER; GAULT; BERNER, 2002; MANTOVANI et al., 2008; ZHOU et al., 2009). Como forma de avaliar a capacidade de imunomodulação destes polissacarídeos, Paris et al. (2020), avaliaram a resposta imune de 24 cães da raça Beagle após vacinação antirrábica, associada ou não com suplementação de β -glucanos. Para tal, foi utilizada fibra extraída de *Euglena gracilis* (espécie de alga), em dosagem de 2,5mg por via subcutânea. Como resultados, demonstrou-se que os animais suplementados um mês antes da vacinação ou de forma concomitante, apresentaram promoção da resposta humoral e celular. Outros dois estudos avaliaram variação da resposta imune de cães vacinados após suplementação e concluíram que os β -glucanos dietéticos podem estimular as respostas imunológicas celulares e humorais após a vacinação (ALTUG; YUKSEK; AGAOGLU, 2010; HALADOVÁ et al., 2011).

Esta função deriva da capacidade destes compostos em estimular ambas as imunidades inata e adaptativa, por meio da ativação de neutrófilos, linfócitos do tipo B, T e NK, e principalmente, de macrófagos (BROWN; GORDON, 2001; KIM et al., 2011). De forma geral, sabe-se que os β -glucanos são capazes de estimular ou inibir a liberação de citocinas pelos macrófagos e modular sua atividade fagocitária (VETVICKA; VETVICKOVA, 2007). Um estudo realizado com suínos foi capaz de demonstrar redução nas citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e, aumento da concentração de interleucina-10 (IL-10), considerada anti-inflamatória, após suplementação de β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucanos (LI et al., 2006). Em cães, a mitigação dos sinais clínicos de animais diagnosticados com osteoartrite após suplementação com β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucanos foi demonstrada por Beynen & Legerstee (2010). Para tal, foram incluídos 46 cães doentes, dos quais 23 receberam alimento com inclusão de 0,08% de β -glucanos e demonstraram melhoria sobre as variáveis atividade física, claudicação e dor, o que sugere modulação nos fatores inflamatórios associados à condição.

No entanto, as diferentes composições dos β -glucanos em relação a solubilidade, massa molecular e estrutura influenciam na capacidade imunomodulatória destas fibras (DAOU; ZHANG, 2012). Sabe-se que a ativação de leucócitos e a estimulação da síntese e secreção de mediadores pró-inflamatórios e outras citocinas, faz parte do mecanismo de ação de β -glucanos de grande peso molecular, principalmente (WILLIAMS; MUELLER; EROWDER, 1996). Estudos realizados *in vitro* demonstraram que as enzimas digestivas podem reduzir o peso molecular dos β -glucanos, o que, em tese, pode reduzir o efeito imunomodulatório destas fibras quando administradas via oral (BEER et al., 1997; LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007; KUDRENKO; SNAPE; BARNES, 2009). No entanto, estudos que avaliaram a suplementação via dieta de β -glucanos sobre parâmetros imunológicos, foram capazes de demonstrar efeitos imunomodulatórios marcados pela modulação do índice de fagocitose, aumento do número de linfócitos T e menor produção de marcadores inflamatórios (LIN et al., 2019; THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Estes resultados corroboram o entendimento deste polissacarídeo como um imunomodulador importante, que pode ser administrado via oral ou incorporado em alimentos extrusados secos para cães sem sofrer perda em suas funções.

3. HIPÓTESE

A mínima inclusão de β -glucanos na dieta resulta em efeitos benéficos quanto aos parâmetros digestivos e imunológicos e é capaz de modular a microbiota de cães adultos saudáveis.

4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da adição de teores crescentes (0,0%; 0,07%; 0,14%; 0,28%) de β -glucanos em alimento seco extrusado sobre variáveis digestivas, imunológicas e microbiota de cães adultos saudáveis e, por meio da comparação entre os resultados, definir a recomendação ideal para inclusão deste prebiótico na dieta de cães.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

O experimento foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet), do Departamento de Nutrição e Produção Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), localizado no Campus Fernando Costa, em Pirassununga, São Paulo.

5.2 Animais

Foram utilizados 8 cães (4 da raça border collie e 4 da raça cocker spaniel inglês), machos e fêmeas, adultos, castrados, com idade de $3,5 \pm 0,5$ anos, em escore de condição corporal (LAFLAMME, 1997) e escore de massa muscular (MICHEL et al., 2011) ideais, clinicamente sadios, desverminados e vacinados.

A higidez dos animais foi avaliada previamente por meio de exames físico, hemograma e bioquímicos para a avaliação das enzimas hepáticas, ureia e creatinina. As amostras de sangue para a realização de hemograma foram armazenadas em tubos BD Vacutainer® com EDTA e as análises realizadas por meio de equipamento hematológico automático BC2800Vet (Mindray, China), método *May-Grunwald-Giemsa* modificado e refratometria (Refratômetro portátil - Quimis, Brasil) para obtenção da proteína plasmática total. Ademais, para os exames bioquímicos, as amostras de sangue foram armazenadas em tubos BD Vacutainer® com ativador de coágulo e, na sequência, a determinação realizada com uso de espectrofotômetro automático BS120 (Mindray, China) e kits comerciais Labtest.

Os cães foram alojados em canis com 3,42m² de área coberta e com solário de 7,21m², piso de concreto e paredes de azulejo, agrupados de acordo com a afinidade social (dois a três animais por canil) previamente determinada e, acesso a água *ad libitum*. Com o intuito de promover bem-estar aos animais, estes foram soltos para socialização e atividade física em parques gramados com área de 40m² por parque, duas vezes ao dia, exceto durante os períodos de coleta de amostras, nos quais os animais foram mantidos presos em seus canis, sendo soltos em grupos para realização de atividade física supervisionada, em local concretado. Durante os períodos de coleta de fezes, os animais mantiveram-se alojados em canis individualizados.

5.3 Alimentação

Os cães receberam quatro alimentos experimentais formulados para animais em manutenção, com ingestão monitorada diariamente. As dietas foram confeccionadas na fábrica de ração da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ/UNESP), localizada em Botucatu–SP (Tabela 1).

Em casos nos quais o animal não ingerisse no mínimo 70% da quantidade fornecida do alimento e o escore de condição corporal oscilasse dois pontos para mais ou para menos, este seria removido do experimento e a causa da rejeição seria avaliada pela médica veterinária responsável. Ao longo de todo o protocolo experimental, nenhum animal foi enquadrado nestas condições.

A necessidade energética para manutenção (NEM) foi determinada pela equação: $110 \times PC^{0,75}$ (FEDIAF, 2020), sendo PC = peso corporal do animal. Esta fórmula é recomendada para cães com moderada atividade física. Com o resultado deste cálculo foi possível determinar a quantidade de alimento a ser fornecida diariamente, ao dividi-lo pela energia metabolizável dos alimentos experimentais.

A quantidade de alimento foi reajustada a cada quinze dias, após pesagem dos animais e avaliação do escore de condição corporal (ECC), considerando-se a escala de 9 pontos descrita por Laflamme (1997) e, escore de massa muscular (EMM) de acordo com a escala de 4 pontos descrita por Michel et al. (2011). Em casos de ganho ou perda de peso suficientes para aumentar ou diminuir pontos na escala de ECC, a quantidade de alimento fornecida diariamente foi reajustada para que o animal se mantivesse em ECC ideal (4 ou 5).

Tabela 1. Composição em ingredientes (%) dos alimentos experimentais

Ingredientes	A0	A1	A2	A3
Milho	33,26	33,19	33,12	32,98
Farinha de vísceras comum	26,38	26,38	26,38	26,38
Quirera de arroz	15,00	15,00	15,00	15,00
Glúten de milho 60	7,99	7,99	7,99	7,99
Polpa de beterraba	4,00	4,00	4,00	4,00
Óleo de peixe 18/12	0,82	0,82	0,82	0,82
Cloreto de potássio	0,42	0,42	0,42	0,42
Premix vitamínico	0,37	0,37	0,37	0,37
Sal	0,30	0,30	0,30	0,30
Colina 60%	0,17	0,17	0,17	0,17
Ovo integral em pó	0,15	0,15	0,15	0,15
Premix mineral	0,13	0,13	0,13	0,13
Antifúngico	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante	0,07	0,07	0,07	0,07
DL metionina 99%	0,03	0,03	0,03	0,03
Óleo de vísceras de frango	6,81	6,81	6,81	6,81
Banha suína	4,00	4,00	4,00	4,00
β -glucano ¹	0,00	0,07	0,14	0,28
Total	100	100	100	100

Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos; ¹Produto utilizado contém 60% de pureza em relação aos β -glucanos em sua composição

5.4 Protocolo experimental

O protocolo experimental deste projeto foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) – CEUA nº 2866090223.

O delineamento experimental utilizado foi do tipo quadrado latino 4x4, contendo quatro alimentos experimentais: Alimento Controle (A0), alimento sem a adição de β -glucanos; Alimento β -glucanos 1 (A1), alimento com a adição de 0,07% de β -glucanos; Alimento β -glucanos 2 (A2), alimento com a adição de 0,14% de β -glucanos e; Alimento β -glucanos 3 (A3), alimento com a adição de 0,28% de β -glucanos; e quatro períodos experimentais.

Os 8 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois quadrados contemporâneos balanceados, seguindo o delineamento utilizado, como representado na Figura 1. Cada período teve duração de 35 dias.

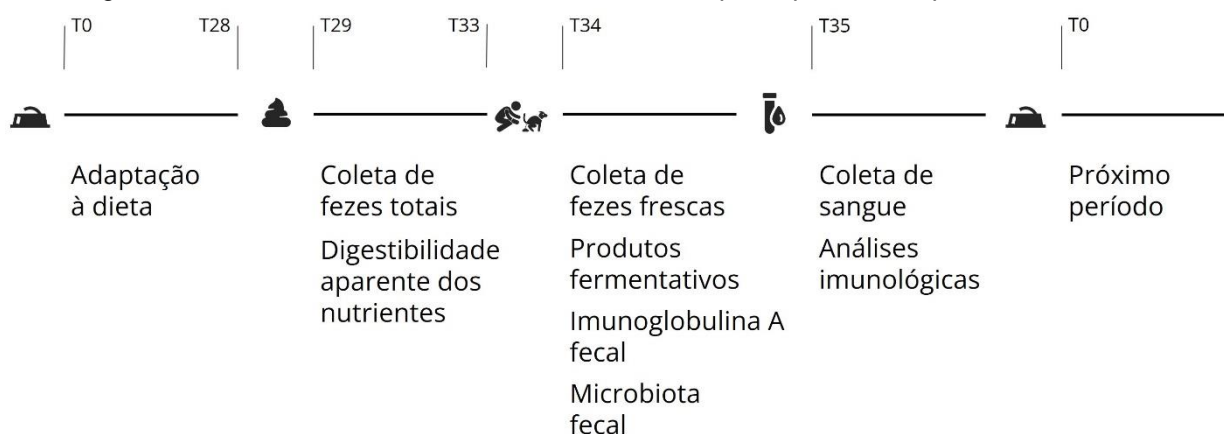
Figura 1. Delineamento experimental em quadrado latino

Animal Período	1	2	3	4	Animal Período	5	6	7	8
I	A0	A1	A2	A3	I	A0	A1	A2	A3
II	A1	A2	A3	A0	II	A1	A2	A3	A0
III	A3	A0	A1	A2	III	A3	A0	A1	A2
IV	A2	A3	A0	A1	IV	A2	A3	A0	A1

Fonte: Marchi (2023)

No total, o experimento foi constituído por 140 dias, sendo os primeiros 28 dias de cada período destinados à adaptação às dietas e os sete dias seguintes destinados às coletas de fezes e sangue necessários para análise de digestibilidade aparente dos nutrientes, escore fecal, produtos fermentativos, microbiota fecal e parâmetros imunológicos (Figura 2). Destes sete dias de coleta, durante cinco dias consecutivos as fezes dos animais foram coletadas, pesadas e armazenadas, as quais, à posteriori, foram utilizadas para determinação dos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes dos alimentos formulados. Após este período, um dia foi destinado à coleta de fezes frescas e “assépticas” para as análises de microbiota fecal, produtos fermentativos e imunoglobulina A (IgA) fecal. Durante todos os dias de coletas, as fezes foram caracterizadas por meio do escore fecal (WALTHAM, 2000). Por fim, o último dia dos períodos de coleta foram destinados a colheita de sangue para as análises de parâmetros imunológicos. Em cada período, foram coletados ao todo 10mL de sangue da veia jugular por meio do uso de seringa de 10mL e agulha nº 21G.

Figura 2. Procedimentos realizados em cada um dos quatro períodos experimentais



Fonte: Marchi (2023)

5.5 Digestibilidade aparente dos nutrientes

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foram determinados pelo método de coleta total de fezes, segundo recomendações da AAFCO (2019). O consumo de alimento foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição. Durante cinco dias, as fezes foram coletadas integralmente após totalização de 24 horas do fornecimento do alimento. Estas foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados e, armazenadas em freezer a -15°C até posterior análise. Ao final do período de coleta, estas foram descongeladas, pesadas e secas em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo, Brasil) na temperatura de 55°C , por 72 horas. As fezes pré-secas e as dietas foram moídas em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo, Brasil), com peneira de 1mm para proceder-se as análises laboratoriais.

Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB), das fezes e dos alimentos, foram determinados segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995), além disso, também foram determinados os teores de cálcio e fósforo dos alimentos (AOAC, 1995). Os extrativos não-nitrogenados (ENN) foram calculados pela diferença entre a MS e a soma da PB, EEHA, FB e MM. Todas as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, localizado em Pirassununga-SP.

Baseado nos resultados obtidos em laboratório, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo em hidrólise ácida, fibra bruta e extrativos não-nitrogenados dos alimentos. Estes cálculos foram realizados por meio da seguinte fórmula:

$$\text{CDAN \%} = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

5.6 Avaliação dos produtos fermentativos

5.6.1 Determinação da concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta e cadeia curta ramificada

Para tal determinação, foram coletadas fezes frescas, em até 30 minutos após a defecação e, pesados três gramas, os quais foram acondicionados em tubos do tipo Falcon e diluídos em 9mL de ácido fórmico titulado a 16%. Em vista da obtenção de extrato, estas diluições foram mantidas em refrigerador e homogeneizadas diariamente. Passados sete dias, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 15 minutos a 15°C por três vezes, entre as quais o sobrenadante foi aproveitado e o sedimento desprezado. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer a -15°C.

As determinações de ácidos graxos de cadeia curta e ácidos graxos de cadeia curta ramificada foram realizadas por cromatografia gasosa (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão), de acordo com Erwin et al. (1961). Foi utilizado detector de ionização de chama, controlado pelo programa Shimadzu GC Solution e, coluna de separação Stalbilwax, de 30 metros e 0,53mm. O gás hélio foi utilizado como carreador, o nitrogênio como *make up*, o oxigênio com regulagem manual e injetor e o detector de chama mantido a 250°C. A temperatura da coluna foi mantida em 145°C. Para calibração, foi utilizada solução de padrão externa contendo ácido acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico e isobutírico.

A amostra líquida, previamente centrifugada, foi injetada e vaporizada percorrendo, com auxílio do gás de arraste a coluna. Nesta coluna os ácidos vaporizados mais leves percorrem mais rapidamente a coluna, atingindo o detector de ionização de chama. Neste, a corrente formada pela ionização da chama com o ácido

foi coletada e enviada a um computador na forma de impulso elétrico. Este calculou a concentração da amostra e comparou as áreas dos picos formados pela intensidade dessa corrente com a área dos picos formados pela solução contendo o ácido padrão. Desta forma, calculou-se a concentração da amostra por meio de uma regra de três simples. Estas determinações foram realizadas no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal – FZEA/USP, situado no campus Fernando Costa em Pirassununga – SP.

5.6.2 Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal fecal

Para tal determinação, foram coletadas fezes frescas, em até 30 minutos após a defecação e, pesados três gramas, os quais foram acondicionados em tubos do tipo Falcon e diluídos em 9mL de ácido fórmico titulado a 16%. Em vista da obtenção de extrato, estas diluições foram mantidas em refrigerador e homogeneizadas diariamente. Passados sete dias, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 15 minutos a 15°C por três vezes, entre as quais o sobrenadante foi aproveitado e o sedimento desprezado. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer a -15°C.

Os extratos foram descongelados em temperatura ambiente e, em seguida, alíquotas de 2mL foram diluídas em 13mL de água destilada. A destilação foi realizada imediatamente após pipetados 5mL de solução de hidróxido de potássio 2N, em destilador de nitrogênio. Após finalizada, 10mL de ácido bórico foram pipetados na solução destilada. Por fim, a titulação foi realizada com solução de ácido clorídrico 0,005mol/L, conforme descrito por Vieira (1980). Estas análises foram realizadas em duplicata no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/USP, situado no campus Fernando Costa em Pirassununga – SP.

5.6.3 Determinação da concentração de ácido láctico fecal

Para tal determinação, foram coletadas fezes frescas, em até 30 minutos após a defecação e, pesados três gramas, os quais foram acondicionados em tubos do tipo Falcon. As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer a -15°C. Cada amostra foi homogeneizada e misturada com 2mL de água destilada (1:2 p/v). Estas misturas foram mantidas pelo período de três dias em refrigerador (5°C) e foram homogeneizadas diariamente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas, durante 5 minutos, a 2852 rpm (Fanem 206-R Centrífuga Excelsa Baby II, São Paulo,

Brasil) aproveitando-se o sobrenadante. Em um tubo de ensaio foi colocado 1mL do sobrenadante e 6mL de ácido sulfúrico, que após serem agitados foram colocados em água fervente a 80°C durante três minutos. Após os tubos esfriarem, foi adicionado 0,1mL de uma solução que continha 1,5 grama de p-hidroxibifenil e 100mL de dimetilformamida e, os tubos foram colocados novamente em água fervente a 80°C durante 90 segundos. O ácido láctico foi mensurado de acordo com a metodologia descrita por Pryce (1969), por meio do método de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente com o objetivo de calibrar o espectrofotômetro (Nova 2000UV Spectrophotometer, Piracicaba, Brasil). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. Estas análises foram realizadas em triplicata no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/USP, situado no campus Fernando Costa em Pirassununga – SP.

5.6.4 Determinação do pH fecal

Foi pesado um grama de fezes frescas, em até 30 minutos após a defecação, o qual foi diluído em 9mL de água destilada, para posterior mensuração do pH da solução, conforme método adaptado de Walter et al. (2005). A avaliação do pH foi realizada em pHmetro digital de bancada com eletrodo autônomo (Starter 3100, ph Bench, Ohaus, São Paulo/SP). Após o preparo, foi realizada introdução direta do eletrodo em solução 9:1 de água destilada e fezes e computado o pH. Estas determinações foram realizadas no Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos – FMVZ/USP, localizado no campus Fernando Costa em Pirassununga – SP

5.7 Avaliação da imunidade

5.7.1 Imunofenotipagem de linfócitos

As amostras sanguíneas foram diluídas com PBS na proporção de 1:1. Em um tubo cônico de centrifugação estéril de 15mL foi inserido 2mL do gradiente de densidade Ficoll-Parque e 1mL do sangue diluído. O constituinte foi centrifugado durante 20 minutos a 400 x g e 20°C para a separação de células mononucleares de interface e, então, o material foi acondicionado em tubo criogênico e armazenado em freezer -80°C.

Foram avaliados o número de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e a relação CD4/CD8. As células mononucleares (2×10^5 células/mL) foram incubadas em microtubos (1,5mL) com os anticorpos CD3⁺ (1:100) e CD4 (1:10) (Anticorpo Serotec, Biolegend e eBioscience), diluídos em 100µL de tampão para citometria (PBS contendo 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Foram incluídos no ensaio os anticorpos isotipos para definição da região negativa (*background*). As células foram incubadas durante 20 minutos a 4°C, protegidas da luz. Após o término do período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão para citometria em volume de 1000µL por microtubo. Por fim, as células foram ressuspensas em 500µL de PBS. Foi selecionada como população de linfócitos as células com baixo tamanho (FSC) e baixa complexidade (SSC), de acordo com o *gate* delimitado. A partir desta seleção, determinou-se as distintas populações de linfócitos. A aquisição e a análise de 10.000 células foram realizadas por meio da técnica de citometria de fluxo. Estas determinações foram realizadas no Laboratório de Imuno-oncologia Comparada – FMVZ/USP, localizado em São Paulo – SP.

5.7.2 Teste de fagocitose e *burst* oxidativo

Leucócitos sanguíneos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) foram incubados com um reagente fluorescente que indica a produção de espécies reativas de oxigênio em estado basal e após a fagocitose de bactérias *S. aureus*. As células foram incubadas com os reagentes DCFH-DA em PBS (tampão fosfato salina) e DCFH e a *S. aureus* marcada com fluorocromo (iodeto de propídeo) e, então mantidas a 37°C durante 20 minutos. Após este período, as hemácias foram rompidas por meio de solução de *lise* e procedeu-se com as lavagens com PBS até a obtenção de uma amostra com aspecto límpido, a qual foi submetida a leitura em citômetro de fluxo modelo FACS Calibur (Becton & Dickinson). Estas determinações foram realizadas no Laboratório de Imuno-oncologia Comparada – FMVZ/USP, localizado em São Paulo – SP.

5.7.3 Determinação de IgA fecal

Para tal determinação, foram coletadas fezes frescas, em até 30 minutos após a defecação e, pesados três gramas, os quais foram acondicionados em tubos do tipo Falcon e armazenados em freezer -80°C. Após descongelamento, a IgA foi extraída

por meio do uso de solução salina, de acordo com método descrito por Peters et al. (2004). Um grama de fezes foi pesado e adicionado a 10mL de tampão de extração [PBS 0,01 M, pH 7,4, Tween 80 a 0,5% (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, Reino Unido) e 0,05% de azida de sódio] e homogeneizados. A suspensão foi centrifugada a 1.500 × g durante 20 minutos a 5°C.

Do sobrenadante, 2mL foram transferidos para um tubo cônico de 5mL contendo 20µL de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), homogeneizados e centrifugados a 15.000 × g durante 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf e armazenado a -20°C. A quantificação da IgA foi realizada por meio da utilização de kit de ELISA para IgA canina (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em um Leitor de Microplacas ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technologies, Chantilly, VA), equipado com filtro de 450nm. Estas determinações foram realizadas no laboratório LEAC, localizado em São Paulo – SP.

5.8 Microbiota

Fezes frescas e com uso de luvas estéreis foram coletadas para a realização desta análise. Após a coleta, as fezes foram armazenadas em tubos plásticos estéreis de tampa rosqueável e, em seguida, colocadas em tubos plásticos (Eppendorf®) até a marcação de 1,5mL, os quais foram vedados com Parafilm® e armazenados em freezer a -80°C.

A extração do DNA total foi realizada com o uso do kit Quick-DNA Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research), segundo protocolo do fabricante. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20µL, cujo conteúdo incluiu 10µL de GoTaq® Green PCR Master Mix (Promega, USL), 1uL de oligonucleotídeo *forward* a 5µM, 1uL de oligonucleotídeo *reverse* a 5µM, 1uL de DNA genômico e água ultrapura estéril, suficiente para 20uL. Para amplificação foram utilizados dois primers distintos e as reações foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida por 27 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Estas obtiveram comprovação por meio

de eletroforese em gel de agarose 2,0%, corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v) ~600bp (tamanho do amplicon).

A reação de indexação foi realizada de acordo com o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de indexação consistiu de incubação a 72°C durante 3 minutos, desnaturação inicial a 95°C durante 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C durante 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

As bibliotecas geradas foram submetidas as 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. Em seguida, foi realizada a quantificação por meio do método PCR em Tempo Real utilizando Kit KAPA (Library Quantification Kit - Illumina/Universal) no equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems), todos de acordo com protocolo do fabricante. Gerou-se um Pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 4 nM 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 V2 Nano 500 ciclos – leitura PE 2 x 250 pb. O cartucho de sequenciamento foi carregado com 20% de Phix (PhiX Control v3 – Illumina).

Estas determinações foram realizadas no laboratório de pesquisa biotecnológica BPI Biotecnologia, localizado em Botucatu – SP.

5.10 Análise estatística

Neste estudo, o delineamento utilizado foi quadrado latino duplo contemporâneo com quatro tratamentos (0,00; 0,07; 0,14 e 0,28% de inclusão de β -glucanos). Para as variáveis de digestibilidade aparente dos nutrientes, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos foi utilizado um modelo linear misto geral, considerando o efeito fixo de tratamento (0,00; 0,07; 0,14 e 0,28% de inclusão de β -glucanos), bem como os efeitos aleatórios de animal dentro de quadrado, período e resíduo. Para avaliação das abundâncias observadas para cada filo, família e gênero foi adotado um modelo linear misto generalizado, considerando a distribuição binomial das abundâncias e utilizando a função de ligação *logit*. O modelo estatístico incluiu o efeito fixo de tratamento e os efeitos aleatórios de animal dentro de quadrado, período

e resíduo. Em caso de resultados significativos nas análises de variância tipo 3, utilizou-se o teste de Tukey-Kramer como procedimento de comparação múltipla. Todas as análises foram realizadas com auxílio dos procedimentos PROC MIXED e PROC GLIMMIX, respectivamente, do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

6. RESULTADOS

Ao longo da execução do experimento, todos os animais permaneceram sadios e não foram relatados episódios de êmese ou diarreia. O acompanhamento da ingestão de alimento durante os períodos experimentais confirmou a ingestão completa das refeições, suficientes para a manutenção do peso corporal e ECC dos animais. Portanto, não foi necessária a exclusão de nenhum animal neste estudo.

O peso corporal médio dos animais foi $17,55 \pm 5,47$ kg e o consumo diário médio das dietas foi $221,38 \pm 53,88$ g, durante todo o período experimental do estudo. Portanto, ao considerar a pureza de 60% do produto utilizado como fonte de β -glucanos, a ingestão deste prebiótico em cada tratamento foi: 0mg/kg após consumo do tratamento A0; 5,30mg/kg após consumo do tratamento A1; 10,60mg/kg após consumo do tratamento A2 e; 21,20mg/kg após consumo do tratamento A3.

Em relação às determinações dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, as análises bromatológicas dos quatro alimentos experimentais apontaram valores de composição química similares entre eles (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química dos alimentos experimentais

	Tratamentos			
	A0	A1	A2	A3
Matéria seca (%)	93,11	94,31	94,00	93,13
	Composição química em MS (%)			
Matéria orgânica¹	92,13	92,07	92,04	91,93
Proteína bruta	25,25	25,07	27,81	28,24
Extrato etéreo em hidrólise ácida	17,69	17,82	17,71	17,42
Matéria mineral	7,87	7,93	7,96	8,07
Fibra bruta	10,17	9,92	10,15	8,28
Extrativos não-nitrogenados¹	39,02	39,26	36,37	37,99
Cálcio	2,09	2,07	2,13	2,06
Fósforo	1,19	1,17	1,18	1,17
Energia metabolizável (kcal/g)²	4,10	4,15	4,14	4,09

Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos; MS = matéria seca; ¹Variáveis estimadas por fórmulas; ²Variável estimada de acordo com modelo matemático proposto pelo NRC (2006)

Foi observada diferença entre as médias dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da PB após o consumo dos A2 e A3 pelos cães, quando comparadas com as médias obtidas para A0 e A1 ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças entre as médias dos CDAs dos nutrientes MS, MO, EEHA, MM, FB e ENN (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (%) das dietas experimentais

	Tratamentos				EPM	p
	A0	A1	A2	A3		
Matéria seca	82,25	82,75	82,72	83,29	0,44	0,3162
Matéria orgânica	87,83	88,32	88,34	88,71	0,31	0,1546
Proteína bruta	85,85 ^b	85,99 ^b	87,50 ^a	88,19 ^a	0,33	<0,0001
Extrato etéreo em hidrólise ácida	96,58	96,20	96,26	96,52	0,26	0,3703
Matéria mineral	69,47	81,55	77,89	79,09	5,41	0,4065
Fibra bruta	17,01	18,11	17,75	21,52	2,15	0,3613
Extrativos não-nitrogenados	87,17	87,94	88,04	87,61	0,53	0,5585

Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos; EPM = erro padrão da média

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed

Em relação às avaliações de produtos fermentativos e pH nas amostras de fezes dos cães, não foi possível verificar diferenças entre as médias de concentração obtidas nos quatro tratamentos para as variáveis de nitrogênio amoniacal, ácido láctico, ácidos graxos e pH fecais (Tabela 4).

Tabela 4. Produtos fermentativos, ácidos graxos e pH fecal observados no estudo

	Tratamentos				EPM	p
	A0	A1	A2	A3		
Produtos fermentativos						
Nitrogênio amoniacal (mmol/kg MS)	6,97	6,92	7,28	7,13	0,62	0,9576
Ácido láctico (mM/kg MS)	4,80	5,41	5,65	5,21	0,72	0,5905
Ácidos graxos totais (mM/kg MS)	54,66	54,18	58,26	56,15	2,40	0,3792
pH fecal	6,68	6,66	6,53	6,59	0,12	0,7406
Ácidos graxos de cadeia curta						
Acetato (mM)	33,13	31,75	32,98	32,91	1,77	0,8785
Propionato (mM)	13,77	14,34	15,64	15,13	1,00	0,1219
Butirato (mM)	6,26	6,58	7,72	6,57	1,00	0,6592

	Ácidos graxos de cadeia ramificada					
Valerato (mM)	0,10	0,29	0,18	0,11	0,09	0,4069
Isovalerato (mM)	0,76	0,69	1,00	0,81	0,10	0,0664
Isobutirato (mM)	0,66	0,61	0,76	0,65	0,06	0,1466
Total	1,49	1,52	1,92	1,54	0,18	0,1534

Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos; MS = matéria seca; EPM = erro padrão da média

A respeito da avaliação das variáveis de imunidade, foi detectada significância acerca da imunidade adaptativa dos animais, caracterizada por diferença entre a média da variável relação T CD4⁺:CD8⁺ dos cães que consumiram o A2, quando comparada com os cães que consumiram A0 ($p=0,0368$). Acerca da porcentagem de fagocitose, intensidade de fagocitose, *burst* oxidativo, porcentagens de população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e concentração de IgA fecal, não foram observadas diferenças (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados dos testes de imunofenotipagem de linfócitos (porcentagem das células T CD4⁺, T CD8⁺ e relação T CD4⁺:CD8⁺), fagocitose, *burst* oxidativo e IgA fecal observados no estudo

	Tratamentos				EPM	p
	A0	A1	A2	A3		
Fagocitose (%)	68,63	75,25	76,79	78,04	4,15	0,0692
Intensidade de fagocitose	32,85	36,56	30,33	37,80	7,47	0,2546
<i>Burst</i> oxidativo PMA	894,00	809,37	785,62	1029,12	160,39	0,4423
Linfócitos T CD4⁺ (%)	37,9	42,49	44,53	42,60	2,45	0,2210
Linfócitos T CD8⁺ (%)	29,81	27,33	23,35	26,23	2,48	0,1237
Relação T CD4⁺:CD8⁺	1,33 ^b	1,71 ^{ab}	1,99 ^a	1,74 ^{ab}	0,19	0,0368
IgA fecal (pg/mL)	225,091	271,41	242,35	229,73	53,81	0,9254

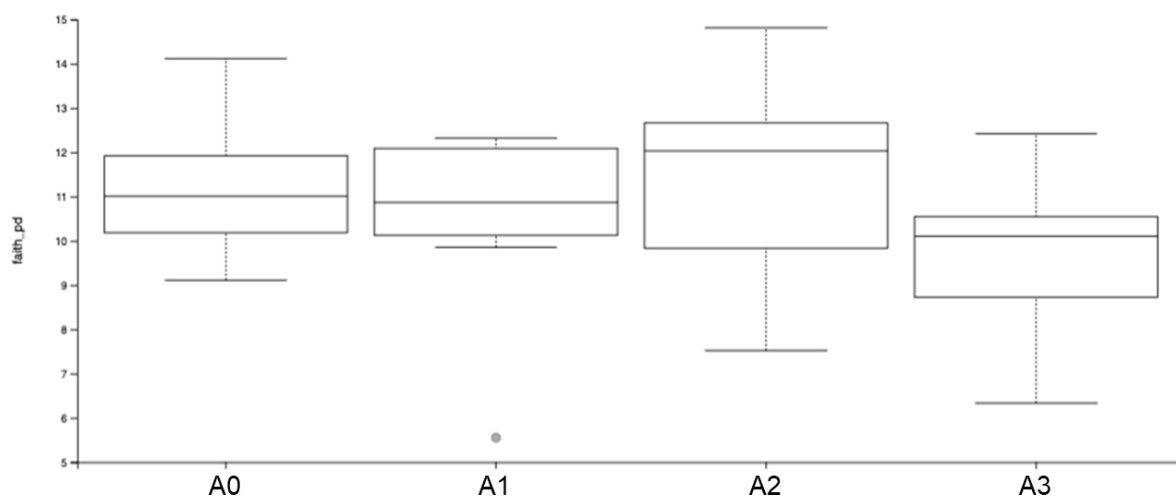
Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos; PMA = acetato de forbol miristato; EPM = erro padrão da média

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey-Kramer ajustado pelo Proc Mixed

Dentre os resultados obtidos por meio do sequenciamento da microbiota fecal dos animais, não foram encontradas diferenças nas métricas de diversidade alfa, determinadas pelos índices de diversidade filogenética de Faith ($p=0,1414$; Figura 3) e uniformidade de Pielou ($p=0,1151$; Figura 4).

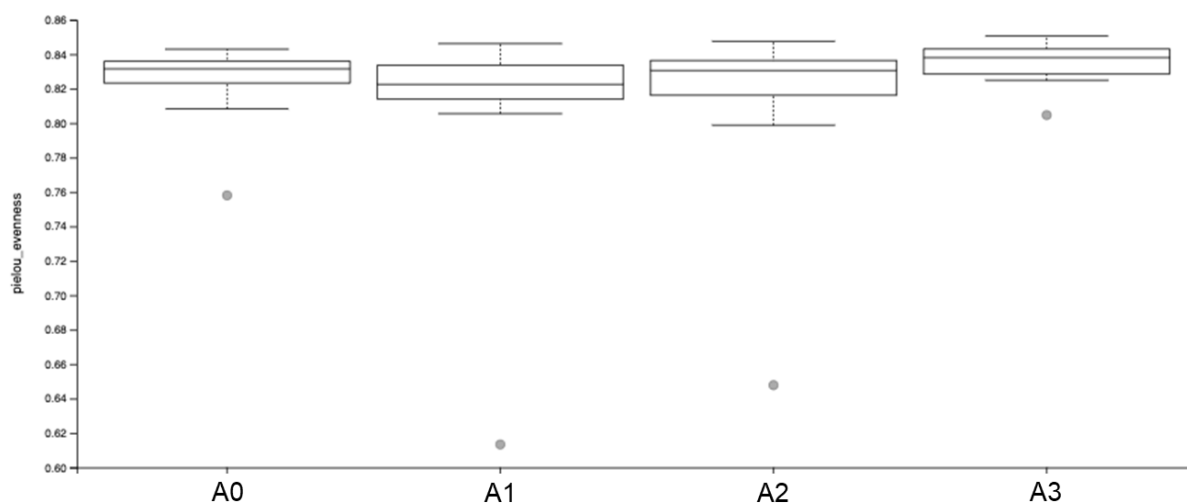
Figura 3. Índice de diversidade filogenética de Faith observado nos grupos experimentais



Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

Figura 4. Índice de uniformidade de Pielou observado nos grupos experimentais

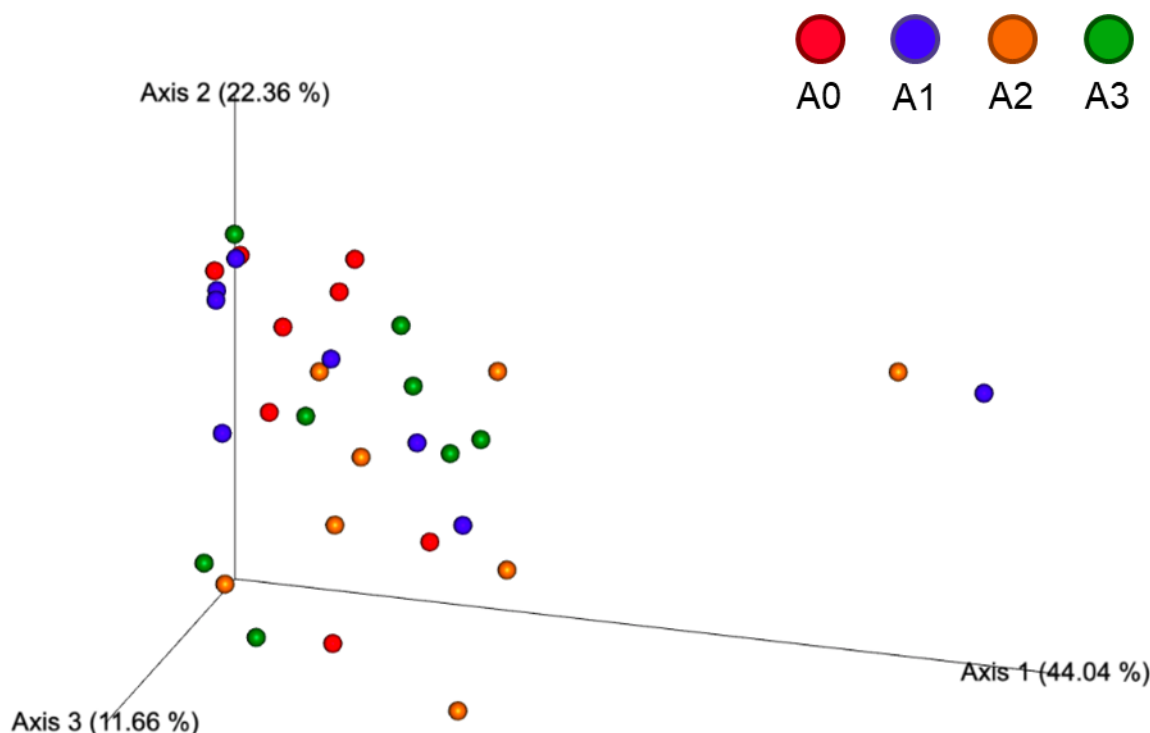


Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

A determinação da diversidade beta, avaliada por meio de análise de coordenadas principais 3D, realizada pelo programa QIIME versão 2022.9 (Figura 5), apontou agrupamento dos tratamentos experimentais entre os eixos, o que pressupõe pouca variação taxonômica entre os quatro. No entanto, foi possível observar variabilidade taxonômica entre o microbioma dos animais do tratamento A0 quando comparado aos animais do tratamento A2 ($p=0,047$).

Figura 5. Análise tridimensional de componentes principais por meio dos dados relativos obtidos por meio do sequenciamento das amostras fecais dos grupos experimentais



Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

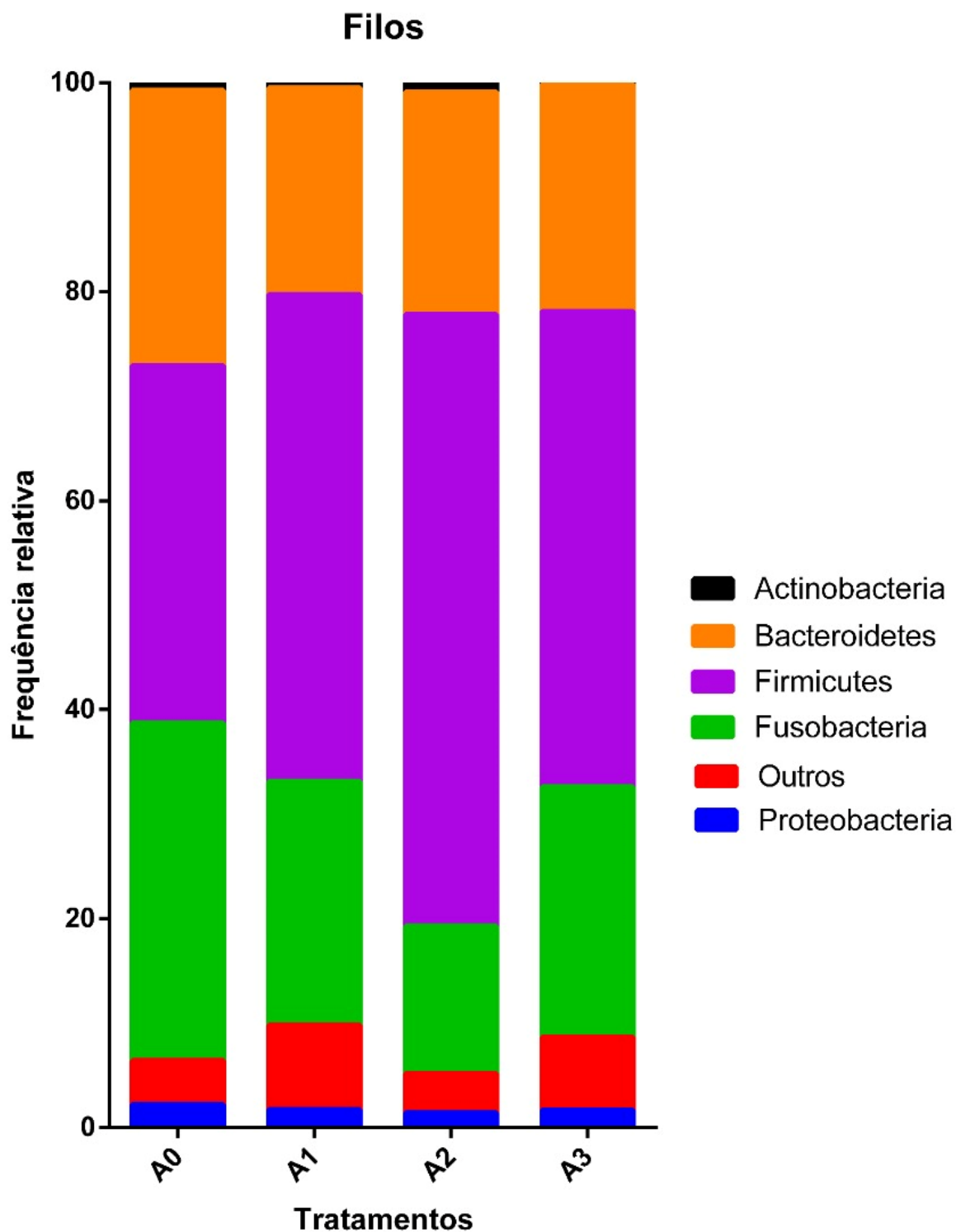
No total, foram identificados seis filós, 32 famílias e 82 gêneros distintos por meio do sequenciamento das amostras dos quatro grupos experimentais. Devido ao baixo número de observações de determinados filós, famílias e gêneros nas amostras, estes foram excluídos das análises estatísticas, uma vez que a baixa representatividade impossibilitou a comparação entre os tratamentos.

Do total de filós caracterizados, cinco foram analisados e um foi excluído das comparações estatísticas. Em todos os quatro tratamentos, o filo Firmicutes apresentou as maiores abundâncias relativas médias (34,18–58,54%) e os filós Proteobacteria (2,21–1,42%) e Actinobacteria (0,90–0,15%), as menores. Foi possível observar que, após o consumo dos tratamentos A0, A1 e A3, a segunda e terceira maiores abundâncias relativas foi representada pelos filós Fusobacteria (32,32–23,92%) e Bacteroidetes (26,38–19,75%), respectivamente. No entanto, observou-se inversão nesta classificação em cães que consumiram o tratamento A2, marcada por

maior abundância de Bacteroidetes (21,30%) em relação ao Fusobacteria (14,09%; Figura 6).

Foram observadas diferenças variadas sobre a abundância relativa dos cinco filos analisados, as quais foram dependentes do teor de β -glucanos incluído na dieta (Tabela 6). O comportamento das bactérias do filo Actinobacteria foi de redução após o consumo de A1, a qual foi maximizada após o consumo de A3. No entanto, não houve diferença entre os tratamentos A0 e A2 ($p < 0,0001$). Para Bacteroidetes, observou-se redução após o consumo dos três tratamentos com β -glucanos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). O tratamento que proporcionou a maior redução da abundância relativa desse filo foi o A1, quando comparado com A2 e A3, os quais não diferiram entre si. A redução após o consumo de β -glucanos também foi observada nos filos Fusobacteria e Proteobacteria, cujas abundâncias relativas foram as menores após o consumo de A2. Já os tratamentos A1 e A3 não diferiram entre si, mas apresentaram valores menores quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). Em contraste aos anteriores, o filo Firmicutes foi modulado (de forma positiva) após o consumo de β -glucanos. Quando comparado ao controle, o tratamento que maximizou o aumento da abundância relativa destas bactérias foi A2, seguido de A1 e A3, os quais não diferiram entre si ($p < 0,0001$).

Figura 6. Distribuição dos filos bacterianos observados nos grupos experimentais



Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

Tabela 6. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão das abundâncias relativas dos filos observados nos grupos experimentais

Filos (%)	Tratamentos				p
	A0	A1	A2	A3	
Actinobacteria	0,72±0,49 ^a	0,51±0,35 ^b	0,90±0,61 ^a	0,15±0,10 ^c	<0,0001
Bacteroidetes	26,38±6,99 ^a	19,75±5,70 ^c	21,30±6,03 ^b	21,73±6,12 ^b	<0,0001
Firmicutes	34,18±9,16 ^c	46,59±10,13 ^b	58,54±9,88 ^a	45,54±10,10 ^b	<0,0001
Fusobacteria	32,32±5,76 ^a	23,33±4,72 ^b	14,09±3,19 ^c	23,92±4,80 ^b	<0,0001
Proteobacteria	2,21±1,08 ^a	1,72±0,84 ^b	1,42±0,69 ^c	1,67±0,82 ^b	<0,0001

Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

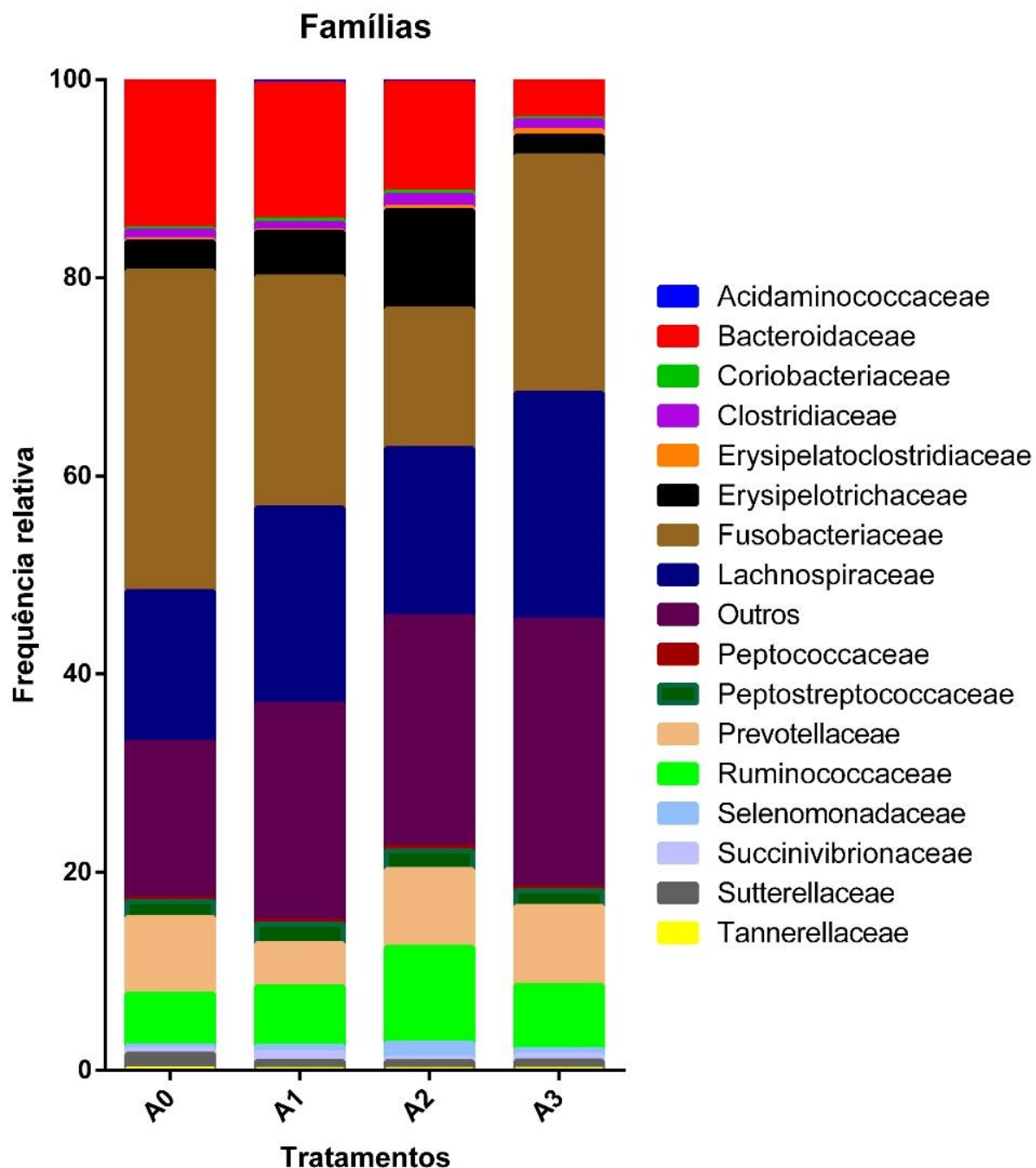
^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey-Kramer ajustado pelo Proc Mixed

Em relação ao total de famílias caracterizadas, 16 foram analisadas e outras 16 foram excluídas. Em todos os quatro tratamentos, as três famílias com maior abundância relativa média foram *Bacteroidaceae* (16,17–11,76%), *Fusobacteriaceae* (32,32–14,09%) e *Lachnospiraceae* (22,89–15,18%). O tratamento controle apresentou a classificação, em ordem decrescente: *Fusobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* e *Lachnospiraceae*. Os tratamentos A1 e A3 apresentaram maior abundância de *Lachnospiraceae* em comparação com *Bacteroidaceae*. Por fim, o tratamento A2 foi distinto dos anteriores, pois apresentou a maior abundância relativa para *Lachnospiraceae*, seguido de *Fusobacteriaceae* e *Bacteroidaceae* (Figura 7).

Do total de famílias analisadas, observou-se diferença para 15 delas, as quais apresentaram modulações variadas de acordo com a dose ingerida de β -glucanos (Tabela 7). Foi observada modulação positiva nas famílias *Coriobacteriaceae* ($p=0,0111$), *Erysipelatoclostridiaceae* ($p<0,0001$), *Lachnospiraceae* ($p<0,0001$), *Peptostreptococcaceae* ($p=0,0003$), *Ruminococcaceae* ($p<0,0001$), *Selenomonadaceae* ($p<0,0001$) e *Succinivibrionaceae* ($p<0,0001$). Ademais, foi observada modulação negativa para *Acidaminococcaceae* ($p<0,0001$), *Bacteroidaceae* ($p<0,0001$), *Fusobacteriaceae* ($p<0,0001$), *Prevotellaceae* ($p<0,0001$), *Sutterellaceae* ($p<0,0001$) e *Tannerellaceae* ($p=0,0438$) após o consumo de distintos teores de β -glucanos. Em específico, a família *Erysipelotrichaceae* ($p<0,0001$) apresentou modulações positivas e negativas em suas abundâncias relativas, quando comparadas com o grupo controle. Ademais, a família *Clostridiaceae* ($p=0,0011$) foi modulado apenas nos tratamentos A1 (0,74±0,43%) e A2

(1,14±0,65%). Não foi observada diferença na abundância relativa de *Peptococcaceae* após o consumo dos quatro tratamentos experimentais ($p=0,3061$).

Figura 7. Distribuição das famílias bacterianas observadas nos grupos experimentais



Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

Tabela 7. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão das abundâncias relativas das famílias observadas nos grupos experimentais

Famílias (%)	Tratamentos				p
	A0	A1	A2	A3	
<i>Acidaminococcaceae</i>	0,46±0,09 ^a	0,42±0,09 ^a	0,38±0,08 ^a	0,16±0,04 ^b	<0,0001
<i>Bacteroidaceae</i>	16,17±3,53 ^a	13,77±3,09 ^b	10,99±2,55 ^c	11,76±2,70 ^c	<0,0001
<i>Clostridiaceae</i>	0,94±0,54 ^{ab}	0,74±0,43 ^b	1,14±0,65 ^a	1,02±0,59 ^{ab}	0,0011
<i>Coriobacteriaceae</i>	0,20±0,10 ^b	0,35±0,17 ^a	0,37±0,18 ^a	0,22±0,11 ^b	0,0111
<i>Erysipelatoclostridiaceae</i>	0,17±0,07 ^b	0,10±0,04 ^b	0,37±0,16 ^a	0,54±0,23 ^a	<0,0001
<i>Erysipelotrichaceae</i>	2,99±1,72 ^c	4,56±2,58 ^b	9,94±5,29 ^a	2,02±1,17 ^d	<0,0001
<i>Fusobacteriaceae</i>	32,32±5,49 ^a	23,33±4,49 ^b	14,09±3,04 ^c	23,92±4,57 ^b	<0,0001
<i>Lachnospiraceae</i>	15,18±4,62 ^d	19,77±5,69 ^b	16,91±5,04 ^c	22,89±6,33 ^a	<0,0001
<i>Peptococcaceae</i>	0,31±0,09	0,30±0,09	0,37±0,11	0,32±0,09	0,3061
<i>Peptostreptococcaceae</i>	1,57±0,35 ^c	1,95±0,43 ^a	1,89±0,42 ^{ab}	1,58±0,35 ^{bc}	0,0003
<i>Prevotellaceae</i>	7,74±3,04 ^a	4,37±1,78 ^b	7,85±3,08 ^a	7,99±3,13 ^a	<0,0001
<i>Ruminococcaceae</i>	5,20±1,11 ^c	5,98±1,27 ^b	9,66±1,97 ^a	6,44±1,36 ^b	<0,0001
<i>Selenomonadaceae</i>	0,41±0,20 ^c	0,64±0,32 ^b	1,49±0,73 ^a	0,60±0,30 ^b	<0,0001
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,45±0,14 ^b	0,86±0,26 ^a	0,39±0,12 ^b	0,59±0,18 ^{ab}	<0,0001
<i>Sutterellaceae</i>	1,47±0,96 ^a	0,86±0,57 ^b	0,82±0,53 ^b	0,86±0,57 ^b	<0,0001
<i>Tannerellaceae</i>	0,16±0,03 ^a	0,07±0,00 ^b	0,06±0,00 ^c	0,09±0,00 ^a	0,0438

Fonte: Marchi (2023)

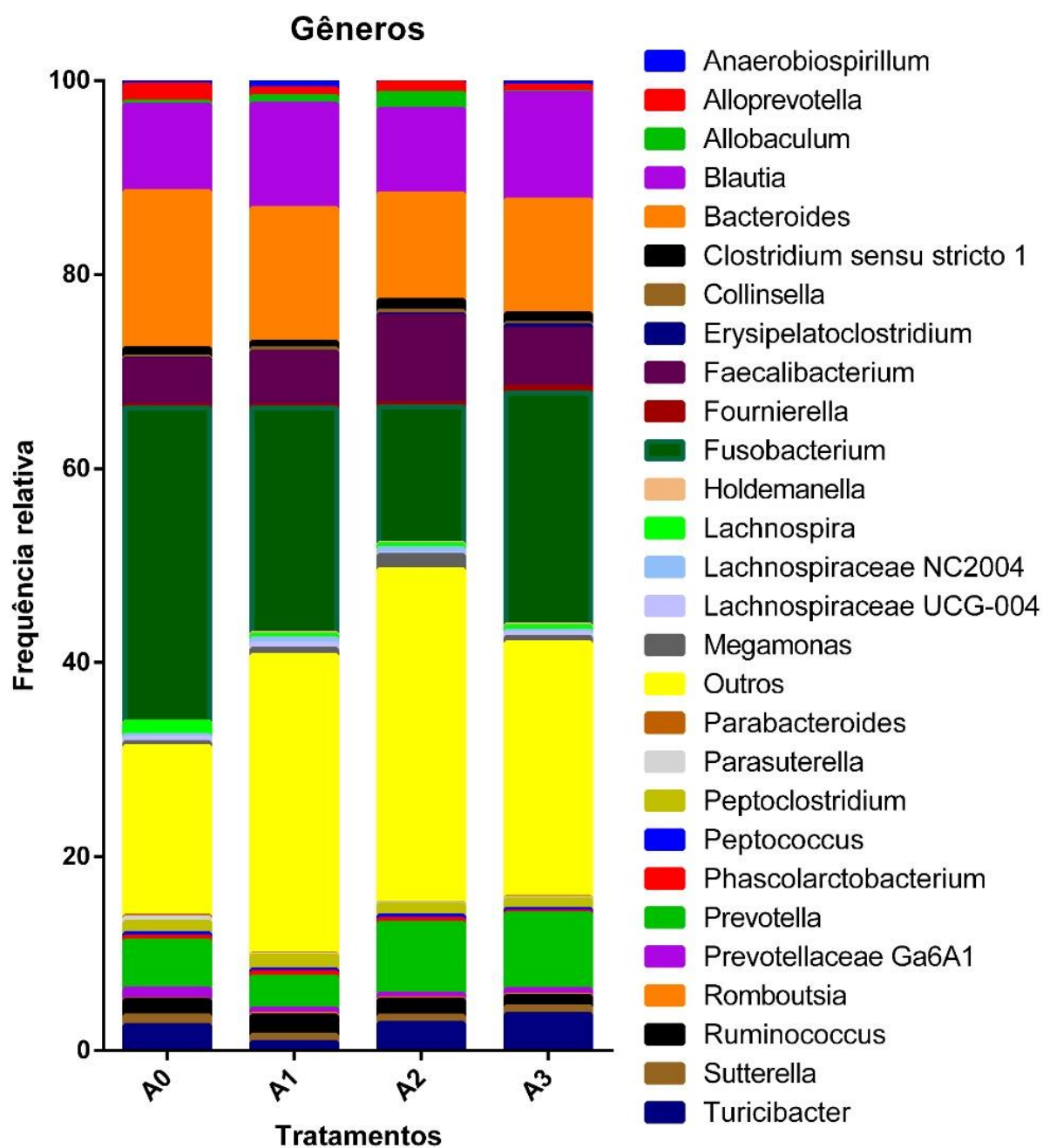
Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey-Kramer ajustado pelo Proc Mixed

A classificação taxonômica mais baixa obtida por meio do sequenciamento foi o gênero das bactérias presentes nas amostras de fezes. Do total de 82 gêneros caracterizados, 54 foram excluídos devido à baixa representatividade e os 28 restantes foram analisados (Figura 8). Dos gêneros avaliados, foram encontradas variações significativas em 25 abundâncias relativas médias (Tabela 8). De forma geral, os gêneros cujas abundâncias relativas foram moduladas positivamente por ao menos um dos tratamentos contendo β -glucanos foram: *Anaerobiospirillum* ($p < 0,0001$), *Blautia* ($p < 0,0001$), *Collinsella* ($p = 0,0111$), *Erysipelatoclostridium* ($p = 0,0008$), *Faecalibacterium* ($p < 0,0001$), *Lachnospiraceae NC2004* ($p < 0,0001$) e *Megamonas* ($p < 0,0001$). Observou-se como gêneros modulados de forma negativa após o consumo de β -glucanos: *Alloprevotella* ($p < 0,0001$), *Bacteroides* ($p < 0,0001$), *Fusobacterium* ($p < 0,0001$), *Lachnospira* ($p = 0,0002$), *Lachnospiraceae UCG-0004* ($p < 0,0001$), *Parabacteroides* ($p = 0,0191$), *Parasuterella* ($p = 0,0002$),

Phascolarctobacterium ($p < 0,0001$), *Prevotellaceae Ga6A1* ($p < 0,0001$) e *Suterella* ($p = 0,0002$). Os gêneros *Allobaculum* ($p < 0,0001$), *Prevotella* ($p < 0,0001$), *Turicibacter* ($p < 0,0001$) e *Ruminococcus* ($p < 0,0001$) apresentaram tanto modulações positivas e negativas em suas abundâncias relativas, quando comparadas com o grupo controle. Ademais, o gênero *Clostridium sensu stricto 1* diferiu apenas entre o tratamento A2 ($1,09 \pm 0,61\%$) e A1 ($0,71 \pm 0,40\%$; $p = 0,0012$). De forma semelhante, *Fournierella* apresentou diferença em sua modulação apenas entre tratamentos com inclusão de β -glucanos. Neste caso, o tratamento A3 ($0,55 \pm 0,14\%$) diferiu apenas quando comparado com o tratamento A1 ($0,24 \pm 0,06\%$; $p = 0,0075$). As bactérias do gênero *Peptoclostridium* apresentaram maior abundância relativa no grupo A1 e foram moduladas negativamente após o consumo de A2 e A3 ($p < 0,0001$). Por fim, não foi observada diferença nas abundâncias relativas de *Holdemanella* ($p = 0,2969$), *Peptococcus* ($p = 0,3061$) e *Romboutsia* ($p = 0,2994$) após o consumo dos quatro tratamentos experimentais.

Figura 8. Distribuição dos gêneros bacterianos observados nos grupos experimentais



Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

Tabela 8. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão das abundâncias relativas dos gêneros observados nos grupos experimentais

Gêneros (%)	Tratamentos				p
	A0	A1	A2	A3	
<i>Allobaculum</i>	0,32±1,76 ^c	0,73±4,03 ^b	1,65±9,03 ^a	0,01±0,03 ^d	<0,0001
<i>Alloprevotella</i>	1,78±0,48 ^a	0,84±0,23 ^c	1,09±0,30 ^b	0,69±0,19 ^c	<0,0001
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,44±0,14 ^b	0,83±0,26 ^a	0,39±0,12 ^b	0,58±0,18 ^{ab}	0,0002
<i>Bacteroides</i>	16,17±3,53 ^a	13,77±3,09 ^b	10,99±2,55 ^c	11,76±2,70 ^c	<0,0001
<i>Blautia</i>	8,91±2,49 ^b	10,78±2,96 ^a	8,71±2,44 ^b	11,03±3,02 ^a	<0,0001
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	0,88±0,50 ^{ab}	0,71±0,40 ^b	1,09±0,61 ^a	0,96±0,54 ^{ab}	0,0012
<i>Collinsella</i>	0,20±0,10 ^b	0,35±0,17 ^a	0,37±0,18 ^a	0,22±0,11 ^b	0,0111
<i>Erysipelatoclostridium</i>	0,06±0,02 ^b	0,06±0,03 ^b	0,15±0,06 ^{ab}	0,36±0,11 ^a	0,0008
<i>Faecalibacterium</i>	4,76±1,06 ^c	5,48±1,21 ^b	9,01±1,91 ^a	6,03±1,32 ^b	<0,0001
<i>Fournierella</i>	0,26±0,06 ^{ab}	0,24±0,06 ^b	0,33±0,08 ^{ab}	0,55±0,14 ^a	0,0075
<i>Fusobacterium</i>	32,33±5,46 ^a	23,18±4,45 ^b	14,09±3,03 ^c	23,94±4,55 ^b	<0,0001
<i>Holdemanella</i>	0,08±0,03	0,17±0,06	0,14±0,04	0,17±0,06	0,2969
<i>Lachnospira</i>	1,30±0,56 ^a	0,41±0,18 ^b	0,42±0,18 ^b	0,44±0,19 ^b	0,0002
<i>Lachnospiraceae NC2004</i>	0,32±0,11 ^b	0,52±0,19 ^a	0,51±0,18 ^a	0,22±0,08 ^b	<0,0001
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	0,44±0,09 ^a	0,55±0,12 ^a	0,16±0,04 ^b	0,43±0,09 ^a	<0,0001
<i>Megamonas</i>	0,41±0,20 ^c	0,64±0,32 ^b	1,48±0,72 ^a	0,60±0,30 ^b	<0,0001
<i>Parabacteroides</i>	0,16±0,00 ^a	0,07±0,00 ^{bc}	0,07±0,00 ^c	0,09±0,00 ^b	0,0191
<i>Parasuterella</i>	0,49±0,14 ^a	0,12±0,04 ^b	0,15±0,05 ^b	0,12±0,04 ^b	0,0002
<i>Peptoclostridium</i>	1,15±0,30 ^{ab}	1,41±0,37 ^a	1,13±0,30 ^b	0,98±0,26 ^b	<0,0001
<i>Peptococcus</i>	0,31±0,09	0,30±0,09	0,37±0,11	0,32±0,09	0,3061
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,46±0,09 ^a	0,42±0,09 ^a	0,38±0,08 ^a	0,16±0,04 ^b	<0,0001
<i>Prevotella</i>	4,94±2,12 ^b	3,34±1,46 ^c	7,32±3,06 ^a	7,81±3,25 ^a	<0,0001
<i>Prevotellaceae Ga6A1</i>	1,11±0,37 ^a	0,52±0,18 ^b	0,47±0,16 ^b	0,58±0,20 ^b	<0,0001
<i>Romboutsia</i>	0,06±0,03	0,18±0,10	0,12±0,05	0,10±0,04	0,2994
<i>Sutterella</i>	1,04±0,70 ^a	0,75±0,51 ^b	0,73±0,50 ^b	0,77±0,52 ^b	0,0002
<i>Turicibacter</i>	2,56±0,83 ^b	0,83±0,28 ^c	2,82±0,91 ^b	3,74±1,20 ^a	<0,0001
<i>Ruminococcus</i>	1,58±0,46 ^b	2,00±0,58 ^a	1,67±0,49 ^{ab}	1,10±0,32 ^c	<0,0001
<i>Sem cultura</i>	1,25±0,46 ^c	1,45±0,53 ^c	1,97±0,71 ^b	2,44±0,87 ^a	<0,0001

Fonte: Marchi (2023)

Legenda: A0 = alimento controle, sem adição de β -glucanos; A1 = alimento com adição de 0,07% de β -glucanos; A2 = alimento com adição de 0,14% de β -glucanos; A3 = alimento com adição de 0,28% de β -glucanos

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey-Kramer ajustado pelo Proc Mixed

7. DISCUSSÃO

A suplementação de β -glucanos na alimentação dos cães é bastante disseminada na indústria *pet*, reflexo de uma série de evidências científicas que corroboram os benefícios desta fibra (VETVICKA; OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA, VETVICKA; ZANUZZO, 2019; SANTOS et al., 2022). Contudo, este é o primeiro estudo que buscou avaliar os efeitos de teores crescentes de inclusão na alimentação de cães adultos saudáveis sobre variáveis digestivas, imunológicas e microbiota. Desta forma, como primeira contribuição, pode-se afirmar que a inclusão de β -glucanos no alimento seco extrusado para cães mostrou-se segura, uma vez que não foram observadas alterações clínicas ou impactos na qualidade das fezes dos animais durante a execução do experimento.

Alguns estudos que propuseram avaliar a influência da suplementação de β -glucanos relataram resultados distintos em relação à digestibilidade dos nutrientes, os quais inferem aumentos, reduções ou inalterações (FERREIRA et al., 2018; LIN et al., 2019; THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Tais diferenças são devidas, principalmente, às fontes e inclusões/doses utilizadas por cada ensaio. Em estudo realizado por Theodoro et al. (2019), foi observada redução no CDA de EE em cães suplementados com 0,3% de PCL enriquecida com MOS solúvel. No entanto, cães suplementados apenas com 0,3% de PCL convencional não apresentaram diferenças nos CDAs dos nutrientes. Ambas as formulações dos prebióticos continham teor de 25% de β -glucanos e, portanto, o alto potencial de solubilidade do MOS utilizado foi responsável por este achado. De forma semelhante ao estudo de Theodoro et al. (2019), Santos et al. (2022) encontraram redução dos CDAs de EE, PB e MM após a suplementação de 0,3 e 0,6% de cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, cuja composição apresentava 25% de FB (β -glucanos e MOS).

Com distinta fonte e maior teor de inclusão, Ferreira et al. (2018) apontaram menores CDAs da MS, MO, EE e MM após consumo de alimento experimental com teor de 1,0% de β -glucanos extraídos da aveia. Em contraste aos anteriores, o presente estudo objetivou avaliar três teores crescentes de inclusão de β -glucanos e com base nos resultados encontrados, não foi observado efeito na redução do aproveitamento dos nutrientes da dieta. Este resultado está de acordo com os encontrados nos estudos de Lin et al. (2019) e Rentas et al. (2020), os quais não

relataram diferenças nos CDAs dos nutrientes em cães suplementados com prebióticos, cujas composições possuíam fontes de β -glucanos.

Apesar de não detectado nenhum resultado negativo, observou-se aumento no CDA da PB após o consumo das dietas A2 e A3, ou seja, com inclusões iguais ou superiores a 0,14%. Ao que tange os conhecimentos adquiridos para a escrita desta dissertação, este aparenta ser um resultado inédito e contrasta com estudos anteriores (ZENTEK; MARQUAT; PIETRZAK, 2002; PROPST et al., 2003; MIDDELBOLS; FASTINGER; FAHEY, 2007; FABER et al., 2011). Todavia, deve ser interpretado com cautela, uma vez que os alimentos A2 e A3 apresentaram maior teor de PB.

Sabe-se que os prebióticos, ao estimularem a proliferação de bactérias no cólon, podem promover aumento na concentração de nitrogênio fecal e, a posteriori, subestimar o CDA de PB (FLICKINGER et al., 2000; HESTA et al., 2003). Em estudo de Pinna et al. (2018), cães que receberam dieta suplementada com FOS (0,15%) e baixo teor de proteína (24,1%) apresentaram maiores CDAs da PB quando comparados aos animais alimentados com dieta suplementada com FOS (0,15%) e alto teor de proteína (31,2%). Neste caso, especula-se que a alta concentração de proteínas não digeridas, em sinergia com o efeito prebiótico dos FOS, favoreceu em maior grau o metabolismo proteolítico no intestino grosso e, por consequência, aumento do nitrogênio fecal.

Desta forma, o aumento no CDA da PB em cães alimentados com as duas dietas com maior teor de β -glucanos encontrado no presente estudo é inesperado. Uma das hipóteses pode estar relacionada com a diferença no teor de PB entre as composições químicas dos alimentos A2 (27,81%) e A3 (28,24%), comparados aos alimentos A0 (25,25%) e A1 (25,07%). É possível que durante o processo de extrusão dos alimentos A2 e A3, ingredientes fontes de proteína tenham sido inclusos em maior concentração, fator potencial para resultar em aumento no CDA de PB dos cães. Ademais, sabe-se que determinados gêneros das famílias *Erysipelotrichaceae* e *Clostridiaceae* e o gênero *Peptococcus* estão envolvidos no metabolismo proteolítico intestinal (BERMINGHAM et al., 2017; HUGENHOLTZ et al., 2018; EPHRAIM; COCHRANE; JEWELL, 2020). Desta forma, reduções na abundância relativa destas bactérias poderiam promover uma estimativa mais aproximada da digestibilidade proteica destas dietas.

As bactérias envolvidas no metabolismo proteolítico intestinal são responsáveis por desaminar proteínas e aminoácidos em amônia, principal fonte de nitrogênio do microbioma (JACKSON, 1995). De forma geral, em situações nas quais as fontes energéticas provenientes dos carboidratos são escassas ou há abundância na passagem de proteínas não digeridas, tal metabolismo é estimulado e, por conseguinte, há aumento na concentração de amônia intestinal (CUMMINGS et al., 1979; RUSSEL; ONODERA; HINO, 1991; NOGUEIRA et al., 2019). A amônia, em conjunto com outros metabólitos da fermentação proteica denominados fenóis, indóis e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), são considerados compostos putrefativos e conferem mal odor às fezes (MINER; HAZEN, 1969; O'NEILL; PHILLIPS, 1992; NERY et al., 2012). A alta concentração de amônia intestinal é capaz de causar danos a mucosa e reduzir a altura dos vilos intestinais, cujo impacto é a redução da capacidade absorptiva do tecido (WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001; BLACHIER et al., 2007) e, ademais, alterar o ciclo de renovação celular e pode contribuir para a carcinogênese colorretal (VISEK, 1978; THORNTON, 1981).

Os resultados apresentados nesta dissertação sugerem que a intensidade da metabolização de proteína e aminoácidos em amônia pelas bactérias presentes na microbiota intestinal não se alterou, independente do teor de inclusão de β -glucanos. Este é um achado bastante comum, que corrobora uma série de outros estudos que avaliaram a influência da suplementação de prebióticos na concentração de amônia intestinal em cães saudáveis (SWANSON et al., 2002a; FLICKINGER et al., 2003; APANAVICIUS et al., 2007; THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Apenas dois estudos foram capazes de observar diminuição na concentração de amônia fecal após a suplementação de prebióticos. Zentek, Marquat & Pietrzak (2002) utilizaram MOS em dosagem de 1g/kg de PC e Nogueira et al. (2019), observaram tal achado após inclusão de *blend* prebiótico, sacarina e eugenol em duas diferentes dosagens.

Outro marcador importante da saúde intestinal é a concentração de ácido láctico (SLAVIN, 2013). Trata-se de um metabólito da fermentação de carboidratos, dada por espécies como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com efeitos que beneficiam o intestino ao reduzir o pH luminal e inibir a proliferação de bactérias patogênicas (SWANSON et al., 2002a). No presente estudo, a ausência de efeito positivo quanto às concentrações de lactato intestinal nos animais que consumiram os alimentos teste, pode estar associada ao aumento de espécies bacterianas que utilizam esse ácido

em seu metabolismo (MACFARLANE; GIBSON; MACFARLANE, 1994; MOENS et al., 2019). A concentração de ácido láctico fecal foi determinada em estudos anteriores, cujos resultados corroboram a ausência de diferença para esta variável (SWANSON et al., 2002a; PAWAR et al., 2017; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Por outro lado, Theodoro et al. (2019) observaram redução, aproximada em 65%, do ácido láctico fecal após consumo de PCL de alta solubilidade. No entanto, uma vez que o ácido láctico é substrato para a produção dos ácidos graxos de cadeia curta (LOUIS et al., 2007), o achado desses autores foi correlacionado com aumento de 25% na concentração de butirato.

No presente estudo, não foi observada alteração na concentração de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada e totais após a inclusão de β -glucanos nas dietas. Este achado pode ser justificado devido à rápida absorção destes compostos pelos colonócitos, o que reduz a concentração fecal e subestima a detecção e comparação estatística (SWANSON et al., 2002a) e corrobora os resultados de outros estudos da área (ZENTEK et al., 2002; PAWAR et al., 2017; LIN et al., 2019; RENTAS et al., 2020). Por outro lado, dois autores já relataram aumento na concentração de pelo menos um ácido graxo de cadeia curta após a ingestão de prebiótico fonte de β -glucanos. É o caso do estudo de Theodoro et al. (2019), o qual demonstrou aumento na concentração de butirato e, o de Santos et al. (2022), no qual a inclusão de dois teores distintos de cultura desidratada de *Saccharomyces cerevisiae* resultou em aumento na concentração de propionato fecal. O aumento na produção e concentração de ácidos graxos de cadeia curta é benéfico para a saúde do intestino, uma vez que participam do metabolismo energético dos colonócitos e promovem redução do pH (WALKER; DUFFY, 1998).

A estabilidade das concentrações dos produtos fermentativos avaliados no presente ensaio respalda a ausência de diferença quanto ao pH fecal dos cães, ao longo da execução do experimento. Os metabólitos dos processos de fermentação de diversos nutrientes podem resultar na diminuição ou aumento do pH do lúmen intestinal (CAMPBELL; FAHEY; WOLF, 1997; FABER et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2019). Como não foram observadas diferenças nas concentrações de amônia e ácido láctico, espera-se que a variável pH também não se altere. O baixo pH luminal é uma condição benéfica para a saúde intestinal, pois resulta em menor intensidade de degradação de aminoácidos e redução da formação de compostos tóxicos putrefativos (SLAVIN, 2013).

Os prebióticos podem apresentar impacto significativo na composição do microbioma intestinal, pois são utilizados como substrato para o metabolismo fermentativo das bactérias, o que influencia na população destas (HANDL et al., 2013; DENG; SWANSON, 2015).

Os dados obtidos por meio do sequenciamento metagenômico do microbioma permitem determinar as diferenças entre os grupos experimentais sob a métrica da diversidade dentro de cada amostra, denominada alfa e, da diversidade avaliada simultaneamente entre as amostras, denominada beta (KERS; SACCENTI, 2022). As métricas alfa representam a estrutura da comunidade microbiana, a qual inclui a riqueza, determinada pelo número de grupos taxonômicos e, uniformidade, que corresponde à distribuição de abundância dos grupos (WILLIS, 2019). No presente estudo, utilizou-se o índice de diversidade filogenética, proposta por Faith (2006), bastante comum e recorrente em estudos com microbioma.

Já a avaliação filogenética de diversidade β permite observar quão dissimilar o microbioma de um grupo experimental é do outro, ao mensurar mudanças na composição ou estrutura microbiana por meio da abundância, presença ou ausência de sequências gênicas (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; KERS; SACCENTI, 2022). A análise utilizada no presente estudo foi baseada em testes de permutação, denominada ANOVA multivariada permutacional (PERMANOVA) (ANDERSON, 2001). Portanto, a diferença observada para esta métrica sugere que o consumo de 0,14% de β -glucanos alterou a microbiota fecal dos cães, quando comparados aos animais do grupo controle.

Sobre as variações populacionais em diferentes categorias taxonômicas, foi possível observar muitas alterações nas abundâncias relativas dos filos, famílias e gêneros entre os tratamentos. O filo Firmicutes apresentou a maior abundância relativa em todos os quatro tratamentos, achado também identificado por outros autores (HANDL et al., 2013; MACEDO et al., 2022; SANTOS et al., 2022). Ademais, a maior modulação na média estimada das abundâncias relativas foi observada neste filo (> 24%), após o consumo do tratamento A2. De forma geral, o filo Firmicutes é considerado benéfico para o intestino, apesar de ser muito heterogêneo e compreender diversos grupos filogenéticos (SUCHODOLSKI, 2011b; MUKHOPADHYA et al., 2012). Este filo compreende bactérias gram-positivas que são predominantemente dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus* (SEONG et al., 2018). Apesar da usual associação de que bactérias

do gênero *Clostridium* são patogênicas, essas bactérias desempenham funções benéficas complexas no intestino (RIJSSEL; HANSEN, 1989; KELDER et al., 2014). Por exemplo, bactérias da família *Clostridiaceae* são capazes de degradar fibras e produzir ácidos graxos de cadeia curta no intestino (HANDL et al., 2013) e foram recentemente correlacionadas com o metabolismo proteico e melhora na qualidade das fezes dos cães (BERMINGHAM et al., 2017). No entanto, a representatividade da família *Clostridiaceae* foi baixa e somente diferiu entre o tratamento A2, o qual apresentou média relativa maior que o tratamento A1.

A família *Erysipelotrichaceae* foi uma das responsáveis por impulsionar o aumento na abundância relativa de Firmicutes, em principal no tratamento A2, no qual apresentou-se com a maior média. Em humanos, a família *Erysipelotrichaceae* já foi correlacionada com diversas doenças, incluindo alterações intestinais inflamatórias e metabólicas (KAAKOUSH, 2015). No entanto, cães saudáveis demonstraram maior abundância dessas bactérias quando comparados com cães que apresentavam diarreia sanguinolenta aguda (SUCHODOLSKI et al., 2012). Ademais, cães com doença inflamatória intestinal apresentaram redução nas populações de *Erysipelotrichaceae* (SUCHODOLSKI et al., 2012b; MINAMOTO et al., 2015). Desta forma, os indícios demonstram que se trata de uma família benéfica para a saúde intestinal canina e que, outrossim, parece ter participação na digestão de carboidratos e fibras e consequente produção de ácidos graxos voláteis (BERMINGHAM et al., 2017).

Em soma, a família *Erysipelotrichaceae* é bastante diversa no microbioma e, compreende gêneros também considerados benéficos para cães, como *Allobaculum* e *Catenibacterium* (VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016). A abundância relativa do primeiro comportou-se em sinergia com o observado em sua família e, portanto, apresentou a maior abundância relativa no grupo A2. Por sua vez, o gênero *Catenibacterium* foi identificado nas amostras com baixa representatividade, portanto foi retirado da análise estatística.

Também responsável por impulsionar o aumento de Firmicutes, a família *Ruminococcaceae* e respectivo gênero *Faecalibacterium* apresentaram aumento na abundância relativa na microbiota fecal dos cães após o consumo do tratamento A2. Os tratamentos A1 e A3 demonstraram médias estimadas intermediárias, sendo maiores que a observada nos cães alimentados com a dieta controle (A0). Tal como as anteriores, ambas são consideradas favoráveis para o ambiente intestinal, uma vez

que são produtoras de butirato (BERMINGHAM et al., 2017). Em soma, a redução na abundância de *Faecalibacterium* foi associada com quadros de diarreia aguda em cães e gatos (GUARD et al., 2015; SUCHODOLSKI et al., 2015).

Em estudo realizado por Suchodolski et al. (2012a), ao comparar a microbiota fecal de cães saudáveis e cães com enteropatias, observou-se que cães com diarreia aguda apresentaram reduções significativas nas bactérias *Erysipelotrichaceae* gênero *Turicibacter*, *Ruminococcaceae* gêneros *Ruminococcus* e *Faecalibacterium* e *Lachnospiraceae* gênero *Blautia* e aumento demarcado para *Sutterella* e *Clostridium perfringens*. No presente estudo, o tratamento A3 apresentou a maior abundância relativa para *Turicibacter*, enquanto o tratamento A2 não diferiu de A0 e o tratamento A1 apresentou a média mais baixa. Para *Blautia*, os tratamentos A1 e A3 apresentaram as maiores médias estimadas de abundância, enquanto A2 não diferiu de A0. Em relação à *Ruminococcus*, as maiores abundâncias médias foram observadas nos tratamentos A1, seguida de A2 e A0 e, A3. Por fim, todos os tratamentos com inclusão de β -glucanos apresentaram redução para o gênero *Sutterella* quando comparados ao grupo controle. Isto implica em benefícios equilibrados entre os tratamentos, quando utilizada a associação bacteriana apresentada por Suchodolski et al. (2012a) como parâmetro discriminatório entre cães saudáveis e doentes.

Entre os tratamentos, o segundo e terceiro maiores filos foram distintos por conta de uma redução bastante demarcada na abundância relativa de Fusobacteria no tratamento A2. De forma geral, o filo foi modulado devido às diminuições observadas na abundância de *Fusobacteriaceae* gênero *Fusobacterium*. Em humanos, estes microrganismos foram associados ao desenvolvimento de afecções, como a doença inflamatória intestinal (ALLEN-VERCOE; STRAUSS; CHADEE, 2011; SWIDSINKSI et al., 2011). No entanto, as evidências são controversas em cães saudáveis e doentes. Vazquez-Baeza et al. (2016) sugeriram que os parâmetros de disbiose em cães com doença inflamatória intestinal são divergentes daqueles propostos para humanos. Neste sentido, as bactérias do gênero *Fusobacterium* foram consideradas benéficas para a microbiota intestinal de cães neste e em outros estudos (MINAMOTO et al., 2015; VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016; ALSHAWAQFEH et al., 2017).

Por outro lado, a redução de *Fusobacterium* após o consumo de prebióticos já foi demonstrada por outros estudos, além dos presentes resultados (MIDDELBOS et

al., 2010; LIN et al., 2019; SANTOS et al., 2022). Em estudo de Macedo et al. (2022), cães obesos apresentaram maior abundância relativa de *Fusobacterium* quando comparado com cães magros. Ademais, o emagrecimento dos animais obesos resultou em diminuição da abundância em nível intermediário entre os grupos. Por fim, o gênero foi negativamente correlacionado com a produção e concentração de ácido butírico intestinal (BERMINGHAM et al., 2017). O contraste entre as evidências impossibilita total compreensão sobre as funções biológicas de *Fusobacterium* e, por conseguinte, não permite concluir se as reduções observadas são positivas ou negativas para a microbiota intestinal canina.

Já Bacteroidetes foi o terceiro filo mais abundante na microbiota fecal dos cães que consumiram os tratamentos A0, A1 e A3 e segundo mais abundante após o consumo de A2. Cabe ressaltar que todos os tratamentos com inclusão de β -glucanos apresentaram redução na abundância relativa de Bacteroidetes. Usualmente, estudos anteriores não encontraram diferença na abundância relativa de Bacteroidetes na microbiota fecal de cães suplementados com prebióticos (MIDDELBOSS et al., 2010; PANASEVICH et al., 2014; GARCIA-MAZCORRO et al., 2017; LIN et al., 2019; SANTOS et al., 2022). Em estudo de Panasevich et al. (2014) e Santos et al. (2022), apesar de não observadas diferenças para Bacteroidetes, foram observadas modulações na abundância relativa do gênero *Prevotella* na microbiota fecal de cães suplementados com prebiótico. Nos tratamentos A2 e A3, essa redução foi impulsionada principalmente por conta de diminuições na abundância relativa da família *Bacteroidaceae*, uma vez que a família *Prevotellaceae* não se alterou em relação ao tratamento A0. Já o tratamento A1 apresentou redução na média estimada de abundância para ambas as famílias supracitadas. O gênero *Prevotella* é reconhecidamente envolvido no metabolismo fermentativo de carboidratos, que tem como produto final os ácidos graxos de cadeia curta (SUCHOLSKI, 2011a). Já o gênero *Bacteroides* possui evidências que indicam tanto aumento em abundância relativa em cães com diarreia crônica (JIA et al., 2010), quanto diminuição nesta variável (BELL et al., 2008; CHABAN; LINKS; HILL, 2012), o que dificulta a discussão sobre seus benefícios em cães saudáveis.

Os dois menores filos encontrados foram Actinobacteria e Proteobacteria, achado respaldado por estudos anteriores (MIDDELBOSS et al., 2010; HANDL et al., 2013; MACEDO et al., 2022; SANTOS et al., 2022). Para o primeiro filo, foi observada redução intermediária após consumo do tratamento A1 e menor média de abundância

após consumo do alimento A3. Ademais, o alimento A2 não diferiu do alimento A0. O principal gênero representante do Actinobacteria são os *Bifidobacterium*, os quais foram identificados por meio do sequenciamento, mas retirados da análise estatística por baixa representatividade. Por fim, o filo Proteobacteria foi reduzido após o consumo de β -glucanos, cujas médias de abundância foram intermediárias nos tratamentos A1 e A3 e inferiores no tratamento A2. Este resultado indica melhor papel protetivo dos β -glucanos em dose de 0,14%, pois as principais bactérias patogênicas, como *Escherichia*, *Salmonella* e *Campylobacter*, pertencem ao filo Proteobacteria (STRICKLING et al., 2000; MIDDELBOSS et al., 2007a). Além disso, trata-se de um filo correlacionado com doença inflamatória intestinal em humanos e cães (CHABAN; LINKS; HILL, 2012; MUKHOPADHYA et al., 2012).

Como exposto ao longo desta dissertação, estudos pregressos correlacionaram melhorias no estado imunológico de cães com a suplementação prebiótica de β -glucanos (STUYVEN et al., 2010; DE OLIVEIRA; VETVICKA; ZANUZZO, 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Portanto, por tratar-se de um agente imunomodulador conhecido, era esperado que o mínimo teor de inclusão de β -glucanos demonstrasse efeitos sobre as variáveis imunes investigadas e, por lógica, o maior teor representasse os melhores índices. Neste estudo, o método padrão para determinar os atributos imunológicos dos animais foi a citometria de fluxo, técnica bastante atual e precisa para as análises propostas (LYONS, 2000).

Como marcador indireto para avaliar a condição imunológica do intestino (NORRIS; GERSHWIN, 2003; ZAINI et al., 2011), foi mensurada a concentração de IgA presente nas fezes dos animais. Após a apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4⁺ presentes no trato gastrointestinal, estes são responsáveis por estimular os linfócitos B da lâmina própria para que se diferenciem e passem a produzir IgA (MCKAY; PERDUE, 1993). Esta imunoglobulina desempenha importante papel na saúde e proteção do intestino, pois é capaz de inibir a ligação e, posterior invasão, de vírus e bactérias nos enterócitos (WOOF, 2006). Portanto, proporcionar aumento na concentração de IgA intestinal é benéfico e pode sugerir melhoria do estado imunológico dos cães.

Pioneiros na avaliação dos efeitos da suplementação de distintas fibras prebióticas sobre a concentração de IgA em cães, Swanson et al. (2002a) observaram aumento na concentração de IgA ileal após o consumo de MOS e FOS. No entanto, a concentração de IgA fecal foi similar entre todos os tratamentos e refletiu a

concentração ileal em apenas 15%, o que sugere possível degradação deste anticorpo ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal (SWANSON et al., 2002a). Portanto, no presente estudo, a ausência de diferença na concentração de IgA fecal dos animais pode ser explicada pela condição de higiene e pela falta de desafios imunológicos ao longo da execução do experimento, somadas à possível redução de IgA intestinal por degradação microbiana. Em todo caso, os atuais resultados deste experimento corroboram os encontrados por estudos anteriores, realizados em cães adultos e idosos saudáveis suplementados com prebióticos (PEIXOTO et al., 2018; THEODORO et al., 2019).

A eficiência da imunidade inata dos animais pode ser aferida por meio de sua capacidade fagocitária, a qual serve como primeira linha de defesa do organismo contra patógenos (DE OLIVEIRA; VETVICKA; ZANUZZO, 2019). No presente estudo, a atividade e intensidade fagocitária, tal como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) dos linfócitos *natural killer*, neutrófilos e monócitos não diferiram entre os tratamentos. Estudos recentes apontaram melhora no estado imunológico inato de cães adultos saudáveis após suplementação com prebióticos fontes de β -glucanos (THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022).

Rentas et al (2020), demonstraram que a suplementação de 1,0% de GOS e 1,0% de *blend* prebiótico composto por β -glucanos, FOS, GOS, MOS e glucomananos durante 30 dias aumentou o número de células fagocitárias e, ademais, melhorou os índices de atividade fagocitária e *burst* oxidativo de cães adultos saudáveis. Além disso, a suplementação via dietética de outras fontes de β -glucanos, como cultura de *Saccharomyces cerevisiae* desidratada e parede celular de levedura, também pode modular a imunidade inata de cães saudáveis (THEODORO et al., 2019; SANTOS et al., 2022). Apesar da similaridade entre os tratamentos, em relação às variáveis que correspondem a imunidade inata, cães que consumiram a dieta A2 apresentaram melhoria da imunidade adaptativa quando comparados aos cães controle.

A imunidade adaptativa pode ser dividida em dois estágios, que são a resposta imune humoral, caracterizada pela produção de anticorpos pelos linfócitos B e, a resposta imune celular, mediada pelos linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008). Os linfócitos T são compostos por diversos subgrupos, com diferentes funções. As células T CD4⁺, também chamadas de T auxiliares, são capazes de estimular e diferenciar linfócitos B e refletem a otimização do sistema imunológico (ALARCA et al., 2016). Os linfócitos T CD8⁺, conhecidos como citotóxicos, são responsáveis pela

destruição de patógenos e indução de apoptose de células infectadas ou malformadas (HELLWEG et al., 2008; ZENEWICZ; ANTOV; FLAVELL, 2009).

No presente estudo, a quantificação da população relativa destes subgrupos de linfócitos apresentou-se de forma similar entre os tratamentos. No entanto, a relação entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi modulada por meio da ingestão de 0,14% de β -glucanos inclusos na dieta A2. Este índice CD4⁺:CD8⁺ é um importante marcador da eficiência do sistema imunológico (ODIERE et al., 2013; BRUNO et al., 2017). Cães idosos apresentaram declínio imunológico marcado pela redução da população relativa de linfócitos T CD4⁺ e aumento de linfócitos T CD8⁺, o que decresce o índice CD4⁺:CD8⁺ (BLOUNT; PRITCHARD; HEATON, 2005). Ademais, Singh et al. (2010) correlacionaram baixos índices de CD4⁺:CD8⁺ com a ocorrência de demodicose generalizadas em cães. Isto ocorre, pois a população de T CD8⁺ apenas aumenta quando há invasão de patógenos e, deve reduzir após o controle da infecção (HELLWEG et al., 2008). Quando há a ocorrência de aumento constante, o organismo pode ser submetido a reações inflamatórias graves (DAY, 2010). Portanto, o aumento nesta relação entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ sugere que a suplementação de 0,14% de β -glucanos induz incremento na resposta adaptativa de cães adultos saudáveis. Este resultado encontrado no presente estudo corrobora publicações anteriores, as quais demonstraram aumento nos índices de CD4⁺:CD8⁺ após suplementação prebiótica (FIELD et al., 1999; SAMAL et al., 2012; PAWAR et al., 2017).

8. CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente estudo e baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que a inclusão dos teores testados não altera a digestibilidade dos nutrientes da dieta. Ademais, as modulações observadas sobre a imunidade adaptativa, índice de diversidade beta, filos, famílias e gêneros bacterianos benéficos permitem concluir que o tratamento com inclusão de 0,14% de β -glucanos resultou na melhor resposta pelos cães.

REFERÊNCIAS

AAFCO. **Association of American Feed Control Officials**. Washington, DC: Official Publication, 2019.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, ed. 6, 2008.

ABINPET. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação – Mercado Pet Brasil 2022**. Disponível em: <<https://abinpet.org.br/dados-de-mercado/>>. Acesso em: 2 de novembro de 2022.

ADAMS, C. A. Carbohydrates Nutricines: Non-digestible oligosaccharides. In: **Nutricines - Food Components in Health and Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.

ALARCA, L. G. Dietary lutein supplementation on diet digestibility and blood parameters of dog. **Ciência Rural**, v. 46, 2195–2201, 2016.

ALLEN-VERCOE, E.; STRAUSS, J.; CHADEE, K. *Fusobacterium nucleatum*, **Gut Microbes**, v. 2, p. 294-298, 2011.

ALSHAWAQFEH, M. K. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, p. 136, 2017.

ALTUG, N.; YUKSEK, N.; AGAOGLU, Z.T. Immunostimulatory effects of aloe vera and β -glucan on cellular and humoral immune responses following vaccination with polyvalent vaccines in dogs. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine**, v. 16, p. 405-412, 2010.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, p. 32–46, 2001.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists – Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1995.

APANAVICIUS, C. J. et al. Fructan supplementation and infection affect food intake, fever, and epithelial sloughing from *Salmonella* challenge in weanling puppies. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1923-1930, 2007.

BAGNI, M. et al. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 18, p. 311– 325, 2005.

BARCO, P. C. et al. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, p. 9-25, 2018.

BARRY, K. A. et al. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3244-3252, 2009.

BARRY, K. A. et al. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 2978-2987, 2010.

BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2692–2703, 2007.

BEER, M. U. et al. Effect of cooking and storage on the amount and molecular weight of (1-3)(1-4)-b-D- glucan extracted from oat products by an in vitro digestion system. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 705–709, 1997.

BELL, J. A. et al. Ecological Characterization of the Colonic Microbiota of Normal and Diarrheic Dogs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2008, p. 1–17, 2008.

BERMINGHAM, E. N. et al. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. **PeerJ**, v. 5, p. e3019, 2017.

BEYNEN, A. C.; LEGERSTEE, E. Influence of dietary beta-1,3/1,6-glucans on clinical signs of canine osteoarthritis in a double-blind, placebo-controlled trial. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, p. 90–94, 2010.

BHANIA, S. K. et al. Water-insoluble glucans from the edible fungus *Ramaria botrytis*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 3, p. 52–58, 2014.

BHARTI R.; GRIMM, D. G. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, p. 178, 2021.

BLACHIER, F. et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **Amino Acids**, v. 33, p. 547–562, 2007.

BLOUNT, D. G. et al. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 399-407, 2005.

BONTEMPO, V. Nutrition and health of dogs and cats: evolution of petfood. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 45–50, 2005.

BROWN, G. D.; GORDON, S. A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, p. 36, 2001.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.

BROWN, G.D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 1119-1124, 2003.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 471–479, 2005.

BRUNO, G. et al. The Revival of an “Old” Marker: CD4/CD8 Ratio. **AIDS reviews**, v. 19, p. 81–88, 2017.

BUCHANAN, R. L. et al. Pet food safety: a shared concern. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S78-S84, 2011.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 1, p. 130–136, 1997.

CHABAN, B.; LINKS, M. G.; HILL, J. E. A Molecular Enrichment Strategy Based on cpn60 for Detection of Epsilon-Proteobacteria in the Dog Fecal Microbiome. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 348–357, 2012.

CUMMINGS, J. H. et al. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 2094–2101, 1979.

da SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n.5, p. 983-990. 2003.

DAOU, C.; ZHANG, H. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 355-365, 2012.

DAY, M. J. Ageing, Immunosenescence and Inflammageing in the Dog and Cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, p. S60–S69, 2010.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Future aspects and perceptions of companion animal nutrition and sustainability. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 823–834, 2015.

DE BRUYN, A. et al. Isolation and identification of O-beta-D-fructofuranosyl-(2,1)-D-fructose, a product of the enzymatic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. **Carbohydrate Research**. v. 235, p. 303-308, 1992.

DE GODOY, M. R.; KERR, K. R.; FAHEY, G.C. Alternative dietary fiber sources in companion animal nutrition. **Nutrients**, v. 5, p. 3099–3117, 2013.

DE OLIVEIRA, C. A. F.; VETVICKA, V.; ZANUZZO, F. S. β -Glucan successfully stimulated the immune system in different jawed vertebrate species. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 62, p. 1–6, 2019.

DI CERBO, A. et al. Functional foods in pet nutrition: Focus on dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 161–166, 2017.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, p. 1635-1638, 2005.

EPHRAIM, E.; COCHRANE, C.-Y.; JEWELL, D. E. Varying Protein Levels Influence Metabolomics and the Gut Microbiome in Healthy Adult Dogs. **Toxins**, v. 12, p. 517, 2020.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1768–1771, 1961.

FABER, T. A. et al. Galactoglucomannan oligosaccharide supplementation affects nutrient digestibility, fermentation end-product production, and large bowel microbiota of the dog. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 103-112, 2011.

FAITH, D. P. The role of the phylogenetic diversity measure, PD, in bioinformatics: getting the definition right. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 2, p. 277–283, 2006.

FEDIAF. **The European Pet Food Industry Federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.** Bruxelles, BE: The European Pet Food Industry Federation, 2020.

FERREIRA, C. S. et al. Metabolic variables of obese dogs with insulin resistance supplemented with yeast beta-glucan. **BMC Veterinary Research**, v. 18, p. 14, 2022.

FERREIRA, L. G. et al. Oat beta-glucan as a dietary supplement for dogs. **PLoS ONE**, v. 13, p. e0201133, 2018.

FIELD, C. J. et al. The fermentable fiber content of the diet alters the function and composition of canine gut associated lymphoid tissue, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 325–341, 1999.

FIGUEIREDO, T. C. **Características físico-química e microbiológica e aminos bioativas em ovos de consumo**, 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado). Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/FRPO-7KXH2B>>. Acesso em: 2 de novembro de 2022.

FLEET G. H. Cell walls. In: ROSE A. H.; HARRISON J.D. **The yeasts**. London: Academic Press, 1991. cap. 1, v. 4, p. 199–277.

FLICKINGER, E. A. et al. Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 130, 1267–1273, 2000.

FLICKINGER, E. A. et al. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 81, 2008-2018, 2003.

FRANCK, A.; BOSSCHER, D. Inulin. In: CHO, S. S.; SAMUEL, P. **Fiber ingredients: food applications and health benefits**. USA: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2009. cap 4, p. 41–60.

FRIEDMAN, M. Mushroom polysaccharides: Chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. **Foods**, v. 5, p. 80, 2016.

GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing. **PeerJ**, v. 5, p. e3184, 2017.

GERMAN, A. J.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Analysis of leukocyte subsets in the canine intestine. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 129–145, 1999.

GHOSH, S.; MEHLA, R. K. Influence of dietary supplementation of prebiotics (mannanoligosaccharide) on the performance of crossbred calves. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 617–622, 2012.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401–1412, 1995.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 491–502, 2017.

GUARD, B. C. et al. Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. **PLoS ONE**. v. 10, p. e0127259, 2015.

GRAND, E. et al. Effects of short-chain fructooligosaccharides on growth performance of preruminant veal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1094–1101, 2013.

GREETHAM, H. L. et al. Bacteriology of the labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 640–646, 2002.

GRIESHOP, C. M. et al. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. Arch. **Animal Nutrition**. V. 58, p.483–493. 2004.

GRZEŚKOWIAK, Ł. et al. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v. 34, p. 14–23, 2015.

HALADOVÁ, E. et al. Immunomodulatory effect of glucan on specific and nonspecific immunity after vaccination in puppies. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 59, p. 1, 2011.

HAN, B. et al. Structure-Functional Activity Relationship of β -Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 658, 2020.

HANDL, S. et al. Faecal microbiota in lean and obese dogs. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 84, p. 332–343, 2013.

HELLWEG, P. et al. Effects of bovine lactoferrin on the immune system and the intestinal microflora of adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 62, p. 152–161, 2008.

HESTA, M. et al. Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 1007–1014, 2003.

HERNOT, D. et al. Prebiotics and symbiotics in companion animal science. In: VERSALOVIC, J.; WILSON, M. **Therapeutic microbiology**: probiotics and related strategies. Washington: ASM Press, 2008. cap. 27, p. 357-370.

HETLAND, G.; SANDVEN, P. Beta-1,3-glucan reduces growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage cultures. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 33:41–45, 2002.

HOOPER, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, p. 881–884, 2001.

HUGENHOLTZ, F. et al. Metatranscriptome analysis of the microbial fermentation of dietary milk proteins in the murine gut. **PLoS ONE**, v. 13, p. e0194066, 2018.

HUNTER, K. W. Jr.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 267-271, 2002.

IEBBA, Valerio et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New Microbiology**, v. 39, p. 1-12, 2016.

INSTANES, C. et al. Mould extracts increase the allergic response to ovalbumin in mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p. 1634–1641, 2004.

IPB. Instituto Pet Brasil – Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil. Disponível em: <<http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>>. Acesso em: 2 de novembro de 2022.

JACKSON, A. A. Salvage of urea-nitrogen and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, p. 535–547, 1995.

JAYACHANDRAN, M. et al. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 61, p. 101-110, 2018.

JIA, J. et al. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhoea. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, p. 304–312, 2010.

JORGENSEN, J. B.; ROBERTSEN, B. Yeast beta-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 43–57, 1995.

JUGAN, M. C. et al. Use of probiotics in small animal veterinary medicine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 250, p. 519–528, 2017.

KAAKOUSH, N.O. Insights into the role of Erysipelotrichaceae in the human host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 84, 2015.

KAMADA, N. et al. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nature Immunology**, v. 14, p. 685–690, 2013.

KANAKUPT, K. et al. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1376–1384, 2011.

KARA, C. et al. Effects of supplemental mannanoligosaccharides on growth performance, faecal characteristics and health in dairy calves. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, p. 1599–1605, 2015.

KAUR, R. et al. Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. **Fibers**, v. 8, p. 1, 2020.

KELDER, T. Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. **Nutrition & Diabetes**, v. 4, p. 122–127, 2014.

KERS, J. G.; SACCENTI, E. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 796025, 2022.

KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 496-500, 2006.

KIM, H. S. et al. Stimulatory Effect of β -glucans on Immune Cells. **Immune Network**, v. 11. p. 191-195, 2011.

KNIGHT, R. et al. The Microbiome and Human Biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 18, p. 65–86, 2017.

KRAKOWSKI, L. et al. The effect of nonspecific immunostimulation of pregnant mares with 1,3/1,6 glucan and levamisole on the immunoglobulin levels in colostrum, selected indices of nonspecific cellular and humoral immunity in foals in neonatal and postnatal period. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 1–11, 1999.

KUDRENKO, B.; SNAPE, N.; BARNES, A. C. Linear and branched $\beta(1-3)$ d-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: Implications for dietary immunostimulation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 443–450, 2009.

LAFLAMME, D. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. **Canine Practice**, v. 22, p. 10–15, 1997.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. **Journal of Cereal Science**, v. 46, p. 101–118, 2007.

LI, J. et al. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2374–2381, 2006.

LIN, C.-Y. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, p. 1586–1599, 2019.

LOUIS, P. et al. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p.1197–1208, 2007.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8228–823, 2005.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 147–154, 2000.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: **CONFERÊNCIA APINCO 2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**, 2000. Campinas: FACTA, 2000. p.161-174.

MACKIE, R. I.; WHITE, B. A.; ISAACSON, R. E. **Gastrointestinal Microbiology: Gastrointestinal Microbes and Host Interactions**. 2nd ed. New York: Chapman and Hall, 1997.

MACEDO, H. T. et al. Weight-loss in obese dogs promotes important shifts in fecal microbiota profile to the extent of resembling microbiota of lean dogs. **Animal Microbiome**, v. 4, p. 6, 2022.

MACFARLANE, G. T.; GIBSON; G. R.; MACFARLANE, S. Short chain fatty acid and lactate production by human intestinal bacteria grown in batch and continuous cultures. In: BINDER, H. J.; CUMMINGS, J.; SORGEL, C. **Short Chain Fatty Acids**, London: Kluwer Academic Publishers, 1994, p. 44–60.

MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. C. The structure of a beta-(1 leads to 3)-d-glucan from yeast cell walls. **Biochemical Journal**, v. 135, p. 19–30, 1973.

MANTOVANI, M. S. et al. Beta-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 658, p. 154-161, 2008.

MAZZEI, M. et al. Effect of 1,3-1,6 beta-glucan on natural and experimental deformed wing virus infection in newly emerged honeybees (*Apis mellifera ligustica*). **PLoS ONE**, v. 11, p. e0166297, 2016.

MCKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 38, p. 1377–1387, 1993.

MICHEL, K. E. et al. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy x-ray absorptiometry. **The British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 57-59, 2011.

MIDDELBOS, I. S. et al. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3022–3032, 2007a.

MIDDELBOS, I. S.; FASTINGER, N. D.; FAHEY JR., G. C. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3033-3044, 2007b.

MIDDELBOS, I. S. et al. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PLoS ONE** v. 5, p. e9768, 2010.

MINAMOTO Y. et al., Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 6, p. 33–47, 2015.

MINER, J. R.; HAZEN., T. E. Ammonia and amines: components of swine building odor. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 12, p. 772–774, 1969.

MOENS, F. et al. A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 1–10, 2019.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, 189–200, 2016.

MOSHFEGH, A. J. et al. Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1407-1411, 1999.

MUKHOPADHYA, I. et al. IBD-what role do Proteobacteria play? **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, p. 219–230, 2012.

MURPHY E. A.; DAVIS, J. M.; CARMICHAEL, M. D. Immune modulating effects of betaglucan, **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, p. 656–661, 2010.

MURPHY, E. J. et al. -Glucans. **Encyclopedia**, v. 1, p. 831–847, 2021.

NAUMANN, E. et al. β -Glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 601–605, 2006.

NERY, J. et al. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2570–2580, 2012.

NOGUEIRA, J. P. S. et al. Dietary supplementation of a fiber-prebiotic and saccharin-eugenol blend in extruded diets fed to dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, p. 4519–4531, 2019.

NORRIS, C. R.; GERSHWIN, L. J. Evaluation of systemic and secretory IgA concentrations and immunohistochemical stains for IgA-containing B cells in mucosal tissues of an Irish setter with selective IgA deficiency. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, p. 247–250, 2003.

NRC. **NRC - National Research Council. Nutrient Requirements of Dogs and Cats.** Washington, DC: National Academies Press, 2006.

ODIERE, M. R. et al. Maternal protein deficiency during a gastrointestinal nematode infection alters developmental profile of lymphocyte populations and selected cytokines in neonatal mice. **Journal of Nutrition**, v. 143, p. 100–107, 2013.

OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 233-248, 2010.

O'NEILL, D. H.; PHILLIPS, V. R. A review of the control of odour nuisance from livestock buildings: Part 3. Properties of the odorous substances which have been identified in livestock wastes or in the air around them. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 53, p. 23–50, 1992.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279–289, 2002.

OUZGUN, C. O. U. et al. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 28, p. 1348–1356, 2017.

PANASEVICH, M. R. et al. Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 125-133, 2015.

PARIS, S. et al. b-Glucan as Trained Immunity-Based Adjuvants for Rabies Vaccines in Dogs. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 564497, 2020.

PAWAR, M. M. et al. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 59, p. 11, 2017.

PEIXOTO, M. C. et al. Effect of resistant starch on the intestinal health of old dogs: fermentation products and histological features of the intestinal mucosa. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2018; 102: 111–121.

PETERS, I. R. et al. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 841–848, 2004.

PHARM, A. S. et al. Lipid-modifying effects of nutraceuticals: An evidence-based approach. **Nutrition**, v. 32, p. 1179-1192, 2016.

PINNA, C. et al. Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative end-products, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 14, p. 106–116, 2018.

PROPST, E. L. et al. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 3057-3066, 2003.

PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p. 1121-1151, 1969.

RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, p. 94-103, 2011.

REDFERN, A.; SUCHODOLSKI, J.; JERGENS, A. Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. **Veterinary Record**, v. 181, p. 370, 2017.

RENTAS, M. F. et al. Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. **PLoS ONE**, v. 15, p. 1–13, 2020.

RIJSSEL, M.; HANSEN, T. A. Clostridium thermosaccharolyticum strain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 61, p. 41–46, 1989.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 830-837, 2007.

ROBERFROID, M. B. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **The British Journal of Nutrition**, v. 104, p. S1-63, 2010.

ROCHA, M. A. Biotecnologia na nutrição de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 42-48, 2008.

RUMMEL L. M. et al. A proof of principle study investigating the effects of supplemental concentrated brewer's yeast on markers of gut permeability, inflammation, and fecal metabolites in healthy non-challenged adult sled dogs. **Journal of Animal Science**, v. 100, p. skac281, 2022.

RUSSELL, J. B.; ONODERA, R.; HINO, T. Ruminal protein fermentation: new perspectives on previous contradictions. In: **Seventh International Symposium on Ruminant Physiology**. New York: Academic Press, 1991, p. 681-697.

RYCHLIK, A. et al. The effectiveness of natural and synthetic immunomodulators in the treatment of inflammatory bowel disease in dogs. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 61, p. 297–308, 2013.

SAMAL, L. et al. Jerusalem artichoke as a potential prebiotic: influence on nutrient utilization, hindgut fermentation and immune response of Labrador dogs. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 12, p. 343–352. 2012.

SANTOS, K. M. et al. Saccharomyces cerevisiae dehydrated culture modulates fecal microbiota and improves innate immunity of adult dogs. **Fermentation**, v. 8, p. 2, 2022.

SEONG, C. N. Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. **Journal of Microbiology**, v. 56, p. 1–10, 2018.

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

ŠIMIĆ, G. et al. Distribution of β -glucan, phenolic acids, and proteins as functional phytonutrients of hull-less barley grain. **Foods**, v. 8, p. 680, 2019.

SINGH, S. K. et al. Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with demodicosis. **Parasitology**, v. 137, p. 1921–1924, 2010.

SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. **Nutrients**, v. 5, p. 1417-1435, 2013.

SPIEGEL, J. E. et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v. 48, p. 85-89, 1994.

STRICKLING, J. A. et al. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: Influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, p. 205–219, 2000.

STOKES, C.; WALY, N. Mucosal defense along gastrointestinal tract of cats and dogs. **Veterinary Research**, v. 37, p. 281-293, 2006.

STUYVEN, E. et al. Effect of beta-glucans on an ETEC infection in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 60–66, 2009.

STUYVEN, E. et al. Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan to dogs temporally changes total and antigen-specific IgA and IgM. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17 p. 281–285, 2010.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 41, p. 261–272, 2011a.

SUCHODOLSKI, J. S. Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1520–1530, 2011b.

SUCHODOLSKI, J. S. et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **PLoS ONE**, v. 7, p. e51907, 2012a.

SUCHODOLSKI J. S., et al., 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **PLoS ONE**, v. 7, p. e39333, 2012b.

SUCHODOLSKI, J.S. et al. The fecal microbiome in cats with diarrhea. **PLoS ONE** v. 10, p. e0127378, 2015.

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

SUCHODOLSKI, J. S. Gut Brain Axis and Its Microbiota Regulation in Mammals and Birds. Exotic Animal Neurology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 21, p. 159, 2017.

SVAJCER, K. W. D. Interactions of Medicines with Dietic Supplements. **Hospital Pharmacology - International Multidisciplinary Journal**, v. 4, p. 547-558, 2017.

SWANSON, K. S.; FAHEY, G. C. Jr. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2007, p.19-35.

SWANSON, K. S. et al. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal Nutrition**. V.132, p. 980–989. 2002a.

SWANSON, K. et al. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 56, p. 309-318, 2002b.

SWIDSINSKI, A. et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. **Gut**, v. 60, p. 34–40, 2011.

THEODORO, S. S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, v. 14, p. e0225659, 2019.

THORNTON, J. R. High colonic pH promotes colorectal cancer. **The Lancet**, v. 1, p. 1081–1082, 1981.

TIAN, X. et al. Effects of dietary yeast β -glucans supplementation on growth performance, gut morphology, intestinal *Clostridium perfringens* population and immune response of broiler chickens challenged with necrotic enteritis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 215, p. 144–155, 2016.

TIZARD, I. R.; JONES, S. W. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. **The Veterinary clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 48, p. 307-322, 2018.

TURNBAUGH, P. J. et al. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, p. 804–810, 2007.

VAN LOO, J. et al. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 525-552, 1995.

VAZQUEZ-BAEZA, Y. et al. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. **Nature Microbiology**, v. 1, p. 16177, 2016.

VETVICKA, V.; OLIVEIRA, C. $\beta(1-3)(1-6)$ -D-glucans Modulate Immune Status and Blood Glucose Levels in Dogs. **British Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 4, p. 981–991, 2014.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. An evaluation of the immunological activities of commercially available β -1,3-glucans. **JANA**, v. 10, p. 25-31, 2007.

VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. 1980. Tese (Doutorado). Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1980. Disponível em: <<https://locus.ufv.br//handle/123456789/24369>>. Acesso em: 2 de novembro de 2022.

VISEK, W. J. Diet and cell growth modulation by ammonia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 31, p. S216–S220, 1978.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behavior**, v. 94, p. 276-284, 2008.

WALKER, W. A.; DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9. p. 668–675, 1998.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; PERDOMO, D. M. X. Biological response of rats to resistant starch. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, p. 252-257, 2005.

WALTHAM. **The WALTHAM™ Faeces Scoring System**. [s.l: s.n.]

WHITESIDE, S. A. et al. The microbiome of the urinary tract – a role beyond infection. **Nature Reviews Urology**, v.12, p. 81-90, 2015.

WILLIS, A. D. Rarefaction, alpha diversity, and statistics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2407, 2019.

WILSON S. M. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product-supplemented diet on fecal characteristics, oxidative stress, and blood gene expression of adult dogs undergoing transport stress. **Journal of Animal Science**, skac378, 2022.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition Research Reviews**, v. 14, p. 207–228, 2001.

WILLIAMS, D. L.; MUELLER, A.; EROWDER, W. Glucan based macrophage stimulators. **Clinical Immunotherapeutics**, v. 5, p. 392–399, 1996.

WOOF, J. M.; KERR, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. **Journal of Pathology**, v. 208, p. 270–282, 2006.

WU, Y. S. et al. Beta 1,3/1,6-glucan and vitamin C immunostimulate the non-specific immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 57, p. 269–277, 2016.

YAN, J. K.; WANG, W. Q.; WU, J. Y. Recent advances in *Cordyceps sinensis* polysaccharides: Mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 33–47, 2014.

ZAINE, L. et al. Faecal IgA concentration is influenced by age in dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S183–S186, 2011.

ZENEWICZ, L. A.; ANTOV, A.; FLAVELL, R. A. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, p. 199–207, 2009.

ZENTEK, J.; MARQUAT, B.; PIETRZAK, T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1682–1684, 2002.

ZHANG, H. et al. Structural characterization and rheological properties of -D-glucan from hull-less barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.). **Phytochemistry**, v. 155, p. 155–163, 2018.

ZHOU, L. D. et al. The shiitake mushroom-derived immuno-stimulant lentinan protects against murine malaria blood-stage infection by evoking adaptive immune- responses.

International Immunopharmacology, v. 9, p. 455–462, 2009.