ANDRESSA RODRIGUES AMARAL

Microbiota e produtos de fermentação fecal de cães com doença inflamatória intestinal suplementados com β-glucanos

São Paulo

2020

ANDRESSA RODRIGUES AMARAL

Microbiota e produtos de fermentação fecal de cães com doença inflamatória intestinal suplementados com β-glucanos

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3980
FMVZ

Amaral, Andressa Rodrigues
Microbiota e produtos de fermentação fecal de cães com Doença Inflamatória Intestinal suplementados com β-glucanos / Andressa Rodrigues Amaral. – 2020.
108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto.

1. Enteropatia. 2. Canino. 3. Disbiose. 4. Microbioma. 5. Prebiótico. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MICROBIOTA E PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO FECAL DE CÃES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL SUPLEMENTADOS COM ?-GLUCANOS ", protocolada sob o CEUA nº 1102270218 (ID 005058), sob a responsabilidade de **Márcio Antônio Brunetto** *e equipe; Andressa Rodrigues do Amaral* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/06/2018.

We certify that the proposal "MICROBIOTA AND FERMENTATION PRODUCTS OF DOGS WITH INFLAMMATORY DISEASE SUPPLEMENTED WITH ?-GLUCANS", utilizing 12 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1102270218 (ID 005058), under the responsibility of **Márcio Antônio Brunetto** *and team; Andressa Rodrigues do Amaral* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/20/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2018 a 03/2019 Área: Clínica Médica Veterinária

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 12 anos	N:	12
Linhagem:	diversas raças ou SRD			Peso:	5 a 60 kg		

Local do experimento: Hovet e Clínica All Care

São Paulo, 24 de julho de 2018

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

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

São Paulo, 09 de dezembro de 2020
CEUA N 1102270218

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Márcio Antônio Brunetto
Área: Clínica Médica Veterinária

Título da proposta: "MICROBIOTA E PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO FECAL DE CÃES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL SUPLEMENTADOS COM ?-GLUCANOS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 007262)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 30/novembro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Incluímos mais 6 animais com diagnóstico de DII uma vez que estes se apresentaram em busca de ajuda e incluímos estes em outro grupo experimental que recebeu um blend de MOS + beta-glucano.".

Comentário da CEUA: "Esta CEUA observou que foi anexada na solicitação de emenda a dissertação de mestrado (defendida ou com defesa próxima). As solicitações de alteração do número de animais devem ser apresentadas previamente à execução do projeto. No entanto, trata-se de um animal acometido por uma doença naturalmente, não em uma condição induzida experimentalmente, fazendo parte do atendimento hospitalar. Além disso, os benefícios aos animais são óbvios ao receberem tratamento especializado. Diante disso, não existem óbices éticos para a aprovação, mas contamos com a colaboração dos pesquisadores para que qualquer modificação no projeto deve ser avaliada criteriosamente por esta Comissão antes da sua execução . ".

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AMARAL, Andressa Rodrigues

Título: **Microbiota e produtos de fermentação fecal de cães com doença inflamatória intestinal suplementados com β-glucanos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária 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:_____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Silvio e Josy, ao meu irmão Ricardo e meus avós (em suas memórias) Onilda e Vicente Amaral, que sempre moveram montanhas em prol da minha educação.

AGRADECIMENTOS

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/04574-5, pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos concedida.
- À Biorigin (Açucareira Quatá) pelo financiamento do estudo e pela confiança no nosso grupo de pesquisas.
- À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia que me acolheu para a execução desse projeto e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos que me acolheu durante a graduação.
- Aos meus pais que priorizaram meus estudos, trabalharam e me concederam privilégios para que eu tivesse subsídios para chegar até aqui.
- Ao meu orientador Marcio Antonio Brunetto, meu “papis”, que me guia, orienta, acredita e cuida de mim desde 2012. Por ser uma figura paterna na minha vida acadêmica, uma das pessoas que eu mais confio na minha vida e meu exemplo de profissional. Eu sempre fui por você e você sempre foi por mim! Sou grata todos os dias por ter cruzado o seu caminho!!!
- À Royal Canin do Brasil pelo fornecimento dos alimentos hipoalergênicos.
- À ForVets, representada pelo Sr. Paulo Yassushi Imai pelo auxílio na randomização dos tratamentos e manipulação das cápsulas de tratamento.
- Ao grupo de estudos em nutrição pet da FMVZ – USP (GENP) e meus colegas de pós graduação, muitos dos quais são meus grandes amigos hoje!
- À BPI tecnologia na figura do Sr. Caio Munhoz e sua equipe pela análise da microbiota fecal.
- Aos estagiários do coração que passaram pela minha vida durante essa trajetória e ficaram nele guardados: Matheus Mace, Thais Pereira e Thais Rosa, Pâmela, Ronald e Michele.
- Às minhas incríveis ICs, as quais eu tive a sorte e tranquilidade de delegar diversas tarefas deste mestrado com a consciência plena de que elas fariam tudo certinho e bem feito.
- À equipe administrativa do HOVET, sempre muito gentil e solícita para atender nossas necessidades: Josy, Helena, Isaura, Tereza e Osmar.

- Às veterinárias contratadas do Serviço de clínica médica, Denise, Bruna e Khadine por serem meu exemplo de ética, amor e respeito aos animais, por me ensinarem, por confiarem em mim e permitirem que eu desempenhasse o máximo do meu potencial e, claro, por estarem sempre atentas para me encaminhar os pacientes com DII!
- Ao funcionário Milton por ser sempre solícito a me ajudar nas coletas dos animais quando ficava difícil (rsrsrs).
- Ao funcionário Elias que sempre esteve presente para facilitar a vida de qualquer um de nós e dos nossos pacientes na rotina do hospital.
- Aos residentes maravilhosos pelo auxílio no cuidado dos animais, por lembrar dos pacientes com DII para me encaminhar e pelo aprendizado mútuo, contínuo e ótima convivência.
- À equipe de limpeza do HOVET USP por serem sempre solícitos a nos ajudar e nos atender para deixar o ambiente apto para o desenvolvimento do nosso trabalho.
- Aos meus amigos do coração do uspício Pira e SP: Larissa, Thiago, Rafa, Mari Perini, Mari Rentas, Roberta, Vinícius, Rodrigo, Bru Ruberti, Caio e Dieguito. Eu não sei o que seria da minha sanidade mental sem vocês!! Obrigada pelo cuidado, pelas jantas, pelas conversas fora de hora, pela ajuda, pelo incentivo, pelas dicas fit e incentivos para ir à academia (valeu a tentativa), por me falarem constantemente que eu iria sim conseguir terminar o mestrado. Agradeço por me ensinarem a contornar situações tensas e dramáticas com um pouco de bom-humor e, nesse quesito, em especial à Larissa, amiga que eu peço para ir comigo dar um apoio moral e me ajudar a enfrentar as situações tensas do cotidiano como, por exemplo, para entregar uma solicitação de exame que eu esqueci depois de já ter encaminhado o paciente e eu fiquei com medo de levar bronca sozinha e ainda fala “corre!”... e literalmente sai correndo para ninguém pegar a gente entregando depois.
- Ao meu amigo-irmão Thiago, por ser uma figura fraterna na minha vida desde que o conheço, por ser um grande incentivador e acreditar no meu potencial, por dizer quando o que eu faço está bom ou está ruim. Por ser sempre honesto e crítico na medida certa e mostrar que é possível sim, ensinar com humildade

e compaixão. Atribuo muito do que sei e sou hoje ao fato de que o professor Márcio me colocava (e coloca) para trabalhar com você.

- Ao Caio Duarte por ajudar nos exames cardiológicos pré-anestésicos para endoscopia.
- Ao Leandro Haroutune por me ajudar a tratar/controlar a pele dos DII sem corticoide!!! Me salvou!
- À endoscopista Cláudia Zanatta e sua equipe por realizarem a endoscopia dos animais desse projeto.
- Ao professor Bruno Cogliati pela análise histopatológica das lâminas de biópsia e por ser sempre TÃO gentil!
- Ao professor Júlio Cesar Balieiro pela análise estatística da microbiota, por ficar uma hora inteira comigo no telefone me explicando tudo e por ser uma figura tão cativa durante a minha formação, desde a graduação!
- À Mel pelas outras análises estatísticas e pelas análises laboratoriais de ácido lático no meio da pandemia!!
- Às minhas cachorras Sophie, Lili, Gorda (*in memorian*), Lala (*in memorian*), Jesa (*in memorian*), Shaman (*in memorian*), Bolinha (*in memorian*) por estarem ao meu lado durante todo o processo que me levou a ser veterinária até hoje.
- Aos meus pacientes com DII e seus proprietários: Jully (Erica), Safira (Mari), Bacuri (Eliane), Estrela (Lucia), Woody (Marta), Cléo (Ana Paula), Josie (Elisabete), Penélope (Paula), Zeca (Eliza), Pipoca (Rose), Tank (Karin), Jade (Telma), Brad Pitt (Monica), Luigi (Priscila), Dudo (Barbara), Monalisa (Silvana), Pétala (Rosana) e Lili (Marco).
- Ao laboratório de análises clínicas do HOVET coordenado pela Profa. Marcia Mery Kogika e aos funcionários que tanto me ajudaram e ensinaram: Clara, Cláudia, Creide, Maria Helena e Dinha.
- Aos meus amigos, Cristina, Dorli, Oscar, Poli (canina afilhada), Pierre (canino afilhado), Maressa, Betina, Christine, Mellory, Bárbara garrafa, Bárbara, Bolonha e Adriana. Vocês fizeram tudo possível.
- À Deus, que sempre esteve tão presente na minha vida e sempre me mostrou isso.

A vocês, sou eternamente grata!

"Scientia Vinces"

São Paulo 12-1934

RESUMO

AMARAL, A.R. **Microbiota e produtos de fermentação fecal de cães com doença inflamatória intestinal suplementados com β-glucanos.** 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A doença inflamatória intestinal (DII) é considerada a causa mais comum de doença gastrintestinal em cães e a causa mais importante de vômito e diarreia em cães e gatos. Há consenso na literatura acerca da existência de reação imune aberrante aos microrganismos residentes no trato gastrintestinal no indivíduo geneticamente predisposto, associada à disbiose e consequente alteração na concentração de produtos oriundos da fermentação das bactérias intestinais. Os prebióticos são polissacarídeos não amiláceos resistentes à digestão enzimática de animais monogástricos que chegam ao intestino grosso aptos para servirem de substrato ao crescimento e fermentação de bactérias benéficas, em detrimento das patogênicas. Os efeitos imunomodulatórios desempenhados através desta fermentação seletiva apresentam potencial terapêutico interessante em pacientes com DII, os quais são amplamente discutidos na literatura humana, embora pouco discutidos na literatura veterinária. Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação de β-glucanos na microbiota fecal de cães com DII identificada e quantificada por sequenciamento genético de última geração. Para tal, foram selecionados dezoito cães com DII em fase controlada para compor três grupos experimentais: A – suplementado com 0,1% de β-glucanos, B – suplementado com 0,1% de um *blend* de prebióticos composto por MOS e β-glucanos e C - placebo, de modo que todos os grupos receberam a mesma dieta hidrolisada associada ou não aos prebióticos, durante 60 dias. Foram realizados hemogramas e exames bioquímicos de rotina e específicos, quantificação de lactato fecal e, para fins de acompanhamento dos sinais clínicos, foram aplicados dois escores de severidade de enteropatia canina específicos. As abundâncias observadas para cada filo e gênero foram avaliadas por modelo linear generalizado, considerando distribuição binominal e pelo emprego da função de ligação logit. O modelo incluiu efeitos fixos de grupos (A, B e C), tempos de avaliação (T0 e T60), interação entre estes, além do efeito aleatório de resíduo. Estas análises foram realizadas pelo procedimento PROC GLIMMIX do programa *Statistical Analysis System.* Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos. Ao todo, foram

identificados 10 filos, 17 classes, 48 famílias e 101 gêneros diferentes entre os três grupos experimentais. O filo, classe, família e gênero predominante entre os grupos foram, respectivamente, Firmicutes (24,30% - 99,79%), Clostridia (6,64% – 97,39%), Lachnospiraceae (0,6% - 89,7%) e *Streptococcus* (0,02% - 90,19%). O tratamento com prebióticos modulou a população de diversos táxons em função do tempo, mas principalmente, modulou de forma positiva o filo Firmicutes e, somente o tratamento B controlou o crescimento de *Collinsella.* O tratamento com β-glucano melhorou o *Shannon index,* o que evidencia possível melhora da disbiose. Não foi observada diferença na concentração fecal de ácido lático entre os tratamentos. A suplementação com os prebióticos melhorou o *Canine IBD activity index* (CIBDAI; p= 0,0084). O presente trabalho verificou que a suplementação de 0,1% de β-glucanos na dieta de cães com DII, durante 60 dias, foi capaz de modular de forma positiva os microrganismos do trato gastrointestinal, bem como aumentou sua biodiversidade.

Palavras-chave: Enteropatia. Canino. Disbiose. Microbioma. Prebiótico.

ABSTRACT

AMARAL, ANDRESSA. R. **Microbiota and fecal fermentation products of dogs with inflammatory bowel disease supplemented with beta-glucans**. 2020. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Inflammatory bowel disease (IBD) is the most common cause of gastrointestinal disease in dogs and the most important cause of vomiting and diarrhea in dogs and cats. There is a consensus in literature about the existence of aberrant immune reaction to microorganisms of the gastrointestinal tract in a genetically predisposed individual, associated with dysbiosis and, consequently, alteration in the concentration of fermentation products produced by intestinal bacteria. Prebiotics are non-starch polysaccharides resistant to enzymatic digestion of monogastric animals that reach the large intestine and serve as a substrate for the growth and fermentation of beneficial bacteria to the detriment of the pathogenic. The immunomodulatory effects performed through this selective fermentation have interesting therapeutic potential in patients with IBD, which are widely discussed in the human literature, although poorly discussed in the veterinary literature. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of β-glucan supplementation on the fecal microbiota of dogs with IBD identified and quantified by next generation genetic sequencing. For this, eighteen dogs with controlled IBD were selected to compose three experimental groups: A - supplemented with 0.1% β-glucans, B – 0.1% of a prebiotic *blend* composed by MOS and β-glucans and C - placebo, and all of them received the same hydrolyzed diet for 60 days. In addition, routine blood counts and biochemical tests were performed and, for the purpose of monitoring clinical signs, specific canine enteropathy severity scores were applied. The abundances observed were evaluated by Generalized mixed linear model with binomial data, using logit link function. The model included fixed effects of treatments (A, B or C), time (T0 or T60), and interaction between them, beyond animal as random effect. At total, 10 phyla, 17 classes, 48 families and 101 different genera were identified among the 3 experimental groups. The predominant phylum, class, family and gender among the groups were, respectively, Firmicutes (24.30% - 99.79%), Clostridia (6.64% - 97.39%), Lachnospiraceae (0.6% - 89.7%) and *Streptococcus* (0.02% - 90.19%). The treatment with prebiotics modulated the population of several taxa according to time, but mainly, it positively modulated the

phylum Firmicutes and only treatment B controlled the growth of Collinsella. Only treatment with β-glucan improved the Shannon index and showed improvement in dysbiosis. There was no difference in the fecal concentration of lactic acid between treatments. Supplementation with prebiotics improved the Canine IBD activity index (CIBDAI; $p = 0.0084$). The present study found that 0.1% supplementation of β-glucans in the diet of dogs with IBD was able to positively modulate microorganisms in the gastrointestinal tract after 60 days through the growth of beneficial bacteria and improvement of biodiversity.

Keywords: Enteropathy. Canine. Dysbiosis. Microbioma. Prebiotic

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário das alterações imunopatológicas observadas em cães com DII. Adaptado de JERGENS; SIMPSON (2012b).....23
Tabela 2. Formas moleculares de β-glucanos de diferentes fontes e seus nomes usais. Fonte: Adaptado de Barsanti et al.(2011).....35
Tabela 3. Estado da arte de estudos realizados até o momento com pacientes humanos, animais ou modelos animais com doença inflamatória intestinal que receberam β-glucanos. 38
Tabela 4. Composição nutricional e lista de ingredientes do alimento hipoalergênico utilizado.....47
Tabela 5. Características físico-químicas dos prebióticos. 47
Tabela 6. Descrição dos animais recrutados para o estudo (identificação, raça, sexo, status reprodutivo e diagnóstico).....49
Tabela 7. Médias e erro padrão da média das variáveis peso, ECC, EMM, EF, CIBDAI, CCECAI e concentração de ácido lático fecal. 50
Tabela 8. Médias e erro padrão da média das variáveis bioquímicas, células leucocitárias e contagem de plaquetas dos três grupos experimentais. 52
Tabela 9. Número de sequências e OTUS obtidas pelo sequenciamento Illumina. ..53
Tabela 10. Filos identificados pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e máximos (MÁX) das amostras de fezes dos grupos A, B e C. 54
Tabela 11. Porcentagem média de sequencias dos filos encontrados pelo sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60. 54
Tabela 12. Classes identificadas pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e máximos (MÁX). 56
Tabela 13. Porcentagem média de sequencias das classes encontradas por meio do sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60. 57

Tabela 14. Famílias identificadas pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e valores máximos (MAX). 60
Tabela 15. Porcentagem média de sequências de famílias identificadas pelo sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60. 61
Tabela 16. Gêneros identificados pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e máximos (MÁX). 65
Tabela 17. Porcentagem média de sequências de gêneros identificados pelo sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 66
Tabela 18. Média e erro padrão da média (EP) do índice de alfa-diversidade Shannon dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60. 68
Tabela 19. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 0. 92
Tabela 20. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos no estudo referentes ao tempo 0. 93
Tabela 21. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 0. 94
Tabela 22. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos do estudo referentes ao tempo 0. 95
Tabela 23. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 60. 96

Tabela 24. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos no estudo referentes ao tempo 60. 97
Tabela 25. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 60. 98
Tabela 26. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos no estudo referentes ao tempo 60. 99
Tabela 27. Descrição de peso (em Kg), ECC, EMM, EF, CIBDAI e CCECAI dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo nos tempos 0 e 60. 100
Tabela 28. Descrição de peso (em Kg), ECC, EMM, EF, CIBDAI e CCECAI dos animais do grupo C incluídos no estudo nos tempos 0 e 60. 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes estruturas dos β-glucanos. A) β-(1,3)-D-glucano linear; B) β-(1,3;1,4)-D-glucano linear; C) β-(1,3;1,2)-D-glucano com cadeia lateral ramificada; D) β-(1,4;1,6)-D-glucano com cadeia lateral ramificada; E) β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia lateral ramificada; F) β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia ramificada ramo-a-ramo; G) β-(1,2)-D-glucano com cadeia cíclica e H) β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia cíclica. 34
Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental. 43
Figura 3. Material entregue aos proprietários para a classificação do escore fecal. . 45
Figura 4. Porcentagem de microrganismos dos filos Actinobacteria (a), Bacteroidetes (b), Firmicutes (c), Fusobacteria (d) e Proteobacteria (e) nos tempos experimentais T0 e T60. 56
Figura 5. Porcentagem de microrganismos das classes Actinobacteria (a), Coriobacteriia (b), Bacteroidia (c), Bacilli (d), Clostridia (e), Erysipelotrichi (F), Fusobacteria (g) e Gammaproteobacteria (h) nos tempos experimentais T0 e T60. 59
Figura 6. Porcentagem de microrganismos das famílias Actinomycetaceae (a), Coriobacteriaceae (b), Bacteroidaceae (c), Gammaproteobacteroidaceae (d), Streptococcaceae (e), Clostridiaceae (f), Lachnospiraceae (g), Peptostreptococcaceae (h), Ruminococcaceae (i), Erysipelotrichaceae (j), Fusobacteriaceae (k), Enterobacteriaceae (l) e Pseudomonadaceae (m) nos tempos experimentais T0 e T60. 64
Figura 7. Diversidade alfa - curva de rarefação das unidades operacionais taxonômicas (*observed_otus*) em função do número de ciclos de sequenciamento dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60. 68
Figura 8. Índice de diversidade Shannon em função do número de ciclos de sequenciamento dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 69
Figura 9. Análise tridimensional de componentes principais com os dados absolutos obtidos pelo sequenciamento das amostras dos três grupos experimentais. 69
Figura 10. Composição relativa de filos bacterianos dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 103
Figura 11. Composição relativa de classes bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 104
Figura 12. Composição relativa de ordens bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 105

Figura 13. Composição relativa de famílias bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 106
Figura 14. Composição relativa de gêneros bacterianos dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 107
Figura 15. Composição relativa de espécies bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60. 108

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

2 REVISÃO DE LITERATURA 22

2.1 A doença inflamatória intestinal 22
2.2 Diagnóstico da DII 25
2.3 Tratamento 26
2.4 Microbiota intestinal e sua relação com o hospedeiro saudável e acometido pela DII 27
2.4 Prebióticos e β-glucanos 32

3 MATERIAL E MÉTODOS 40

3.1 ANIMAIS 40
3.2 Tratamentos e delineamento experimental 41
3.3 Hemogramas e dosagens bioquímicas séricas 43
3.4 Avaliação das fezes 44
3.4.1 Determinação da população fecal de bactérias pela tecnologia de sequenciamento Illumina 45
3.4.2 Determinação das concentrações de ácido lático nas fezes 46
3.5 Composição da dieta e β-glucano 47

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 48

4 RESULTADOS 48

4.1 Animais 48
4.2 Avaliação física, escores de severidade de enteropatia e concentração fecal de ácido lático 49
4.3 Índices hematimétricos e análises bioquímicas 50
4.4 Microbiota fecal 53
4.4.1 Análise de filos 54
4.4.2 Análise de classes 56
4.4.3 Análise de famílias 59
4.4.4 Análise de gêneros 65
4.4.5 Índices de diversidade 67

5 DISCUSSÃO 70

6 CONCLUSÕES 77

7 PRÓXIMOS PASSOS 78

REFERÊNCIAS 79

APÊNDICES 91

1. Resultados individuais das análises hematológicas e séricas em T0 92
2. Resultados individuais das análises hematológicas e séricas em T60 96
3. Resultados individuais de variáveis do exame físico, CIBDAI e CCECAI 100

ANEXOS 102

1. INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) é considerada a causa mais comum de doença gastrintestinal crônica em cães e a causa mais importante de vômito e diarreia em cães e gatos (CAVE, 2003, 2013) cuja etiologia multifatorial envolve alterações genéticas que prejudicam o controle da resposta imune, o reconhecimento normal de antígenos bacterianos e alimentares (CASTRO-SÁNCHEZ; MARTÍN-VILLA, 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MATSUOKA; KANAI, 2015).

Portanto, o tratamento para a DII inclui a vertente farmacológica e nutricional onde, no âmbito farmacológico torna-se necessário o uso de terapia imunossupressora e no âmbito nutricional, objetiva-se o fornecimento de dieta hipoalergênica a fim de minimizar os sinais clínicos e auxiliar no controle da doença (CAVE, 2006; DAVENPORT; JERGENS; REMILLARD, 2010).

Diversos autores já reportaram relação íntima entre a disbiose intestinal e a DII, a qual pode favorecer a remissão ou prejudicar o processo inflamatório da mucosa em pacientes doentes (MATSUOKA; KANAI, 2015; ALSHAWAQFEH et al., 2017; BLAKE et al., 2019). Neste sentido, o potencial modulador dos prebióticos na microbiota torna-os uma ótima alternativa coadjuvante ao tratamento de doenças cuja patogenia é influenciada por alterações do microbioma intestinal, como a DII (TOPPING, 1996; OREL; TROP, 2014).

Os β-glucanos são prebióticos extraídos de plantas, bactérias, fungos ou leveduras que apresentaram resultados promissores no controle da inflamação intestinal em humanos, cães e modelos animais de DII (HALLERT et al., 2003; RYCHLIK et al., 2013; HEINSBROEK et al., 2015; SEGARRA et al., 2016; ZYŁA et al., 2019). Entretanto, as limitações relacionadas à ausência de individualização dos tratamentos, padronização de dietas e homogeneidade dos grupos experimentais comprometem a interpretação da sua real eficácia.

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação de 0,1% de prebiótico contendo β-glucano sobre a população microbiana fecal e seus produtos de fermentação em cães com DII controlada através do sequenciamento de última geração associado aos indicadores de severidade de enteropatia crônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Sob a denominação genérica de desordens gastrintestinais, incluem-se as enteropatias infecciosas, neoplásicas, mecânicas, tóxicas e as inflamatórias não infecciosas (VOLKMANN et al., 2017). Em humanos, o termo 'doença inflamatória intestinal' (DII) agrupa a doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU) (SCHWARTZ; HADAR, 2014) que distinguem-se pelas estruturas do trato gastrintestinal (TGI) acometidas e pelo tipo de reação imunológica que é estimulada. Na DC, segmentos intercalados do trato gastrintestinal são acometidos e pode haver envolvimento tanto de todo o intestino quanto do estômago, com recrutamento de linfócitos auxiliadores do tipo Th1. A CU por sua vez, acomete somente a porção final do intestino grosso (cólon) e há recrutamento específico de linfócitos auxiliadores do tipo Th2 (HEILMANN; SUCHODOLSKI, 2015).

Em cães, este termo é empregado para agrupar doenças crônicas com manifestações clínicas do intestino que, após exclusão de diagnósticos diferenciais (verminose, insuficiência pancreática exócrina, hipoadrenocorticismo, infecções bacterianas, fúngicas e hipertireoidismo), apresentam em comum a inflamação da mucosa (DAVENPORT; JERGENS; REMILLARD, 2010; SILVA, 2015) e resposta à terapia com imunossupressores.

Diferentemente dos seres-humanos, cães não apresentam distinção entre os componentes celulares do sistema imunológico recrutados (Th1 ou Th2) e apresentam resposta mista sem predomínio de nenhum tipo celular específico e, por este motivo, o termo genérico DII é utilizado (HEILMANN; SUCHODOLSKI, 2015).

A DII é considerada como a causa mais comum de doença gastrintestinal crônica em cães e a causa mais importante de vômito e diarreia em cães e gatos (CAVE, 2003, 2013; WASHABAU et al., 2010a) que, associadas à perda de peso, são relatadas como as suas principais manifestações clínicas.

A predominância destes sinais pode variar com a região do trato gastrintestinal (TGI) mais acometida: enquanto o vômito parece ser mais comum em DII que acomete principalmente estômago e região proximal do intestino delgado, a perda de peso, diarreia profusa, esteatorreia e ampla perda de líquido parecem ocorrer especialmente quando o intestino delgado é o mais acometido. Por sua vez, acredita-se que o

tenesmo, muco nas fezes e a diarreia com menor volume fecal sejam mais frequentes quando a DII acomete principalmente o cólon. Além dos sinais gastrintestinais, a doença é agravada pela possibilidade de intensa perda de peso, hiporexia, desidratação, perda de sangue devido a presença de úlceras gastrintestinais e perda da capacidade de permeabilidade seletiva dos enterócitos, além de dor abdominal e síndrome da má-absorção com possível perda de nutrientes, incluindo proteína pelas fezes (DAVENPORT; JERGENS; REMILLARD, 2010).

Acredita-se que a etiologia da doença seja multifatorial, com importante componente imunomediado (DAVENPORT; JERGENS; REMILLARD, 2010; SILVA, 2015). Esta teoria é respaldada pela observância, por exemplo, de alterações nos receptores de reconhecimento de padrão (PPRs) presentes nos enterócitos, tanto os receptores do tipo Toll (*Tool Like Receptor* = TLR): TRL 2, TLR 4, TLR 9, e TRL 5, quanto dos receptores do tipo NOD (*Nod Like Receptor* = NLR). Tais alterações são oriundas de polimorfismos de nucleotídeo único, ou seja, alterações genéticas que produzem moléculas defeituosas, cujos defeitos impactam diretamente no reconhecimento de, por exemplo, peptideoglicanos, material genético, flagelina, lipopolissacarídeos de membrana (LPS) das bactérias indígenas no TGI e, consequentemente, desencadeiam reação inflamatória descontrolada que pode desencadear a disbiose (CERQUETELLA et al., 2010; JERGENS; SIMPSON, 2012a).

Além destas alterações, a literatura científica já reportou dezenas de outras alterações relacionadas aos componentes do sistema imunológico que alteram sua tolerância aos microrganismos intestinais, bem como aos antígenos alimentares, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Sumário das alterações imunopatológicas observadas em cães com DII. Adaptado de JERGENS; SIMPSON (2012b).

Variável	Tipo de anormalidade
Linfócitos B de mucosa	< ou > concentração de IgG no intestino delgado
	> concentração de IgA e IgG no cólon
	> concentração plasmócitos no cólon
Linfócitos T de mucosa	< concentração de linfócito CD3+ no intestino delgado
	> concentração de linfócito CD3+, CD4+ no intestino delgado
	> concentração de linfócito CD3+ e CD8+ no cólon

Mastócitos de mucosa	< ou > concentração de mastócitos de mucosa no intestino delgado
MHC de mucosa	> concentração de MHC II no cólon de pacientes com colite histiocítica ulcerativa
TLR de mucosa	> concentração de TLR 2, 4 e 9 no intestino delgado e cólon
NFκβ de mucosa	> expressão de macrófagos
Citocinas de mucosa	Proporção de linfócitos auxiliares tipo Th1 e Th2 balanceada
Apoptose	< concentração de caspase 3 (linfocítica)

MHC: *major histocompatibility complex*; TLR: *tool-like receptor;* IgA: imunoglobulina A; IgG: imunoglobulina G; NFκβ: *nuclear factor* κβ.

De forma geral, tais resultados corroboram as teorias que associam alterações genéticas que comprometem o funcionamento adequado do sistema imune com alterações do perfil microbiano residente para a manifestação de inflamação ou não (MATSUOKA; KANAI, 2015) e sua perpetuação.

Com relação à predisposição genética, gatos siameses, cães pastores alemães, basenjis e shar peis parecem liderar as raças com diagnóstico de DII (JERGENS et al., 1992; GERMAN; HALL; DAY, 2003).

Matsuoka e colaboradores (2015) demonstraram em revisão a possível patogenia da DII e sua relação com a disbiose, com base nos resultados relevantes presentes na literatura a respeito. Segundo os autores, três importantes caminhos para indução da inflamação foram identificados: um deles seria a redução de bactérias produtoras de butirato, ácido graxo de cadeia curta (AGCC) responsável pelo fornecimento de energia aos colonócitos; produção de mucina (que dificulta a aderência de bactérias patogênicas à mucosa) e indução de diferenciação de células T reguladoras, responsáveis pela manutenção da homeostase do sistema imune. Outro caminho seria pelo aumento de bactérias redutoras de sulfato, as quais produzem sulfito de hidrogênio, composto tóxico para as células intestinais. Por fim, o terceiro caminho envolve o aumento de genes relacionados ao estresse oxidativo da microbiota (por análise metagenômica) que poderia culminar em inflamação intestinal.

Até o momento, os caminhos que levam à inflamação são objeto de estudo, entretanto sabe-se que não existe linearidade no processo, ou seja, assim como a inflamação provoca disbiose, a disbiose provoca inflamação. Em todos os sentidos, em virtude do processo inflamatório, pode haver o comprometimento das junções de oclusão, responsáveis por impedir o contato entre o meio exterior e o meio interior e prejudica a capacidade de permeabilidade seletiva dos enterócitos. Neste sentido, os

antígenos alimentares ao entrarem em contato com a região basal das células (quando antes interagiam somente no ápice) podem desencadear processo inflamatório mediado por células e sistema complemento que passam a identificá-los como componentes agressores, situação chamada de perda de tolerância oral (FASANO, 2012; CASTRO-SÁNCHEZ; MARTÍN-VILLA, 2013).

Diante deste quadro, o paciente com perda de tolerância oral passa a reagir de forma inadequada aos antígenos alimentares e desenvolve respostas celulares de memória à partir de suas estruturas proteicas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

2.2 DIAGNÓSTICO DA DII

O diagnóstico da DII envolve a observação das manifestações clínicas (diarreia crônica e alterações gastrintestinais persistentes por período superior a três semanas), exclusão de outras causas de inflamação intestinal, resposta clínica ao tratamento imunossupressor associado a resposta inadequada a tratamentos isolados envolvendo antibioticoterapia, vermifugação ou manejo nutricional (WASHABAU et al., 2010a) e evidências anatomopatológicas de inflamação na mucosa intestinal obtidas através de biópsia (WASHABAU et al., 2010b). A avaliação histopatológica é requerida para o diagnóstico final, o qual pode ser obtido pela observação da população predominante de células inflamatórias na lâmina própria. No caso da DII há predominância de infiltrado linfoplasmocítico (WASHABAU et al., 2010b).

A severidade da inflamação gastrintestinal também pode ser graduada em quatro escores, com níveis de comprometimento crescentes, sendo eles: leve, moderado, acentuado e severo. Entretanto, os critérios específicos para classificação não são homogêneos entre os grupos de pesquisadores e comparações entre diferentes estudos não são passíveis de serem conclusivas. Mesmo quando os critérios idênticos são adotados, variações também são observadas na interpretação histológica dos patologistas (WASHABAU et al., 2010b).

A avaliação morfológica da mucosa também fornece dados importantes para a interpretação, esta pode ser realizada por meio de ultrassonografia ou endoscopia (WASHABAU et al., 2010b). À imagem ultrassonográfica, a atrofia de mucosa e submucosa associadas a dilatação luminal com ausência de perda da estratificação são achados consistentes com diagnóstico de DII (GASCHEN et al., 2008). Por meio

da endoscopia é possível observar ulceração e erosão da mucosa, bem como linfangiectasia (WILLARD et al., 2008; WASHABAU et al., 2010b).

Os achados morfológicos compatíveis com inflamação variam de acordo com a região acometida. Na mucosa duodenal é possível observar atrofia vilosa, injúria epitelial, distensão das criptas intestinais, dilatação de vasos linfáticos e fibrose. Já na mucosa colonica, é possível observar injúria da superfície epitelial, hiperplasia, dilatação e deformação de criptas intestinais, atrofia e fibrose da mucosa (DAY et al., 2008; WASHABAU et al., 2010a).

Com relação aos achados hematológicos, baixas concentrações de vitamina B12 e folato foram descritas em cães e gatos com afecções gastrintestinais, inclusive DII (SIMPSON et al., 2001) em função da disbiose. Ainda, Allenspach e colaboladores (2007) relacionaram tais deficiências à refratariedade do tratamento, ou seja, ao prognóstico desfavorável.

Além disso, Mehain et al. (2019) observaram que a contagem de plaquetas e a amplitude de distribuição plaquetária foram associadas a maiores índices de atividade de enteropatia crônica em cães e estes autores estudam a possibilidade de utilização dos índices plaquetários como biomarcadores da DII, uma vez que a ativação plaquetária está associada ao processo inflamatório.

2.3 TRATAMENTO

O tratamento para a DII inclui a vertente farmacológica e nutricional. No âmbito farmacológico, o recomendado é que sejam utilizados medicamentos imunossupressores. A prednisona é a primeira escolha terapêutica, porém outros fármacos imunossupressores podem ser utilizados como a azatioprina e a ciclosporina. Devido aos efeitos colaterais conhecidos dos corticoides, da possibilidade de mielossupressão grave causada pela azatioprina e aos achados de anorexia, ulceração gengival, alopecia, hipertricose e vômito após administração de ciclosporina (ALLENSPACH et al., 2007), o tratamento objetiva que o animal seja mantido com a menor dose possível eficaz para manter o paciente sem manifestações clínicas (SILVA et al., 2015) da doença. Ainda, em relação aos medicamentos que podem ser utilizados, a antibioticoterapia é recomendada como minimizador das manifestações diarreicas, o que deu origem ao termo “diarreia responsiva a antibióticos” (WALKER et al., 2013).

Da mesma forma, quando há melhora das manifestações clínicas após modificações no manejo nutricional, alguns autores empregam o termo “enteropatia responsiva a dieta” (WALKER et al., 2013). Assim, o tratamento nutricional tem como objetivo auxiliar na minimização das manifestações clínicas ou ao menos diminuição da necessidade ou dose administrada de medicamentos. Para os quadros de DII, a recomendação é que o alimento empregado tenha características de dieta de eliminação, ou seja, a base de ingredientes proteicos não usuais ou proteína hidrolisada (CAVE, 2006; DAVENPORT; JERGENS; REMILLARD, 2010). As chamadas dietas hipoalergênicas a base de proteína hidrolisada são reconhecidas como boa estratégia de tratamento nutricional para as enteropatias crônicas, por serem alimentos capazes de favorecerem a remissão completa das manifestações clínicas em alguns pacientes, sem a necessidade da associação com medicamentos (MARKS; LAFLAMME; MCALOOSE, 2002; CAVE, 2006; ALLENSPACH et al., 2007; MANDIGERS et al., 2010). Poucas informações estão disponíveis na literatura que possam ser utilizadas como marcadores para predizer quais pacientes responderão exclusivamente à dieta e quais precisarão do tratamento farmacológico associado (ALLENSPACH et al., 2007).

A possibilidade de controle das manifestações clínicas através de modificações dietéticas e do uso de antibioticoterapia demonstra a importância da manipulação da microbiota através do manejo nutricional para a patogênese da DII (WALKER et al., 2013). Neste contexto, o emprego de prebióticos parece ser benéfico, já que estudos demonstraram que realmente há alterações na microbiota de cães com DII em comparação a de cães saudáveis (XENOULIS et al., 2008; SUCHODOLSKI et al., 2010; SUCHODOLSKI, 2011; MINAMOTO et al., 2015) e que a inclusão de prebióticos pode melhorar as manifestações clínicas da DII (RYCHLIK et al., 2013; HIJOVÁ et al., 2015).

2.4 MICROBIOTA INTESTINAL E SUA RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO SAUDÁVEL E ACOMETIDO PELA DII

O trato gastrintestinal (TGI) dos animais é colonizado por variada população de microrganismos como, por exemplo, bactérias, fungos, protozoários e vírus em relação ecológica de simbiose ou antagônica, que se nutrem dos componentes

alimentares não digeridos e das secreções do TGI (TESHIMA, 2006). O conjunto de microrganismos presentes em um ambiente específico é denominado de microbiota, que podem ser identificados através do sequenciamento de seu material genético. O material genético total extraído de uma população microbiana em determinado ambiente é denominado metagenoma e ambos (microbiota e metagenoma) compõem o que é conhecido como microbioma (SUCHODOLSKI, 2011; WHITESIDE et al., 2015). O mencionado benefício mútuo (simbiótico) entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro é pouco compreendido e tema de atual discussão em virtude de sua aparente relevância nos mecanismos de saúde e doença.

Em humanos saudáveis, estima-se que o TGI seja composto em sua maioria por bactérias (SWANSON et al., 2011) em uma população total de aproximadamente um trilhão de microrganismos, valor superior ao número de células do hospedeiro (SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016). Tal representatividade fomenta pesquisas e estudos acerca de suas funções em monogástricos, visto que em bovinos e equinos (monogástricos, embora com ceco funcional) suas funções são melhor compreendidas, uma vez que nestes animais os produtos de fermentação são essenciais para o metabolismo energético (DENG; SWANSON, 2015a).

Cães e gatos não dependem da microbiota intestinal para a obtenção de energia, entretanto a sua estabilidade e as relações ecológicas com o hospedeiro são relevantes na manutenção da saúde gastrintestinal (DENG; SWANSON, 2015a). A microbiota em questão parece ser influenciada por caracteres hereditários, nutricionais e localização geográfica, principalmente (PANASEVICH et al., 2015). Estudos em humanos apontaram que indivíduos geneticamente próximos, mesmo quando não convivem no mesmo ambiente, tendem a apresentar o mesmo perfil de microbiota em relação àqueles que não possuem parentesco (STEWART; CHADWICK; MURRAY, 2005; TURNBAUGH et al., 2008). O ambiente ainda influencia de forma significativa, a ponto de que pessoas que coabitam no mesmo lar compartilham semelhanças entre si e, inclusive, com seus pets (CAUGANT; LEVIN; SELANDER, 1984; FIERER et al., 2010). Tal interação ressalta a importância de estudos com avaliação da microbiota dos animais de companhia, em razão de sua convivência cada vez mais próxima com o ser humano (DENG; SWANSON, 2015a).

A microbiota também pode ser influenciada pelos nutrientes advindos da alimentação. Consequentemente, diferenças são observadas entre indivíduos de

natureza originalmente carnívora e de natureza onívora (HANG et al., 2012; LI et al., 2017). Em linhas gerais, sabe-se que em cães e gatos saudáveis, as bactérias predominantes pertencem ao filo Firmicutes (Clostridium spp. e Lactobacillus spp.) que representa 95,3% da população microbiana nos cães e 92,1% nos gatos (HANDL et al., 2011). De acordo com Honneffer et al. (2017), em cães saudáveis especificamente, há prevalência geral de Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria.

Os cães, por sua natureza onívora, possuem maior habilidade nos processos de digestão e metabolização de carboidratos. Nestes, de acordo com Handl et al. (2011), o segundo filo mais predominante são os Bacteroidetes spp. (2,3%), que engloba o gênero Prevotella spp., com reconhecido envolvimento nos processos de fermentação de carboidratos para produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): butírico, acético e propiônico e ácidos graxos de cadeia curta ramificada (AGCCR). Além do gênero Prevotella spp., os gêneros Faecalibacterium spp. e Bifidobacterium spp. destacam-se na produção de AGCC (SUCHODOLSKI, 2011) e este último também está envolvido na produção de AGCCR (WASHABAU; DAY, 2012).

Comparativamente, devido à existência de projetos internacionais com foco no estudo do microbioma humano (Projeto microbioma e projeto metagenômica do trato gastrintestinal, por exemplo), pouco se conhece a respeito da microbiota do TGI de pets. A maioria dos estudos envolvem a avaliação de fezes de animais saudáveis de laboratório, com escassez de dados a respeito do perfil microbiano em animais doentes e com metodologias padronizadas (DENG; SWANSON, 2015a).

Na última década, alguns estudos reportaram alterações significativas no perfil microbiano de humanos com doença de Crohn (SHEN et al., 2017), obesidade (TURNBAUGH et al., 2006; LEY, 2010), diabetes (LARSEN et al., 2010; BROWN et al., 2011), asma (ARRIETA; FINLAY, 2014), alergias (ROUND; MAZMANIAN, 2009) e inclusive, autismo (ROSENFELD, 2015). De forma similar ao observado em humanos com enteropatias, alterações no perfil microbiano intestinal de cães contribuem para o aparecimento de doenças intestinais (DENG; SWANSON, 2015a).

As alterações do perfil microbiano são caracterizadas pelo termo “disbiose”, que pode ser definida como qualquer alteração na composição da população microbiana residente, diferente do encontrado em indivíduos saudáveis. Ela pode ser

categorizada em três tipos, podendo ou não serem exclusivos: (I) perda dos microrganismos benéficos, (II) crescimento de microrganismos patogênicos e (III) perda da diversidade microbiana, em geral (PETERSEN; ROUND, 2014).

De fato, apenas a observação clínica de que a DII responde parcialmente ao tratamento com antibiótico contribui com a ideia de que a microbiota intestinal tem influência no processo inflamatório. Além disso, aspectos como aumento da incidência de DII em humanos com o crescimento da industrialização e as alterações dietéticas advindas da transformação da forma de obtenção de alimento também corroboram esta ideia (DE FILIPPO et al., 2010; KAPLAN; NG, 2017; NI et al., 2017). Entretanto, os estudos que tentaram definir se a disbiose é meramente consequência ou é a causa da DII não chegaram a uma conclusão.

Em cães com DII a disbiose também é uma alteração reportada com frequência e é marcada principalmente pela redução dos microrganismos representantes dos filos Firmicutes, Bacteroidetes combinado ao aumento de Proteobacteria e Actinobacteria. Portanto, apesar do cão não ser considerado um bom modelo animal para estudo de DII em humanos em função das diferentes respostas imunológicas, a doença parece ter a mesma etiopatogenia no que diz respeito às alterações do microbioma intestinal (OMORI et al., 2017).

De acordo com Matsuoka; Kanai (2015), diversas doenças estão atualmente associadas à disbiose como um todo, ao invés de alterações envolvendo uma única espécie bacteriana. Ainda, de acordo com os autores supracitados, esta é frequentemente reportada como uma das alterações mais relevantes no curso da DII e, diante dos estudos publicados até o momento, a hipótese mais aceita para elucidar a sua patogênese é baseada em conjunto de reações imunes aberrantes aos microrganismos autóctones e fatores ambientais em um indivíduo geneticamente predisposto. Não se sabe, no entanto, se ela é causa ou consequência da DII (MATSUOKA; KANAI, 2015).

Em humanos com DII, diversos autores já reportaram de forma consistente a disbiose do tipo I e II, com redução de bactérias do filo Firmicutes e aumento de Proteobacteria (MANICHANH et al., 2006; SCANLAN et al., 2006; PETERSON et al., 2008). Demais estudos reportaram ainda redução da diversidade de Firmicutes, com especial atenção ao Clostridium leptum e Faecalibacterium prausnitsii (SOKOL et al., 2008; WANG et al., 2014).

Em cães com diarreia crônica, resultados de Bell et al. (2008) e Jia et al. (2010) reportaram maior abundância de Bacteroidetes e menor abundância de Lactobacillus, em comparação ao grupo controle, por meio da técnica do polimorfismo de comprimento de fragmento (RFLP) e hibridização fluorescente *in situ*, respectivamente. Além disso, Jia et al. (2010) encontraram redução na população de Enterococcus spp.. Resultados similares foram encontrados por Chaban; Links; Hill (2012) em cães com DII, os quais apresentaram maior abundância de Bacteroidetes e Proteobacteria em comparação a cães saudáveis, quando realizaram suas análises por meio de pirosequenciamento (sequenciamento de DNA de segunda geração).

Em estudo retrospectivo, Kalenyak et al. (2018) avaliaram a microbiota intestinal de cães com DII por meio de amostras da mucosa intestinal de duodeno e cólon. Os autores foram pioneiros ao utilizarem para este propósito o método de sequenciamento Illumina (sequenciamento de última geração). O estudo foi concluído com nove animais diagnosticados com DII, os quais foram manejados com dieta hipoalergênica e terapia imunossupressora: prednisolona (1mg/Kg BID) e/ou ciclosporina (5mg/Kg SID) e/ou budesonida (3mg/animal SID). A microbiota foi avaliada antes e após 60 dias de tratamento. Em linhas gerais, os autores não observaram diferenças no conjunto de bactérias antes e depois do tratamento, entretanto alguns grupos bacterianos apresentaram variações em abundância.

No estudo supracitado, as famílias Planococcaceae e Oxalobacteraceae e o gênero Citrobacter, Burkholderia foram mais abundantes no cólon de cães com DII antes do tratamento. Enquanto, após o tratamento, o gênero Bacteroides, Gemella e Peptococcus foram os mais abundantes. Este é o estudo mais recente sobre o assunto em questão.

No entanto, os autores relataram que os animais poderiam ter recebido pró ou prebióticos previamente aos procedimentos de coleta de amostra e, que o efeito em longo prazo destes aditivos não pôde ser descartado. Além disso, os autores não padronizaram a dieta, a severidade da enteropatia, não avaliaram os produtos de fermentação fecal (cuja produção está associada à patogênese da doença) e não possuíam um grupo controle. Por fim, ainda com relação a este estudo, não há informações acerca da evolução clínica destes animais, bem como informações sobre os parâmetros hematológicos e escore fecal dos animais estudados, o que dificulta compreensão mais aprofundada dos resultados encontrados.

A avaliação da microbiota associada à determinação dos produtos de fermentação fecal e ao acompanhamento clínico e laboratorial dos pacientes acometidos por esta doença podem, portanto, contribuir de forma significativa para a literatura científica, de modo que sejam melhor compreendidos os possíveis efeitos da modulação da microbiota e seus produtos de fermentação em função de diferentes tratamentos empregados.

2.4 PREBIÓTICOS E B-GLUCANOS

As definições do conceito de prebiótico evoluíram em consonância com a evolução dos conhecimentos sobre a microbiota intestinal. Em 1995, Gibson e Roberfroid definiram prebióticos como ingredientes não digestíveis, que afetam de forma positiva um indivíduo por meio de seleção de uma ou mais bactérias no cólon do hospedeiro, de forma favorável à sua saúde. Tal definição era limitada pelo conhecimento acerca da população microbiana no intestino, cuja imensa diversidade e atividade ainda não era conhecida, bem como os métodos de identificação eram limitados e resumiam-se ao cultivo celular de poucas das bactérias conhecidas.

Tal definição evoluiu de forma que hoje reconhece-se que, de forma geral, os efeitos benéficos produzidos são fruto dos metabólitos provenientes da fermentação bacteriana que interagem com a mucosa intestinal (BINDELS et al., 2015) e tal conceito fomentou e fomenta estudos direcionados na investigação de quais bactérias especificas ou o conjunto delas fermentam cada tipo de composto para que se obtenha o efeito desejado (HOLSCHER, 2017).

A fim de que tais substâncias alcancem a microbiota alvo e desempenhem o mencionado potencial, eles não podem ser digeridos pelas enzimas do intestino delgado e devem resistir à acidez gástrica estomacal. Além disso, não devem ser fermentáveis pelas bactérias orais e bactérias patogênicas do TGI, mas sim por bactérias benéficas, servindo de substrato para o seu crescimento (OREL; TROP, 2014).

Em linhas gerais, os prebióticos, ao favorecerem a fermentação de bactérias benéficas e, consequentemente, promoverem o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acetato, propionato e butirato; podem influenciar na redução do pH do microambiente intestinal e inibir o crescimento de bactérias patogênicas, as quais são beneficiadas pelo pH alcalino (TOPPING, 1996; OREL;

TROP, 2014). O butirato desempenha papel imprescindível na nutrição dos colonócitos, uma vez que contribui para o reparo tecidual após a injúria em casos de inflamação, por exemplo. Além disso, evidências demonstraram que ele pode agir diretamente como agente antinflamatório ao inativar o fator de transcrição intracelular NF-kB e atenuar a síntese de citocinas inflamatórias (OREL; TROP, 2014).

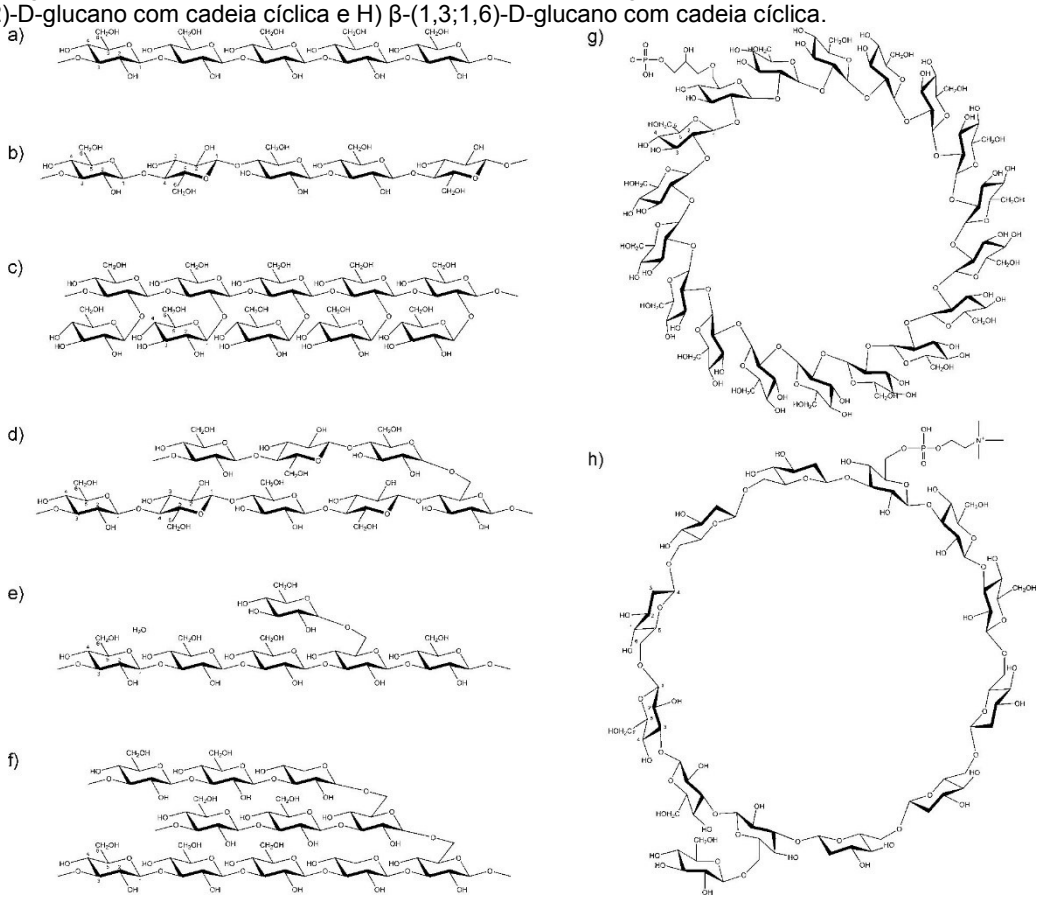
O potencial modulador da microbiota intestinal torna os prebióticos uma ótima alternativa coadjuvante ao tratamento de doenças, cuja patogenia é influenciada por alterações da microbiota intestinal, como a DII. Estes podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou podem ser suplementados através de fontes exógenas (GIBSON; ROBERFROID, 1995). A maioria das substâncias prebióticas são polissacarídeos não amiláceos (PNA) que constituem as fibras dietéticas, indigeríveis pelas enzimas de humanos, cães e gatos. Os PNAs podem ser solúveis ou insolúveis em água. Aqueles que compõem a parede celular dos vegetais são, portanto, insolúveis e, constituem-se principalmente de celulose e hemicelulose. Já aqueles que compõem a parede celular do endosperma, constituem-se em sua maioria de PNAs solúveis, como por exemplo, os β-1,3 e β-1,4 glucanos presentes tanto nos cereais como na aveia e trigo, como também em fungos como Ganoderma e Lentinula edodes e bactérias (OREL; TROP, 2014).

O tamanho da molécula desses polissacarídeos, seu grau de polimerização e ramificação tem influência na capacidade de uma bactéria utilizá-lo ou não como fonte de energia e tal habilidade pode ser diferente mesmo entre espécies do mesmo filo (HOLSCHER, 2017).

Os β-glucanos são polissacarídeos formados por monômeros de glicose unidos por ligações lineares alternadas aos monômeros de glicose (BROWN et al., 2003). Estes polímeros de glicose são produzidos por uma variedade de plantas como, por exemplo, aveia, cevada, algas-marinhas. Eles também constituem a parede celular de algumas bactérias patogênicas (Pneumocystis carinii, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, Histoplasma capsulatum, Candida albicans), fungos e leveduras (Saccharomyces cerevisiae). Os β-glucanos de origem bacteriana somente apresentam ligações lineares β-1,3 lineares entre seus monômeros (BROWN et al., 2003) e os originários de leveduras apresentam ligações beta com unidades de glicose unidas na posição 1,3 e cadeias laterais e, posição beta 1,6 (HOLSCHER, 2017), que ocorrem em diferentes intervalos, tamanhos e formas moleculares variadas

(MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008), aspectos ilustrados na Figura 1. Por sua vez, na Tabela 2 estão descritas as formas moleculares encontradas nas diversas fontes e seus nomes usuais.

Figura 1. Diferentes estruturas dos β-glucanos. A) β-(1,3)-D-glucano linear; B) β-(1,3;1,4)-D-glucano linear; C) β-(1,3;1,2)-D-glucano com cadeia lateral ramificada; D) β-(1,4;1,6)-D-glucano com cadeia lateral ramificada; E) β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia lateral ramificada; F) β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia ramificada ramo-a-ramo; G) β-(1,2)-D-glucano com cadeia cíclica e H) β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia cíclica.



Fonte: Barsanti et al. (2011).

Tabela 2. Formas moleculares de β-glucanos de diferentes fontes e seus nomes usais. Fonte: Adaptado de Barsanti et al.(2011).

Estrutura	Fonte		Nome comum
Linear β-(1,3)-D-glucano	Bactéria	*Agrobacterium spp.*	Curdlana/Curdlano
		Rhizobium spp.	
		Cellulomonas spp.	
		Bacillus spp.	
		Alcaligenes faecalis	
	Fungo	Poria cocos	Pachyman
	Líquen	Stereocaulon ramulosum	
		Ramalina spp.	
		Cladonia spp.	
	Alga	Euglena spp.	Paramylon
		Astasia longa	
		Pavlova mesolychnon	
		Peranema trichophorum	
	Planta	Vitis vinífera	Callose
		Gossypium arboretum	
		Nicotiana alata	
Linear β-(1,3;1,4)-D-glucano	Líquen	Cetraria islandica	Lichenina
	Alga	Ulva lactuca	
		Monodus subterraneus	
		Micrasterias spp.	
	Planta	Hordeum vulgare	
		Avena sativa	
		Triticum vulgare	
		Equisetum arvense	
β-(1,3;1,2)-D-glucano com cadeia lateral ramificada	Bacteria	Streptococcus pneumonie tipo 37	
β-(1,4;1,6)-D-glucano com cadeia lateral ramificada	Fungo	Auricularia auricula-judae	Krestin
		Coriolus versicolor	
β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia lateral ramificada	Fungo	Pleurotus ostreatus	Pleuran
		Lentinus edodes	Lentinan
		Sclerotium rolfsii	Scleroglucan
		Schizophyllum commune	Schizophyllan
		Grifola frondosa	Grifolan
	Alga	Phytium apinadermatum	Mycolaminarin
		Achyla bisexualis	
		Chaetoceros mülleri	Chrysolaminarin
		Ochramonas spp.	
		Haramonas dimorpha	
		Phaeodactylum tricornutum	
		Coscinodiscus nobilis	
		Thalassiosira pseudômona	
		Laminaria spp.	Laminarina
		Eicenia spp.	
β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia ramificada ramo-a-ramo	Fungo	Saccharomyces cerevisiae	
		Schizossaccharomyces pombe	
		Aspergillus fumigatus	
β-(1,2)-D-glucano com cadeia cíclica	Bactéria	Candida albicans	
		Agrobacterium tumefaciens	
		Sinorhizobium meliloti	
		Rhizobium meliloti	
		Mesorhizobium loti	
		Brucella spp.	
β-(1,3;1,6)-D-glucano com cadeia cíclica	Bactéria	Bradyrhizobium japonicum	
		Rhizobium loti	
		Azorhizobium caulinodans	
		Azospirillum brasiliense	

Estudos *in vitro* sugerem diferentes atividades de acordo com a origem e o peso molecular do β-glucano. Em geral, aqueles de grande peso molecular, como o

zymosan (componente insolúvel da parede celular de leveduras que contem glucana, manose, proteína, gordura, glicosamina, fósforo e magnésio) e o β-(1,3;1,6)-D-glucano originário da parede celular de levedura (PCL) de *Saccharomyces cerevisiae* (190 a 200 quilodaltons) podem ativar leucócitos e melhorar sua capacidade antimicrobiana. Aqueles de peso molecular intermediário ou baixo (como glucano fosfato) possuem efeitos imunomodulatórios conhecidos *in vivo,* mas ainda pouco compreendidos. Já aqueles com baixíssimo peso molecular (como a laminarina com peso molecular de 5,85 quilodaltons) são considerados inativos (AKRAMIENE et al., 2007).

Além disso, quando PCL é oferecida, esta também é composta por mananoligossacarídeos (MOS) em sua porção estrutural mais externa, os quais também resultam em efeitos benéficos no sistema imunológico quando entram em contato com as bactérias intestinais (MIDDELBOS et al., 2007).

Conforme observado, os β-glucanos podem exercer seus efeitos diretamente através de sua interação com receptores celulares. A Dectina-1 é o principal PRR para glucanos e é amplamente expresso por monócitos, neutrófilos, macrófagos alveolares e pouco expresso por células dendríticas e linfócitos T auxiliares de modo a influenciar sua capacidade inflamatória (BARSANTI et al., 2011).

Ao longo de muitos anos, os glucanos foram, portanto, considerados potentes ativadores da imunidade celular que exerce efeitos pró-inflamatórios contra patógenos e células cancerosas (VETVICKA et al., 2019). Entretanto, o termo imunomodulador é o mais adequado diante dos recentes avanços da literatura científica que observaram também efeito atenuador da resposta inflamatória em doenças crônicas como, por exemplo, a DII (HALLERT et al., 2003; RYCHLIK et al., 2013; HEINSBROEK et al., 2015; SEGARRA et al., 2016; ZYŁA et al., 2019).

Um estudo realizado por Zyła et al. (2019) demonstrou tal capacidade imunomodulatória quando a ingestão de β-glucano foi capaz de balancear a razão entre citocinas pró e antinflamatórias em ratos com DII induzida. Neste trabalho, o prebiótico teve efeitos menos pronunciados naqueles animais com colón saudável, mas exerceram efeito antinflamatório naqueles cujo cólon estava inflamado e, assim como Municio et al. (2013) que estudaram a ingestão de β-glucanos em humanos, chegaram à conclusão de que os seus efeitos são dependentes do meio.

As pesquisas com β-glucanos iniciaram-se no último século, quando o seu efeito imunomodulador foi descrito *in vitro* pela primeira vez por Pillemer; Ecker (1941), e depois *in vivo* em humanos (BABINEAU et al., 1994; SARINHO et al., 2009; TALBOTT; TALBOH, 2010) e em cães saudáveis por Zaine et al. (2014) e em cães obesos por Ferreira (2016). Diversos estudos avaliaram os efeitos dos β-glucanos em modelos animais com DII. Na Tabela 3 está apresentado um resumo dos principais resultados e limitações de estudos em animais, humanos e modelos animais com DII tratados com β-glucanos. Estudos cuja origem do β-glucano e dose não foram declarados foram excluídos da pesquisa.

Tabela 3. Estado da arte de estudos realizados até o momento com pacientes humanos, animais ou modelos animais com doença inflamatória intestinal que receberam β-glucanos.

Referência	Espécie	Origem do β-glucano	Dose/frequência/tempo de tratamento	Principais resultados	Limitações
Hallert et al. (2003)	Humanos com CU em remissão	Farelo de aveia	60 gramas por dia, durante 12 semanas	Aumento das concentrações fecais de butirato, redução de dores abdominais	Número amostral pequeno Composição do placebo não declarada Dieta não controlada
Rychlik et al. (2013)	Cães com DII	β-glucano de levedura	7mg/kg de peso corporal, durante 6 semanas	Redução do CIBDAI (<3), melhora das alterações histopatológicas, redução das concentrações de IL-6, aumento de IL-10. Pacientes permaneceram em remissão por 6 meses	
Lee et al. (2014)	Camundongos com DII induzida por DSS	β-glucano extraído de bactéria	2,5 ou 5mg/kg, durante 2 semanas (suplementação prévia a indução)	Recuperação da arquitetura colonica, escore histopatológico de severidade da doença. Aumento da expressão de IL-1β, IL-6 e IL-17A. Indução de diferenciação de células T reguladoras	DII induzida
Heinsbroek et al. (2015)	Camundongos com DII induzida por DSS	β-glucano de bactéria, levedura e fosfato de glucano	1mg por dia, durante 2 semanas	Aumento do escore histopatológico de inflamação, TNF-α e CCL-2. Fosfato de glucano somente aumentou as concentrações séricas de IL-10	DII induzida

Segarra et al. (2016)	Cães com DII	β-glucano de levedura	26mg/kg, durante 180 dias	Redução do CIBDAI, escore histopatológico de lesão no grupo tratado, mas sem diferença entre os grupos	Microbiota avaliada por *polymerase chain reaction* (PCR). Tratamento não foi individualizado: amido resistente, sulfato de condroitina, β-glucano e mananoligossacarídeos
Spagnuolo et al. (2017)	Humanos com DC	β-glucano de levedura	55mg/dia, durante 4 semanas	Redução de dor, inchaço abdominal e flatulência	Tratamento não foi individualizado: Biointol® = β-glucano, inositol e enzimas digestivas + mesalazina. Não houve padronização da dieta
Zyła et al. (2019)	Ratos com DII induzida	β-glucano de aveia	1% (baixo ou alto peso molecular) durante 21 dias	Redução da população de linfócitos T e linfócitos intraepiteliais e de lâmina própria. Redução da expressão gênica de citocinas proinflamatórias	Ingestão de β-glucano não foi controlada. DII induzida por TNBS

Legenda: CU = colite ulcerativa; DC = doença de chron; CIBDAI = *canine inflammatory bowel disease activity index*; DSS = *dextran sulfate sodium*; IL = interleucina; mg = miligramas; kg = quilogramas; TNF-α= *tumor necrosis fator alpha*; TNBS = *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*; CCL-2 = *C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein).*

Até o presente momento, não foram realizados estudos que avaliaram os efeitos da suplementação de β-glucanos de forma isolada na microbiota fecal de cães com DII, especialmente no que se refere ao emprego da técnica de sequenciamento de última geração, associado a determinação das concentrações de produtos da fermentação intestinal, bem como o comparativo com outro prebiótico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este foi um estudo clínico e randomizado, conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP (CEUA 1102270218), Conselho Hospitalar do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/FMVZ USP) e após prévia autorização dos tutores dos cães incluídos na pesquisa, conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido disponibilizado.

3.1 ANIMAIS

No total, 30 animais candidatos foram triados para participarem do estudo. Destes, 04 foram excluídos em função do não retorno dos proprietários para reavaliação; outros 03 por problemas pessoais dos tutores; 01 animal veio a óbito; 01 cão desenvolveu doença renal crônica; 01 animal possuía corpo estranho em estômago detectado em endoscopia; 01 animal foi retirado por manifestar reação alérgica cutânea e 01 tinha endoparasitas, os quais apresentaram resistência a parasiticida de amplo espectro. Ao final, remanesceram 18 cães com diagnóstico confirmado por histopatológico de doença inflamatória intestinal crônica na rotina do HOVET/ FMVZ/USP. Os critérios de inclusão estabelecidos foram: cães diagnosticados com DII baseado em histopatológico intestinal, em fase controlada da doença (sinais clínicos mínimos) para padronizar o estado inflamatório do intestino, machos ou fêmeas, adultos, sem outras afecções concomitantes, sem tratamento ou tratados com medicamentos imunossupressores limitados a azatioprina ou ciclosporina. Já os critérios de exclusão foram a presença de outras doenças associadas, necessidade de modificação do tratamento durante os períodos experimentais e o recebimento de prebiótico, probiótico ou corticoide, nos 30 dias prévios a inclusão no estudo.

3.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi composto por três grupos experimentais: β-glucanos [n= 6; peso corporal (PC)= 15,26±12,38 kg; ECC=6±0,63; EMM= 3±0,00], *Blend* [(MOS + β-glucanos) (n= 6; PC= 15,73±8,92 kg; ECC= 5±0,63; EMM= 2,83±0,41)] e Controle (n=6; PC= 10,52±8,82 kg; ECC= 4,83±0,41; EMM= 2,67±0,52). Ambos receberam o mesmo alimento comercial a base de proteína hidrolisada (Royal Canin Hypoallergenic Canine Small Dog[1]) cuja composição está descrita na Tabela 4. Os grupos suplementados com prebióticos (β-glucano ou *blend*) os receberam sob a forma de pó em cápsula e em dose calculada para corresponder a 0,1% da quantidade de alimento estimada (15mg por kg de peso corporal), portanto, para o produto Macrogard® que possui em sua composição 60% de β-glucano, o consumo de β-glucano foi de 0,06% e, no tratamento com blend de prebióticos o consumo de β-glucano foi de 0,025%.

O grupo placebo recebeu a mesma quantidade do próprio alimento hipoalergênico triturado e administrado na forma de cápsulas. O alimento triturado (placebo) e os prebióticos foram manipulados em cápsulas e administrados por via oral aos animais uma vez ao dia. A manipulação das cápsulas foi realizada na Forvets – Farmácia de Manipulação Veterinária.[2]

Para o início do estudo, a fim de padronizar a dieta fornecida, os animais receberam o mesmo alimento coadjuvante do tipo hipoalergênico durante 30 dias, de modo que a quantidade de alimento foi calculada de acordo com a necessidade energética de manutenção individual de cada paciente, estimada pela fórmula 95 x (peso corporal)^{0,75} (NRC, 2006). Os responsáveis pelos cães foram instruídos a não fornecerem petiscos durante os períodos experimentais e a fracionarem a alimentação em três refeições diárias.

Dentro deste período de 30 dias, foi agendado um retorno com 15 dias para reavaliação do peso corporal, exame físico e anamnese detalhada em relação ao manejo alimentar conduzido pelo tutor. Esta primeira avaliação também teve como objetivo averiguar a necessidade de ajustes na quantidade de alimento caso o animal apresentasse ganho ou perda de peso maior que 5% do seu peso inicial. Neste caso,

---

[1] Royal Canin do Brasil Indústria e Comércio, Descalvado - SP
[2] ForVets – manipulação veterinária comércio e serviços Ltda., São Paulo - SP.

o alimento era, respectivamente, diminuído ou aumentado em 10%. Caso o animal apresentasse alguma alteração clínica ou de peso, novos retornos eram agendados e as alterações e intervenções necessárias registradas.

Após os 30 dias de consumo do alimento hipoalergênico padronizado, os tutores foram orientados a trazer os animais para o HOVET-USP onde ocorreu a coleta de fezes (avaliação pré-tratamento). Os animais foram randomizados em três grupos experimentais: β-glucano (A), *blend* (MOS + β-glucanos) (B) e placebo (C), definidos por alguém alheio ao estudo, de modo que a administração das cápsulas ocorreu de maneira duplo-cega, ou seja, pesquisadores e proprietários, durante os períodos experimentais e análise dos dados, não souberam qual tratamento os animais estavam recebendo.

Novos retornos foram agendados com intervalo aproximado de 20 dias até completar 60 dias de recebimento de um dos três tratamentos.

No início e ao final de cada período experimental os animais foram reavaliados por meio de anamnese; exame físico, incluindo determinação do escore de condição corporal (ECC) (LAFLAMME, 1997), escore de massa muscular (EMM) (MICHEL et al., 2011), pesagem, coleta de sangue e coleta de fezes. Nesse momento também foi avaliado o escore fecal.

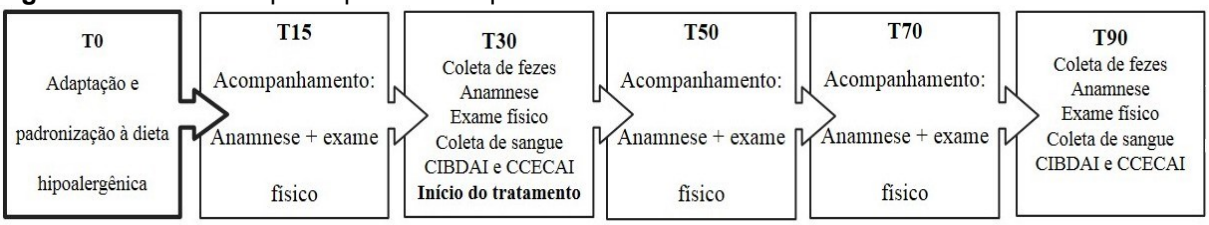
Nos dias das coletas, caso o animal não defecasse no HOVET-USP, as amostras fecais eram colhidas pelos tutores em suas casas com material estéril e instruções fornecidas previamente e, eram congeladas imediatamente após a coleta.

Além de todas as análises anteriores, após cada período experimental, foi atribuído o escore de atividade da doença inflamatória intestinal canina (CIBDAI) (JERGENS et al., 2003) e o escore de atividade da enteropatia crônica (CCECAI) (ALLENSPACH et al., 2007), para comparação da evolução clínica da doença. Ambos consistem na avaliação de seis variáveis gastrointestinais: atitude e atividade, apetite, vômito, consistência das fezes, frequência de defecação e perda de peso. No método CCECAI são acrescentadas as variáveis: concentração sérica de albumina, ocorrência de prurido e presença de ascite e/ou edema periférico. Nestes escores, notas de 0 (sem alterações) a 3 (com alterações severas) são aplicadas para determinar a severidade das mencionadas manifestações clínicas que, ao final, são somadas e classificadas. No caso do CIBDAI, nota final de 0 a 3 representa DII de pouco significado; 4 a 5 = DII leve; 6 a 8 = DII moderada e ≥ 9 = DII severa.

Já no caso do CIBDAI as interpretações são iguais embora até a classificação de DII moderada e a graduação de nota 9 a 11 significa DII severa e notas ≥ 12 DII muito severa.

A Figura 1 ilustra, de forma resumida, o protocolo experimental no decorrer dos tempos de avaliação.

Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental.



CIBDAI = escore de atividade da doença inflamatória intestinal canina; CCECAI = escore de atividade da enteropatia crônica; T0, 15, 30, 50, 70, 90 = tempo decorrido em dias.

3.3 HEMOGRAMAS E DOSAGENS BIOQUÍMICAS SÉRICAS

Após jejum alimentar de 12 horas foram colhidas amostras de 10mL de sangue da veia jugular para realização das análises laboratoriais: hemograma (eritrograma e leucograma) com contagem de plaquetas, dosagem sérica de creatinina, ureia, proteínas totais, albumina, atividade das enzimas alaninaminotransferase e fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides, cobalamina, folato, SPEC cPL (*Canine pancreas-specific lipase*), cTLI (*Canine tripsin-like immunoreactivity*) e PCR (proteína C reativa). As coletas de sangue e as análises sanguíneas foram realizadas de acordo com as metodologias do laboratório Idexx[3] e do laboratório do HOVET/ FMVZ USP.

Os hemogramas foram realizados no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/HOVET-FMVZ USP em contador eletrônico, para uso veterinário, da marca ABX Diagnostics, modelo ABC Vet[4]. Os hematócritos foram determinados por meio de tubos microcapilares e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, corados por panótico rápido.

A creatinina sérica foi analisada por meio do emprego do kit Labtest[5], pelo método picrato alcalino. A atividade sérica da ALT e FA foram analisadas pelo

[3] Idexx Laboratories, Inc., São Paulo – SP, Brasil
[4] Horiba Medical, Montpellier, França
[5] Labtest, Lagoa Santa, Brasil

emprego de kit comercial da marca Byossistems[6], pelo método IFCC e IFCC/SEQC, respectivamente. As análises de triglicérides foram realizadas com o emprego de kit comercial da marca Byossistems[6], pelo método enzimático oxidase/peroxidase. As análises de concentração sérica de fosfatase alcalina foram realizadas por meio do kit comercial Labtest[5]. A ureia sérica foi analisada com o kit comercial da marca Diasys[7] pelo método enzimático FS urease GLDH. A albumina, por sua vez, foi analisada com o kit comercial da marca Labtest[5], pelo método verde de bromocresol e as proteínas totais por meio do kit comercial da marca Labtest[5], pelo método do biureto.

As análises de folato, cobalamina e TLI canino foram realizadas com kits comerciais da marca Siemens[8] pelo método de quimioluminescência. A proteína C reativa foi realizada através de radioimunoensaio enzimático por meio de kit comercial do fabricante Gentian[9]. Por fim, as concentrações de Spec canina foram realizadas com kit comercial da IDEXX Laboratories[3], no equipamento Biotek pelo método de ELISA.

3.4 AVALIAÇÃO DAS FEZES

Nestas amostras foram analisadas as concentrações de lactato e identificação da microbiota presente nas fezes pelo sequenciamento de última geração Illumina. Ainda em relação às fezes, foi solicitado que os tutores as classificassem a cada 20 dias, de acordo com o escore de condição fecal: 0 = fezes líquidas; 1 = com textura, porém sem formato característico; 2 = úmidas, mas com formato fecal característico; 3 = macia, formada, superfície úmida (que deixa pequenos resíduos no chão no momento de recolher); 4 = fezes firmes, formadas e secas (sem resíduos no chão no momento de recolher); e 5 = duras, secas e pequenas (CARCIOFI et al., 2008). Para esta avaliação, os tutores foram previamente treinados e receberam um material impresso, plastificado e colorido com imagens de fezes representativas de cada escore (Figura 2).

---

[6] Biosystem S.A., Barcelona, Espanha
[7] Diasys – Diagnostic System, Holzheim, Alemanha
[8] Siemens Healthineers, Erlangen, Alemanha
[9] Gentian Diagnostics AS, Ostfold Moss, Noruega

Figura 3. Material entregue aos proprietários para a classificação do escore fecal.

Fonte: Carciofi et al. (2008).

3.4.1 Determinação da população fecal de bactérias pela tecnologia de sequenciamento Illumina

As amostras a serem analisadas foram encaminhadas ao laboratório da BPI tecnologia, pesquisa e inovação (Botucatu, São Paulo – Brasil) e o DNA total de cada amostra foi extraído utilizando o kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research cód. D6005) de acordo com o protocolo do fabricante.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL); 0,3µM de oligonucleotídeo *foward* e 0,3µM de oligonucleotídeoí *reverse*, 1uL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20uL. Para a amplificação foram utilizados os primers descritos na Quadro 1.

Quadro 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA.

I	Sequência 5'-3'
16S V4-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTA A
16s V4-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTA AT

Legenda: I = iniciador

O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 94ºC por 3 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94ºC por 45 segundos, anelamento a 55ºC por 1 min; extensão a 72ºC por 1 min; e uma extensão final a 72ºC por 10 min. As

reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*). Após reação de amplificação de cada amostra, as amplificações foram comprovadas através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com *UniSafe Dye* 0,03% (v/v) ~400bp (tamanho do amplicon).

Para a reação de indexação, os indexadores foram inseridos nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consistiu em incubação à 72°C por 3 minutos, desnaturação inicial à 95°C por 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 por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*).

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação utilizando *bead* magnética *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers. Após essa etapa, realizou-se a quantificação pela metodologia de PCR em Tempo Real utilizando Kit KAPAKK4824 (*Library Quantification Kit* - Illumina/Universal), todos de acordo com o protocolo do fabricante.

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

3.4.2 Determinação das concentrações de ácido lático nas fezes

As amostras de fezes foram coletadas em até 30 minutos após a defecação. Após serem entregues ao condutor do estudo, foram homogeneizadas e pesadas. Para a quantificação, três gramas das fezes foram diluídas em 09mL de água destilada. As misturas foram mantidas pelo prazo de sete dias em refrigerador, homogeneizadas diariamente e, posteriormente, centrifugadas por 15 minutos à 15°C em 5.000rpm, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento, sendo este procedimento repetido por três vezes. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

O ácido foi mensurado segundo metodologia descrita por Pryce (1969), pelo método de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro (QUICKLab, DRAKE Eletrônica Comércio LTDA, São José do Rio Preto – SP). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido lático a 0,08%. Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

3.5 COMPOSIÇÃO DA DIETA E B-GLUCANO

A composição do alimento experimental e as características físico-químicas dos prebióticos encontram-se descritas, respectivamente, nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Composição nutricional e lista de ingredientes do alimento hipoalergênico utilizado.

Variável	g/1000 kcal
Umidade	27,16
Proteína	54,32
Extrato etéreo	34,57
Matéria fibrosa	4,94
Matéria mineral	26,91
Cálcio (mín.)	2,00
Cálcio (máx.)	2,99
Fósforo (mín.)	1,58
Sódio (mín.)	1,97
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.816

Lista de ingredientes

Quirera de arroz, proteína hidrolisada de soja, gordura suína, gordura de frango, polpa de beterraba, óleo de soja refinado, óleo de peixe refinado, óleo de borragem, cloreto de sódio (sal comum), cloreto de potássio, fosfato bicálcico, fosfato monocálcico, levedura seca de cervejaria, carbonato de cálcio, sulfato de cálcio, fruto-oligossacarídeos, extrato de marigold, sorbato de potássio, tripolifosfato de sódio, zeolita, vitaminas (A, E, D3, C, B1, B2, B6, B12, PP), biotina, ácido pantotênico, ácido fólico, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de cobre, óxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, levedura enriquecida com selênio, cobre aminoácido quelato, manganês aminoácido quelato, zinco aminoácido quelato, taurina, tirosina, DL-metionina, palatabilizante a base de fígado de frango, antioxidante (BHA).

Tabela 5. Características físico-químicas dos prebióticos.

β-glucano[10]	
Glucanos g/100g (mín)	60,0
Gordura g/100g (máx)	18,0
Proteína (N x 6,25) g/100g (máx)	8,0
Matéria mineral g/100g (máx)	10,0
Sólidos totais (%)	> 90,0
Capacidade de retenção de água	7,4
Índice de solubilidade em água	7,9

[10] Macrogard®. Biorigin Brasil, Lençóis Paulista, SP, Brasil

Blend	
β-glucano[10] (g/100g)	25,0
Mananooligossacarídeos (MOS) (g/100g)	20,0
Índice de solubilidade em água MOS	100,0

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), sendo previamente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias comparadas pelo teste de Levine. As variáveis referentes aos resultados hematológicos, séricos, peso, ECC, EMM, EF, CIBDAI e CCECAI foram analisadas por meio de um modelo misto que contemplou os efeitos fixos de tratamento (A, B e C), tempo (T0 e T60) e interação tratamento x tempo, além do efeito aleatório de resíduo. Todas as análises foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED do programa SAS. Os dados foram submetidos a ANOVA, e quando apresentaram diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Para avaliação da microbiota, as abundâncias observadas para cada filo, classe, família e gênero e em cada animal foram avaliadas por meio de um Modelo linear misto generalizado, considerando a distribuição binomial e utilizando a função de ligação *logit*. O modelo estatístico incluiu os efeitos fixos de tratamentos (A, B ou C), tempos de avaliação (T0 ou T60), interação tratamento x tempo, além do efeito aleatório de animal. Como os mesmos animais foram avaliados em dois momentos distintos, adotou-se estrutura de medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais.

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

Foram incluídos no estudo 18 cães machos (n=8) e fêmeas (n=10), com idade média de 7,2 ± 3,64 anos; peso corporal (PC) médio igual a 13,88 ± 9,86 kg; ECC médio de 5,28 ± 0,75; EMM médio de 2,83 ± 0,38 e com diagnóstico histopatológico de doença inflamatória intestinal após triagem dos diagnósticos diferenciais. Estes foram distribuídos de forma duplo-cega aleatória em três grupos experimentais: A) β-glucano (n=6), B), *blend* (MOS + β-glucanos) (n=6) e, C) placebo (n=6). Na tabela 6

estão apresentadas as características dos animais incluídos no estudo, diagnóstico e grupo experimental.

Tabela 6. Descrição dos animais recrutados para o estudo (identificação, raça, sexo, status reprodutivo e diagnóstico).

Identificação	RAÇA	IDADE (anos)	SEXO/ESTADO REPRODUTIVO	DIAGNÓSTICO	TRAT.
Animal 1	Shih tzu	9	Macho castrado	Gastrite erosiva linfoplasmocítica discreta + duodenite erosiva crônica linfoplasmocítica severa	A
Animal 2	Dálmata	11	Fêmea castrada	Gastrite e duodenite linfoplasmocítica discreta + Ileíte e colite severa	A
Animal 3	Maltês	10	Macho castrado	Gastrite + enterocolite linfoplasmocítica discreta	A
Animal 4	Border collie	5	Macho castrado	Gastrite linfoplasmocítica leve + duodenite linfoplasmocítica moderada	A
Animal 5	SRD	11	Fêmea castrada	Enterite linfoplasmocítica/eosinofílica discreta	A
Animal 6	Pinscher	13	Fêmea castrada	Enterite linfoplasmocítica discreta	A
Animal 7	Poodle	5	Macho castrado	Gastrite linfocitária discreta + Duodenite linfoplasmocítica discreta	B
Animal 8	SRD	5	Fêmea castrada	Duodenite linfoplasmocítica, discreta a moderada, difusa, com raros neutrófilos	B
Animal 9	SRD	5	Fêmea castrada	Gastrite linfoplasmocítica discreta + colite linfoplasmocítica discreta + duodenite eosinofílica	B
Animal 10	West Highland White Terrier	9	Macho castrado	Gastrite linfoplasmocítica discreta + duodenite linfoplasmocítica moderada	B
Animal 11	Buldogue francês	2	Macho castrado	Duodenite linfoplasmocítica discreta	B
Animal 12	SRD	9	Fêmea castrada	Gastrite eosinofílica e linfoplasmocitária leve + duodenojejunite linfoplasmocitária moderada e colite eosinofílica e neutrofílica leve	B
Animal 13	Shih tzu	4	Fêmea inteira	Gastrite linfoplasmocítica moderada + duodenite linfoplasmocítica severa	C
Animal 14	SRD	4	Fêmea castrada	Gastrite linfocitária discreta + duodenite linfoplasmocitária discreta	C
Animal 15	Lhasa apso	13	Fêmea castrada	Gastrite e duodenite linfoplasmocítica discreta	C
Animal 16	Golden retriever	8	Macho castrado	Enterocolite linfoplasmocítica discreta	C
Animal 17	Buldogue francês	5	Fêmea castrada	Jejunite linfoplasmocítica discreta	C
Animal 18	Papillon	1	Macho castrado	Duodenite e colite linfoplasmocítica moderada	C

Legenda: SRD = sem raça definida; Trat = tratamento; A = grupo β-glucano; B = grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo.

4.2 AVALIAÇÃO FÍSICA, ESCORES DE SEVERIDADE DE ENTEROPATIA E CONCENTRAÇÃO FECAL DE ÁCIDO LÁTICO

Uma vez que os animais selecionados para o estudo estavam em fase controlada da doença, todos apresentaram, em média, escore fecal adequado (entre

3 e 4) e não houve diferença entre os tratamentos para esta variável. No entanto, houve diferença para um dos escores empregados para avaliação da severidade da enteropatia crônica (CIBDAI), para o qual observou-se efeito do tratamento na redução dos seus valores médios nos grupos A e B. Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos através do exame físico, questionário de escore de enteropatia (CIBDAI e CCECAI) e concentrações de ácido lático fecal dos grupos experimentais.

Todos os animais apresentaram ECC ideal (entre 4 e 5). Com relação a esta variável, observou-se efeito do tratamento de forma que a maior média correspondeu ao grupo A em comparação aos grupos B e C, os quais não diferiram entre si.

Tabela 7. Médias e erro padrão da média das variáveis peso, ECC, EMM, EF, CIBDAI, CCECAI e concentração de ácido lático fecal.

Variáveis	Tratamento			EPM	Valor de p		
	A	B	C		Tratamento	Tempo	Tratamento*tempo
Peso (kg)	15,19	15,45	10,70	4,159	0,6685	0,5678	0,1458
ECC (1-9)	5,91^{A}	4,91^{B}	4,83^{B}	0,229	**0,0076**	0,3555	0,7994
EMM (0-3)	3,00	2,83	2,75	0,177	0,1263	0,2900	0,6048
EF (0-5)	3,58	3,83	3,25	0,181	0,1039	0,1324	0,1837
CIBDAI	0,58^{B}	0,75^{B}	2,25^{A}	0,386	**0,0084**	0,3907	0,1939
CCECAI	1,75	1,50	2,66	0,696	0,4775	0,1940	0,1336
Ácido lático (mmol/L)	4,34	4,43	3,41	1,294	0,8273	0,5588	0,3345

Legenda: ECC = escore de condição corporal; EMM = escore de massa muscular; EF = escore fecal; CIBDAI = *Canine IBD activity index* ; CCECAI = *Canine chronic enteropathy clinical activity index* ;A = grupo β-glucano; B = grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo; EPM = erro padrão da média. Letras diferentes maiúsculas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

4.3 ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Em geral, nenhum animal apresentou alterações nessas avaliações que comprometessem a sua participação no estudo ou necessitasse de prescrição de fármacos que limitariam sua inclusão no projeto. Os animais do grupo A apresentaram, em média, concentrações de fosfatase alcalina, triglicérides e colesterol séricos acima do intervalo de referência para a espécie. No entanto, ao se comparar com os resultados encontrados nos outros dois grupos experimentais, não houve diferença para as duas primeiras variáveis. Já com relação ao resultado do colesterol, os animais do grupo A apresentaram média superior aos demais grupos, o grupo B média inferior e o grupo C valores intermediários, sem diferir de A e B. O grupo A foi o único que apresentou concentração média de folato acima do intervalo de referência, embora não fora observada diferença entre os grupos.

De forma similar, os grupos A e C apresentaram concentrações séricas de PCR superiores ao intervalo de referência para a espécie, sem diferir do grupo B.

A contagem de plaquetas também apresentou diferença entre os tratamentos, com valores médios maiores no grupo A, menores no grupo B e valores intermediários no grupo C, de forma que este não diferiu dos demais.

Nenhuma variável apresentou interação entre tempo e tratamento, com exceção dos monócitos (p=0,0226) cujas interações foram analisadas na sequência.

Com relação ao efeito do tempo dentro dos tratamentos, os cães do grupo C apresentaram valores médios de contagem de monócitos superiores no T60 (570,00±232,70/µL) em comparação ao T0 (366±149,72/µL) (p=0,0331). Já a relação do efeito dos tratamentos dentro do tempo evidenciou maiores contagens de monócitos no grupo A (832,67±339,94/µL) em relação aos grupos B (392,00±160,03/µL) e C (366,73±1/µL49,72) no T0 (p=0,0074) sem diferença entre B e C.

Tabela 8. Médias e erro padrão da média das variáveis bioquímicas, células leucocitárias e contagem de plaquetas dos três grupos experimentais.

Variáveis	Tratamento			EPM	Ref.[1]	Valor de p		
	A	B	C			Tratamento	Tempo	Tratamento*tempo
Albumina (g/dL)	3,92	4,12	3,56	0,176	2,3-3,8	0,1015	0,1082	0,8482
Proteína total (g/dL)	6,87	6,98	6,34	0,289	5,3-7,6	0,2744	0,4543	0,6651
ALT (U/L)	37,55	21,65	24,00	5,856	10-88	0,1513	0,1418	0,1880
Fosfatase Alcalina (U/L)	250,50	68,83	48,30	85,104	20-150	0,2143	0,6185	0,5766
Ureia (mg/dL)	32,60	29,40	39,27	4,835	20-40	0,3635	0,0265	0,1308
Creatinina (mg/dL)	0,92	1,01	0,83	0,072	0,7-1,4	0,2695	0,9872	0,8450
Triglicérides (mg/dL)	275,03	96,43	100,95	69,994	40-169	0,1381	0,9931	0,9888
Colesterol (mg/dL)	278,90[A]	164,69[B]	207,09[AB]	26,852	125-270	**0,0273**	0,9801	0,9469
Cobalamina (ng/L)	700,17	511,67	428,58	79,859	252-836[2]	0,0781	0,7180	0,9386
Folato (nmol/L)	45,58	35,50	35,00	5,559	7-39[2]	0,3420	0,1976	0,4427
PCR (mg/dL)	63,61	9,37	33,93	32,406	0-10	0,5108	0,1646	0,4455
Spec (ng/mL)	166,83	98,33	55,51	37,412	<200	0,1395	0,0494	0,1266
TLI (mcg/L)	30,66	24,25	21,41	4,918	9-50	0,4167	0,8689	0,0887
Leucócitos totais (/µL)	8.482,50	10.203,00	9.175,00	851,060	6.000-15.000	0,3679	0,4915	0,2606
Linfócitos (/µL)	1789,50	1679,42	2169,83	359,310	1.500-5.000	0,6064	0,9219	0,3593
Monócitos (/µL)	672,33	396,17	468,37	63,758	0-800	0,0129	0,6250	**0,0226**
Eosinófilos (/µL)	347,50	592,00	543,00	164,290	0-1.300	0,5512	0,5671	0,2877
Basófilo (/µL)	69,16	39,16	47,50	27,937	0-140	0,7394	0,5324	0,5025
Plaquetas (10^3/µL)	473,08[A]	289,67[B]	407,33[AB]	41,422	200-600	**0,0014**	0,4776	0,5747

Legenda: ALT = alanina aminotransferase; PCR = proteína C reativa; Spec = *canine pancreas-specific lipase*; TLI = *trypsin-like immunoreactivity*;A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C= placebo; EPM = erro padrão da média; [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008) exceto folato e cobalamina; [2]Valores de referência segundo Suchodolski; Steiner (2003); Letras diferentes maiúsculas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

4.4 MICROBIOTA FECAL

Após análise através da plataforma QIIME2 versão 2020.2, foram geradas 3.938.167 sequências após filtragem por qualidade, as quais foram agrupadas em unidades operacionais taxonômicas (OTUS) utilizando-se 97% de similaridade. O mínimo e o máximo de sequências geradas foram de 65.059 e 162.772, respectivamente, com média de 109.394 e desvio padrão de 2.2248,4. A contagem de sequências e OTUS está apresentada na Tabela 9 .

Tabela 9. Número de sequências e OTUS obtidas pelo sequenciamento Illumina.

Identificação	Contagem de sequências	OTUS
Animal 1 T0	105.844	35,90
Animal 1 T60	131.088	57,80
Animal 2 T0	65.059	48,00
Animal 2 T60	104.749	44,00
Animal 3 T0	110.638	69,50
Animal 3 T60	144.658	80,90
Animal 4 T0	85.409	67,00
Animal 4 T60	79.551	62,00
Animal 5 T0	142.148	61,40
Animal 5 T60	89.769	57,00
Animal 6 T0	121.824	36,00
Animal 6 T60	124.832	44,00
Animal 7 T0	111.440	40,00
Animal 7 T60	101.192	36,90
Animal 8 T0	110.333	62,00
Animal 8 T60	110.980	42,00
Animal 9 T0	119.911	61,70
Animal 9 T60	101.830	52,60
Animal 10 T0	90.467	80,00
Animal 10 T60	85.997	44,70
Animal 11 T0	111.667	60,80
Animal 11 T60	97.359	51,00
Animal 12 T0	103.108	34,00
Animal 12 T60	162.772	61,90
Animal 13 T0	77.636	41,00
Animal 13 T60	68.183	44,00
Animal 14 T0	108.772	43,90
Animal 14 T60	137.119	56,80
Animal 15 T0	95.151	40,90
Animal 15 T60	105.279	49,80
Animal 16 T0	103.612	32,00
Animal 16 T60	147.242	68,00
Animal17 T0	115.463	57,60
Animal17 T60	118.435	84,60
Animal 18 T0	110.553	52,90
Animal 18 T60	138.097	68,50

Legenda: OTU = *operacional taxa unit.*

4.4.1 Análise de filos

No total, dez filos foram identificados pelo sequenciamento nos três grupos experimentais. Destes, dois não foram caracterizados e três não foram representados em todos os momentos dos três tratamentos e, portanto, não entraram em análise estatística. Foram eles os filos Euryarchaeota, Chlorroflexi e Tenericutes.

Após a exclusão, cinco filos bacterianos foram analisados em todas as amostras, sendo que o filo Firmicutes apresentou a maior abundância relativa média (84%) e Bacteroidetes a menor (0,2%). O número total de informações sobre cada filo e o número médio de sequências por total de amostras estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Filos identificados pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e máximos (MÁX) das amostras de fezes dos grupos A, B e C.

FILO	N_INF	MÉDIA	DP	CV	MÍN	MÁX
Actinobacteria	35	0,1557	0,1944	124,8140	0,0001	0,6759
Bacteroidetes	26	0,0055	0,0172	313,2760	0,0001	0,0881
Firmicutes	36	0,8096	0,1894	23,3990	0,2430	0,9979
Fusobacteria	17	0,0045	0,0101	225,7320	0,0000	0,0403
Proteobacteria	36	0,0329	0,0602	182,8940	0,0001	0,2429

Legenda: A = grupo β-glucano; B = grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo.

A partir da contagem destes filos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) na qual o modelo utilizado apontou efeito significativo da interação dos fatores tempo (T0 e T60) e tratamento (A, B e C). O desdobramento das interações está descrito na Tabela 11.

Tabela 11. Porcentagem média de sequencias dos filos encontrados pelo sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60.

FILO	TRAT	T0		T60	
		% Média	EP	% Média	EP
Actinobacteria	A	$3,44^{Aa}$	3,82	$0,79^{Ab}$	0,91
	B	$5,92^{Aa}$	6,41	$4,31^{Ab}$	4,75
	C	$2,57^{Ab}$	2,88	$14,60^{Aa}$	14,33
Bacteroidetes	A	$0,11^{Ab}$	0,10	$0,31^{Aa}$	0,28
	B	$0,51^{Aa}$	0,46	$0,00^{Ab}$	0,00
	C	$0,11^{Aa}$	0,09	$0,10^{Aa}$	0,08

	A	84,58^{Ab}	5,63	90,69^{Aa}	3,65
Firmicutes	B	85,12^{Ab}	5,47	90,06^{Aa}	3,86
	C	88,79^{Aa}	4,30	66,34^{Ab}	9,64
	A	0,04^{Ab}	0,05	0,07^{Aa}	0,09
Fusobacteria	B	1,00^{Aa}	1,28	0,04^{Ab}	0,05
	C	0,00^{Ab}	0,00	0,08^{Aa}	0,09
	A	0,90^{Ab}	0,74	3,09^{Aa}	2,48
Proteobacteria	B	0,61^{Aa}	0,50	0,38^{ABb}	0,31
	C	0,55^{Aa}	0,45	0,06^{Bb}	0,05

Legenda: TRAT. = tratamento; A= grupo β-glucano; B=grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo. Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si e, médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

Para todos os filos houve efeito de interação entre tempo e tratamento, na qual a dinâmica dos tratamentos se desenvolveu de forma distinta de acordo com o tempo de suplementação.

Com relação ao filo Actinobacteria, houve redução das suas populações nos grupos A e B (-7% e -5%, respectivamente) e aumento no grupo C (468%).

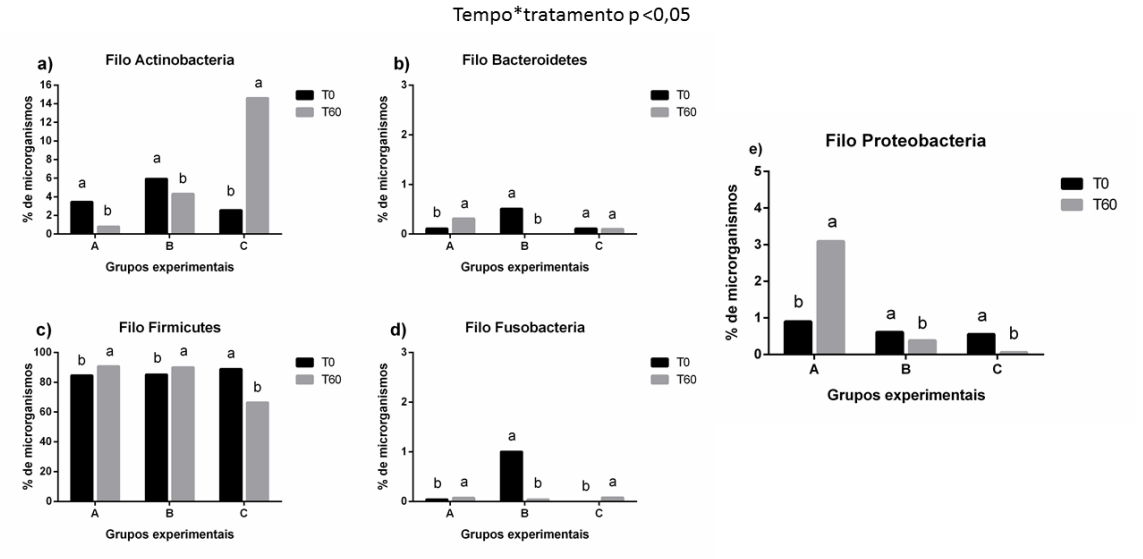
Com relação ao filo Bacteroidetes, as suas populações aumentaram no tratamento A (182%), reduziram no B (-100%) e não apresentaram diferenças no C.

Com relação ao filo Firmicutes, nos tratamentos A e B observou-se aumento de sua população (7% e 6%, respectivamente), enquanto no tratamento C houve redução (-25%). Já com relação ao filo Fusobacteria, observou-se aumento nos grupos A e C (75% e 8%, respectivamente) e redução no grupo B (-96%). Por fim, para o filo Proteobacteria, o tratamento A resultou no aumento de suas populações (243%), enquanto os tratamentos B e C as reduziram (-38% e -89%, respectivamente). De forma geral, é possível concluir ainda que, para os filos Fusobacteria e Proteobacteria os tratamentos A e B, respectivamente, se comportaram de forma igual ao placebo.

Por outro lado, quando avaliado o efeito do tratamento dentro de cada tempo, para todos os filos, exceto Proteobacteria, não foram observadas diferenças entre os grupos. Por sua vez, o filo Proteobacteria reduziu significativamente no T60 do tratamento B.

A Figura 4 ilustra a porcentagem de microrganismos de cada filo nos tempos estudados.

Figura 4. Porcentagem de microrganismos dos filos Actinobacteria (a), Bacteroidetes (b), Firmicutes (c), Fusobacteria (d) e Proteobacteria (e) nos tempos experimentais T0 e T60.



Médias com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (p<0,05); A= grupo β-glucano; B= *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo.

4.4.2 Análise de classes

No total, 17 classes bacterianas foram identificadas pelo sequenciamento das amostras dos três grupos experimentais. Destas, duas não foram caracterizadas e sete não foram representadas em todos os momentos dos tres tratamentos e, portanto, não entraram em análise estatística. Foram elas as classes Methanobacteria, Nitriliruptoria, Anaerolinae, Alphaproteobacteria, Betaproteopacteria, Epsilonproteobacteria e Mollicutes.

Após a exclusão, oito classes bacterianas foram analisadas, sendo que a Clostridia apresentou a maior abundância relativa média (38%) e a Actinobacteria, a menor (0,08%). O número total de informações sobre cada classe e o número médio de sequências por total de amostras estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Classes identificadas pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e máximos (MÁX).

CLASSE	N_INF	MÉDIA	DP	CV	MÍN	MÁX
Actinobacteria	29	0,0124	0,0340	272,98	0,0000	0,1501
Coriobacteriia	32	0,1590	0,1944	122,22	0,0001	0,6758
Bacteroidia	26	0,0055	0,0172	313,28	0,0001	0,0881
Bacilli	35	0,3928	0,2944	74,96	0,0004	0,9029
Clostridia	36	0,4021	0,2334	58,04	0,0654	0,9739

Erysipelotrichi	34	0,0272	0,0799	294,40	0,0001	0,4601
Fusobacteriia	17	0,0045	0,0101	225,73	0,0000	0,0403
Gammaproteobacteria	34	0,0347	0,0615	177,39	0,0001	0,2429

Após a eliminação dos valores iguais a zero e realização de análise de variância (ANOVA), o modelo utilizado apontou efeito de interação dos fatores tempo (T0 e T60) e tratamento (A, B e C). O desdobramento das interações está descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Porcentagem média de sequencias das classes encontradas por meio do sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60.

CLASSES		**TRAT**	**T0**		**T60**	
			% Média	EP	% Média	EP
Actinobacteria						
		A	0,13^{Aa}	0,12	0,03^{Ab}	0,03
	Actinobacteria	B	0,10^{Aa}	0,10	0,00^{Ab}	0,00
		C	0,04^{Ab}	0,04	0,18^{Aa}	0,17
		A	1,15^{Ab}	1,59	1,81^{Aa}	2,47
	Coriobacteriia	B	1,92^{Aa}	2,42	1,45^{Ab}	1,83
		C	3,01^{Ab}	4,05	12,41^{Aa}	15,10
Bacteroidetes						
		A	0,11^{Ab}	0,10	0,31^{Aa}	0,28
	Bacteroidia	B	0,51^{Aa}	0,46	0,00^{Ab}	0,00
		C	0,11^{Aa}	0,09	0,10^{Aa}	0,08
Firmicutes						
		A	40,63^{Ab}	15,52	43,10^{Aa}	15,78
	Bacilli	B	8,58^{Ab}	4,67	51,86^{Aa}	14,87
		C	46,29^{Aa}	15,99	25,53^{Ab}	12,23
		A	27,46^{Bb}	5,13	36,53^{Aa}	5,97
	Clostridia	B	58,07^{Aa}	5,81	33,77^{Ab}	5,33
		C	38,92^{ABa}	6,12	33,96^{Ab}	5,78
		A	1,50^{Aa}	0,99	0,33^{ABb}	0,22
	Erysipelotrichi	B	0,34^{Aa}	0,22	0,09^{Bb}	0,06
		C	0,98^{Ab}	0,65	2,57^{Aa}	1,69
Fusobacteria						
		A	0,04^{Ab}	0,05	0,07^{Aa}	0,09
	Fusobacteriia	B	1,00^{Aa}	1,28	0,04^{ab}	0,05
		C	0,00^{Ab}	0,00	0,08^{Aa}	0,09
Proteobacteria						
		A	0,86^{Ab}	0,71	2,95^{Aa}	2,39
	Gammaproteobacteria	B	0,59^{Aa}	0,46	0,38^{Ab}	0,29
		C	0,52^{Aa}	0,43	0,07^{Ab}	0,06

Legenda: TRAT. = tratamento; A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C= placebo. Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si e, médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

Para todas as classes houve efeito de interação entre tempo e tratamento, na qual a dinâmica dos tratamentos se desenvolveu de forma distinta de acordo com o tempo de suplementação, de forma que a classe Actinobacteria se comportou em conformidade com seu filo, ou seja, as suas populações reduziram ao longo do tempo nos tratamentos A e B (-77% e -100%, respectivamente) e, aumentaram no tratamento C (350%).

Já a classe Coriobacteria, também pertencente ao filo Actinobacteria, por sua vez, apresentou aumento das suas populações nos tratamentos A e C (57% e 312%, respectivamente), ou seja, o tratamento A se comportou de forma igual ao placebo e estas populações reduziram com o tratamento B (-24%). Portanto, o tratamento B foi o único capaz de interferir nas concentrações desta classe bacteriana ao longo do tempo.

A classe Bacteroidia também se comportou em conformidade com o seu filo Bacteroidetes, com aumento da população no tratamento A (182%), redução no B (100%) e sem alterações no C.

A classe Bacilli também se comportou em conformidade com seu filo Firmicutes, com aumento da sua população nos tratamentos A e B (6% e 504%, respectivamente) e redução no tratamento C (-45%). Por outro lado, para a classe Clostridia, o mesmo não ocorreu, ou seja, as suas populações aumentaram somente no tratamento A (33%), enquanto o tratamento B comportou-se de forma igual ao controle (tratamento C) com redução das suas populações (-42% e -13%, respectivamente). Ainda com relação às classes pertencentes ao filo Firmicutes, a população da classe Erysipelotrichi foi controlada/reduzida com os tratamentos A e B (-78% e -73%, respectivamente). Já com o tratamento C, ela aumentou (162%).

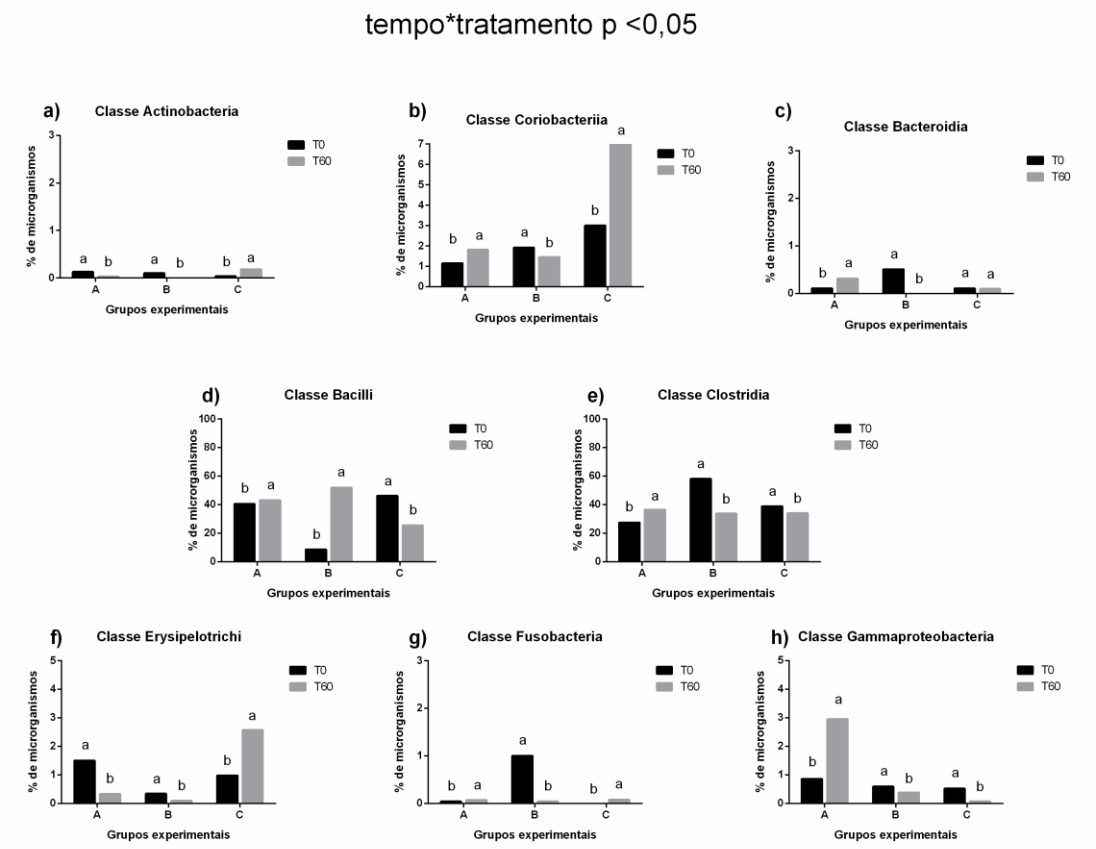
Com relação a classe Fusobacteriia, houve aumento das suas populações ao longo do tempo nos tratamentos A e C (75% e 8%, respectivamente), de forma que o tratamento A se comportou de forma igual ao placebo e, observou-se redução dessa classe bacteriana com o tratamento B (-96%).

Por fim, as bactérias da classe Gammaproteobacteria comportaram-se em concordância com o filo Proteobacteria, aumentando as suas populações com o tratamento A (243%) e reduzindo com o tratamento B e C (-36% e -86%, respectivamente), de forma que o tratamento B não diferiu do tratamento C ao longo do tempo.

Em última análise, não foram observadas diferenças com relação ao comportamento dos tratamentos dentro de cada tempo para todas as interações, com exceção da classe Clostridia onde, no tempo T0, os animais do grupo B apresentaram maiores populações desta bactéria e os do grupo A, apresentaram menores populações. O grupo C não diferiu dos demais para esta variável. Outra diferença nesta interação foi observada na classe Erysipelotrichi onde, as suas concentrações foram maiores no tratamento C, menores no tratamento B e apresentou valores intermediários no tratamento A sem diferir de B e C.

A Figura 5 ilustra a porcentagem de microrganismos de cada classe nos tempos estudados.

Figura 5. Porcentagem de microrganismos das classes Actinobacteria (a), Coriobacteriia (b), Bacteroidia (c), Bacilli (d), Clostridia (e), Erysipelotrichi (F), Fusobacteria (g) e Gammaproteobacteria (h) nos tempos experimentais T0 e T60.



Médias com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (p<0,05); A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo.

4.4.3 Análise de famílias

Um total de 48 famílias foram identificadas pelo sequenciamento das amostras dos três grupos experimentais. Destas, cinco não foram caracterizadas e 32 não foram

representadas em todos os momentos dos três tratamentos e, portanto, não entraram em análise estatística. Foram elas as famílias Brevibacteriaceae, Corynebacteriaceae, Dermabacteraceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Bifidobacteriaceae, Euzebyaceae, Paraprevotellaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Anaerolinaceae, Bacillaceae, Staphylococcaceae, Gemellaceae, Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, Turicibacteraceae, Mogibacteriacea, Tissierellaceae, Eubacteriaceae, Peptococcaceae, Veillonellaceae, Methylobacteriaceae, Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Campylobacteraceae, Succinivibrionaceae, Moraxellaceae e Mycoplasmataceae.

Após a exclusão, 13 famílias bacterianas foram analisadas, sendo que a família Lachnospiraceae apresentou a maior abundância relativa média (24%) e a Pseudomonadaceae a menor (0,01%). O número total de informações sobre cada filo e o número médio de sequências por total de amostras estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Famílias identificadas pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e valores máximos (MAX).

FAMÍLIAS	N_INF	MÉDIA	DP	CV	MIN	MAX
Actinobacteria						
Actinomycetaceae	22	0,0002	0,0003	114,5770	0,0000	0,0010
Coriobacteriaceae	32	0,1590	0,1944	122,2190	0,0001	0,6758
Bacteroidetes						
Bacteroidaceae	23	0,0035	0,0077	219,9770	0,0000	0,0353
Firmicutes						
Enterococcaceae	22	0,0829	0,1902	229,3470	0,0001	0,6713
Streptococcaceae	35	0,3017	0,3097	102,6660	0,0002	0,9019
Clostridiaceae	36	0,0986	0,1406	142,5350	0,0001	0,5948
Lachnospiraceae	36	0,2808	0,2240	79,7810	0,0061	0,8970
Peptostreptococcaceae	25	0,0289	0,0591	204,2970	0,0001	0,2743
Ruminococcaceae	19	0,0011	0,0023	209,9470	0,0000	0,0100
Erysipelotrichaceae	34	0,0272	0,0799	294,3970	0,0001	0,4601
Fusobacteriaceae	17	0,0045	0,0101	225,7320	0,0000	0,0403
Enterobacteriaceae	32	0,0367	0,0628	171,0930	0,0000	0,2422
Pseudomonadaceae	26	0,0002	0,0002	107,9700	0,0000	0,0007

Após a eliminação dos valores iguais a zero e realização de análise de variância (ANOVA), o modelo utilizado apontou efeito da interação dos fatores tempo (T0 e T60) e tratamento (A, B e C). O desdobramento das interações está descrito na Tabela 15.

Tabela 15. Porcentagem média de sequências de famílias identificadas pelo sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60.

FAMÍLIAS		TRAT	T0		T60	
			% Média	EP	% Média	EP
Actinobacteria						
		A	0,01^{Aa}	0,00	0,03^{Aa}	0,01
	Actinomycetaceae	B	0,02^{Aa}	0,01	0,01^{Ab}	0,00
		C	0,02^{Aa}	0,01	0,01^{Aa}	0,01
		A	1,16^{Ab}	1,73	1,82^{Aa}	2,69
	Coriobacteriaceae	B	1,93^{Aa}	2,64	1,45^{Ab}	2,00
		C	3,08^{Ab}	4,51	12,69^{Aa}	16,71
Bacteroidetes						
		A	0,12^{Ab}	0,12	0,37^{Aa}	0,35
	Bacteroidaceae	B	0,35^{Aa}	0,33	0,01^{Ab}	0,01
		C	0,05^{Ab}	0,05	0,05^{Aa}	0,05
		A	0,01^{Ab}	0,01	0,52^{Aa}	0,83
	Enterococcaceae	B	0,43^{Aa}	0,89	0,13^{Aa}	0,33
		C	3,93^{Aa}	5,59	0,55^{Ab}	0,81
		A	7,90^{Aa}	8,14	3,71^{Ab}	4,00
	Streptococcaceae	B	4,75^{Ab}	4,68	51,24^{Aa}	25,86
		C	35,64^{Aa}	25,65	9,57^{Ab}	9,68
		A	2,95^{Aa}	2,53	2,18^{Ab}	1,88
	Clostridiaceae	B	1,23^{Ab}	0,99	4,06^{Aa}	3,19
		C	2,91^{Ab}	2,50	6,40^{Aa}	5,30
		A	19,38^{Ab}	7,07	29,09^{Aa}	9,33
	Lachnospiraceae	B	50,05^{Aa}	10,47	15,16^{Ab}	5,39
		C	20,55^{Aa}	7,39	12,71^{Ab}	5,02
		A	0,85^{Ab}	0,82	1,13^{Aa}	1,08
	Peptostreptococcaceae	B	0,74^{Aa}	0,71	0,06^{Ab}	0,06
		C	0,55^{Aa}	0,58	0,06^{Ab}	0,06
		A	0,03^{Aa}	0,02	0,02^{Aa}	0,01
	Ruminococcaceae	B	0,18^{Aa}	0,13	0,01^{Ab}	0,00
		C	0,04^{Aa}	0,04	0,05^{Aa}	0,04
		A	1,50^{Aa}	1,08	0,33^{ABb}	0,24
	Erysipelotrichaceae	B	0,35^{Aa}	0,24	0,09^{Bb}	0,06
		C	0,98^{Ab}	0,71	2,57^{Aa}	1,83
		A	0,04^{Ab}	0,06	0,07^{Aa}	0,11
	Fusobacteriaceae	B	1,00^{Aa}	1,53	0,04^{Ab}	0,06
		C	0,00^{Aa}	0,01	0,08^{Ab}	0,10
		A	0,85^{Ab}	0,83	2,93^{Ab}	2,82
	Enterobacteriaceae	B	0,45^{Aa}	0,41	0,29^{Ab}	0,27
		C	0,46^{Aa}	0,45	0,07^{Ab}	0,06
		A	0,01^{Ab}	0,00	0,02^{Aa}	0,01
	Pseudomonadaceae	B	0,02^{Aa}	0,01	0,01^{Aa}	0,01
		C	0,01^{Aa}	0,00	0,01^{Aa}	0,00

Legenda: TRAT. = tratamento; A= grupo β-glucano; B=grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo. Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si e, médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

Para todas as famílias houve efeito de interação entre tempo e tratamento, na qual a dinâmica dos tratamentos se desenvolveu de forma distinta de acordo com o tempo de suplementação de forma que, não houve diferença na população de Actinomycetaceae nos tratamentos A e C ao longo do tempo e, o tratamento A se comportou de forma igual ao placebo. Por outro lado, no tratamento B observou-se redução da população desta família ao longo do tempo (-50%).

As populações de Coriobacteriaceae e Fusobacteriaceae comportaram-se de forma equivalente, de modo que as bactérias de ambas aumentaram ao longo do tempo nos tratamentos A (132% e 75%, respectivamente) e C (312% e 8%). O tratamento A resultou em mesmo efeito que o placebo e, o tratamento B resultou na redução das populações de ambas as famílias (-25% e – 96%, respectivamente).

Com relação a família Bacteroidaceae, observou-se aumento de sua população no tratamento A (208%), redução no tratamento B (-97%) e ausência de mudanças no tratamento C.

Com relação a família Streptococcaceae, observou-se redução das bactérias nos tratamentos A e C (-53% e -73%, respectivamente), de forma que o tratamento A se comportou igual ao placebo e houve aumento desta família com o tratamento B (978%).

A população da família Clostridiaceae reduziu com o tratamento A (-26%) e aumentaram com os tratamentos B e C (230% e 120%), de forma que, neste caso, o tratamento B se comportou de forma igual ao placebo para esse táxon.

Com relação às famílias Lachnospiraceae, Peptostreptococcaceae e Enterobacteriaceae, observou-se aumento das populações com o tratamento A (50%, 33% e 245%, respectivamente) e redução com os tratamentos B e C (-70%, -92% e -35%), de forma que o tratamento B se comportou de forma igual ao placebo.

Já para a família Ruminococcaceae, o tratamento A não interferiu na sua população assim como o placebo. Entretanto, o tratamento B (-94%) reduziu a população ao longo do tempo.

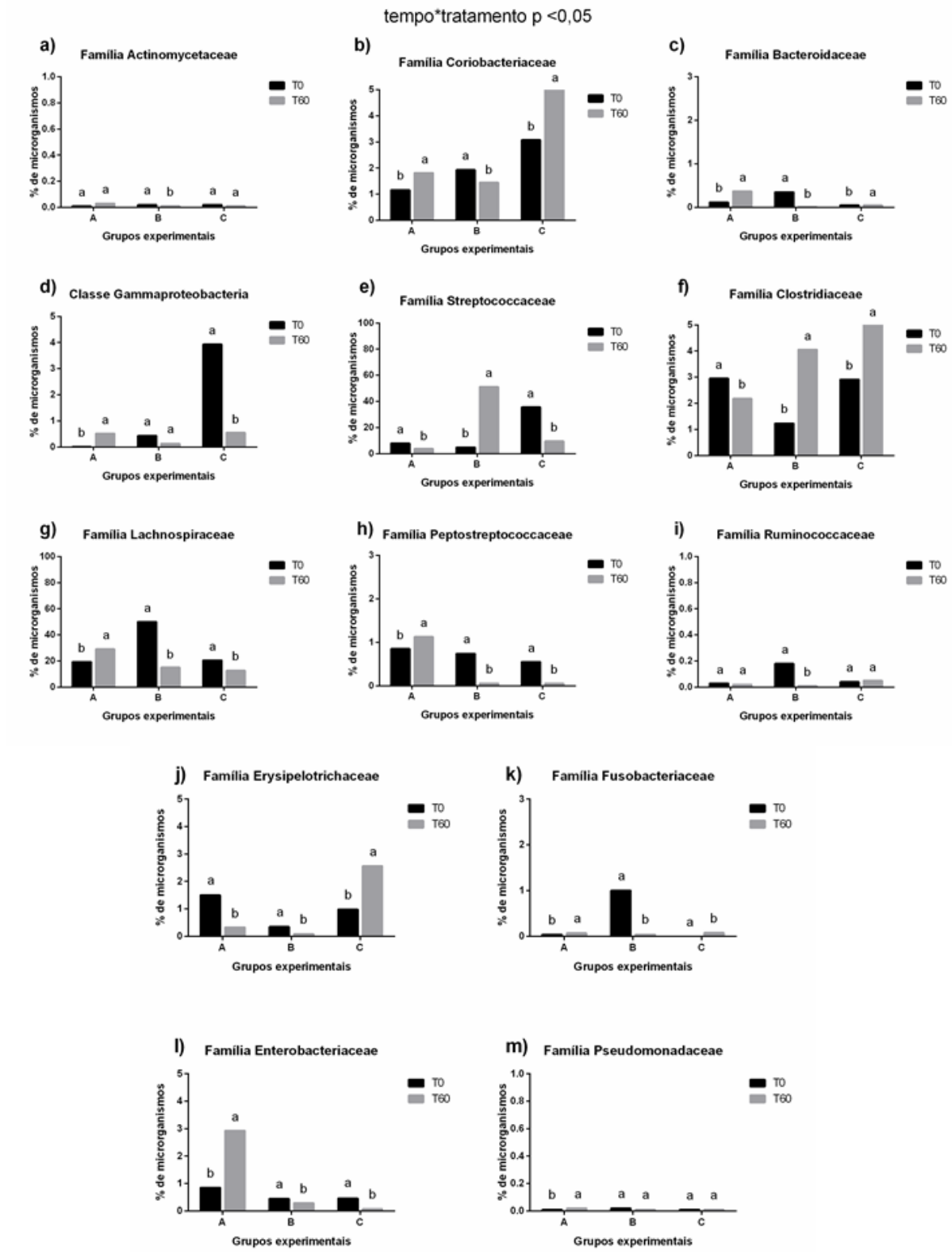
A população de Erysipelotrichaceae foi influenciada pelos tratamentos com prebióticos (A e B) de forma que estes reduziram estes microrganismos (-74% e -78%, respectivamente), mas o contrário ocorreu para o tratamento C onde observou-se aumento (162%).

Por fim, com relação à família Pseudomonadaceae, o tratamento A aumentou a sua população bacteriana ao longo do tempo (100%), enquanto os tratamentos B e C não interferiram nesta população ao longo do tempo, de forma que B apresentou o mesmo comportamento que o placebo.

Em análise final, com relação ao comportamento dos tratamentos dentro de cada tempo, não foram observadas diferenças em todas as interações, com exceção ao comportamento do tratamento para a família Erysipelotrichaceae no tempo T60, o qual apresentou valores intermediários entre os tratamentos B e C sem diferir de ambos.

A Figura 6 ilustra a porcentagem de microrganismos de cada família nos tempos estudados.

Figura 6. Porcentagem de microrganismos das famílias Actinomycetaceae (a), Coriobacteriaceae (b), Bacteroidaceae (c), Gammaproteobacteroidaceae (d), Streptococcaceae (e), Clostridiaceae (f), Lachnospiraceae (g), Peptostreptococcaceae (h), Ruminococcaceae (i), Erysipelotrichaceae (j), Fusobacteriaceae (k), Enterobacteriaceae (l) e Pseudomonadaceae (m) nos tempos experimentais T0 e T60.



Médias com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($p<0,05$); A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo.

4.4.4 Análise de gêneros

Um total de 101 gêneros foram identificadas pelo sequenciamento das amostras dos três grupos experimentais. Destes, 21 não foram caracterizados e não foram representados em todos os tempos e tratamentos e, portanto, foram excluídos da análise estatística. Outros 65 gêneros identificados também não foram representados em todos os tempos e tratamentos e, por isso, a comparação estatística não foi possível e assim foram retirados da análise. A população total dos gêneros sequenciados pode ser observada na Figura 14 (Anexo A).

Após a exclusão, 15 gêneros apresentaram valores válidos nos grupos para entrar em análise de modo que o gênero Streptococcus apresentou a maior abundância relativa média (18%) e o gênero Pseudomonas a menor (0,01%).

O número total de informações sobre cada gênero e o número médio de sequências por total de amostras estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Gêneros identificados pelo sequenciamento Illumina, número de informações válidas (N_INF), média de sequências encontradas (MÉDIA) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MÍN) e máximos (MÁX).

GÊNERO	N_INF	MÉDIA	DP	CV	MÍN	MÁX
Actinobacteria						
Actinomyces	22	0,0002	0,0003	110,7360	0,0000	0,0009
Collinsella	32	0,1554	0,1950	125,5160	0,0001	0,6758
Bacteroidetes						
Bacteroides	23	0,0035	0,0077	219,9770	0,0000	0,0353
Firmicutes						
Enterococcus	21	0,0835	0,1878	224,9230	0,0001	0,6602
Streptococcus	35	0,3016	0,3099	102,7460	0,0002	0,9019
Clostridium	35	0,0911	0,1394	153,0150	0,0002	0,5933
Lachnospiraceae;__	20	0,0019	0,0016	84,8390	0,0003	0,0061
f__Lachnospiraceae;g__	30	0,0050	0,0054	109,4270	0,0002	0,0189
Blautia	36	0,1665	0,1694	101,7830	0,0034	0,7602
Dorea	34	0,0444	0,0526	118,6660	0,0011	0,2083
Ruminococcus	36	0,0627	0,1086	173,1490	0,0015	0,5438
Peptostreptococcaceae;__	19	0,0122	0,0189	154,5920	0,0001	0,0636
f__Erysipelotrichaceae;g__*Clostridium*	22	0,0066	0,0085	129,8150	0,0001	0,0267
[Eubacterium]	28	0,0015	0,0022	147,2700	0,0000	0,0077
f__Enterobacteriaceae;__	32	0,0367	0,0627	171,0640	0,0000	0,2422
Pseudomonas	*25*	*0,0002*	*0,0002*	*106,4030*	*0,0000*	*0,0007*

Após a eliminação dos valores iguais a zero e realização de análise de variância (ANOVA), o modelo utilizado apontou efeito significativo da interação dos fatores

tempo (T0 e T60) e tratamento (A, B e C). O desdobramento das interações está descrito na Tabela 17.

Tabela 17. Porcentagem média de sequências de gêneros identificados pelo sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.

GÊNERO	TRAT.	T0		T60	
		% Média	EP	% Média	EP
Actinobacteria					
	A	0,01^{Aa}	0,00	0,03^{Aa}	0,01
Actinomyces	B	0,02^{Aa}	0,01	0,01^{Ab}	0,00
	C	0,02^{Aa}	0,01	0,01^{Aa}	0,01
	A	0,71^{Ab}	1,07	0,96^{Aa}	1,44
Collinsella	B	1,86^{Aa}	2,56	1,41^{Ab}	1,95
	C	3,06^{Ab}	4,50	12,48^{Aa}	16,55
Bacteroidetes					
	A	0,12^{Ab}	0,12	0,37^{Aa}	0,35
Bacteroides	B	0,35^{Aa}	0,33	0,01^{Ab}	0,01
	C	0,05^{Aa}	0,05	0,05^{Aa}	0,05
Firmicutes					
	A	0,02^{Ab}	0,03	1,16^{Aa}	2,06
Enterococcus	B	0,40^{Aa}	0,83	0,12^{Aa}	0,31
	C	3,68^{Aa}	5,20	0,49^{Ab}	0,71
	A	7,30^{Aa}	7,67	3,39^{Ab}	3,72
Streptococcus	B	4,75^{Ab}	4,75	51,24^{Aa}	26,22
	C	35,64^{Aa}	26,00	9,57^{Ab}	9,81
	A	1,79^{Ab}	1,55	1,93^{Aa}	1,68
Clostridium	B	1,06^{Ab}	0,86	3,51^{Aa}	2,78
	C	2,29^{Ab}	1,98	6,51^{Aa}	5,39
	A	0,08^{Ab}	0,03	0,17^{Aa}	0,07
f__Lachnospiraceae;__	B	0,19^{Aa}	0,11	0,11^{Aa}	0,08
	C	0,07^{Aa}	0,04	0,09^{Aa}	0,05
	A	0,15^{Ab}	0,07	0,25^{Aa}	0,12
f__Lachnospiraceae;g__	B	1,07^{Aa}	0,47	0,24^{Ab}	0,11
	C	0,18^{Ab}	0,10	0,21^{Aa}	0,12
	A	12,16^{Ab}	4,78	13,66^{Aa}	5,28
Blautia	B	32,57^{Aa}	9,11	6,38^{Ab}	2,48
	C	8,62^{Aa}	3,53	7,76^{Ab}	3,21
	A	1,35^{Ab}	0,66	6,84^{Aa}	3,18
Dorea	B	4,30^{Aa}	2,05	3,95^{Ab}	1,89
	C	1,86^{Aa}	0,91	1,57^{Ab}	0,77
	A	1,92^{Ab}	1,15	5,44^{Aa}	3,14
Ruminococcus	B	5,17^{Aa}	2,77	2,81^{Ab}	1,54
	C	3,84^{Aa}	2,25	0,69^{Ab}	0,42
	A	1,36^{Aa}	1,55	0,20^{Ab}	0,23
f__Peptostreptococcaceae;__	B	0,29^{Aa}	0,27	0,05^{Ab}	0,05

	C	0,37^{Aa}	0,49	0,21^{Ab}	0,27
	A	0,06^{Ab}	0,04	0,13^{Aa}	0,08
Eubacterium	**B**	0,09^{Aa}	0,05	0,02^{Ab}	0,01
	C	0,05^{Ab}	0,03	0,08^{Aa}	0,05
	A	0,85^{Ab}	0,83	2,93^{Aa}	2,82
f__Enterobacteriaceae;__	**B**	0,45^{Aa}	0,41	0,29^{Ab}	0,27
	C	0,46^{Aa}	0,45	0,07^{Ab}	0,06
	A	0,01^{Ab}	0,00	0,02^{Aa}	0,01
Pseudomonas	**B**	0,02^{Aa}	0,01	0,01^{Aa}	0,01
	C	0,01^{Aa}	0,00	0,01^{Aa}	0,00

Legenda: TRAT. = tratamento; A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo. Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si e médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

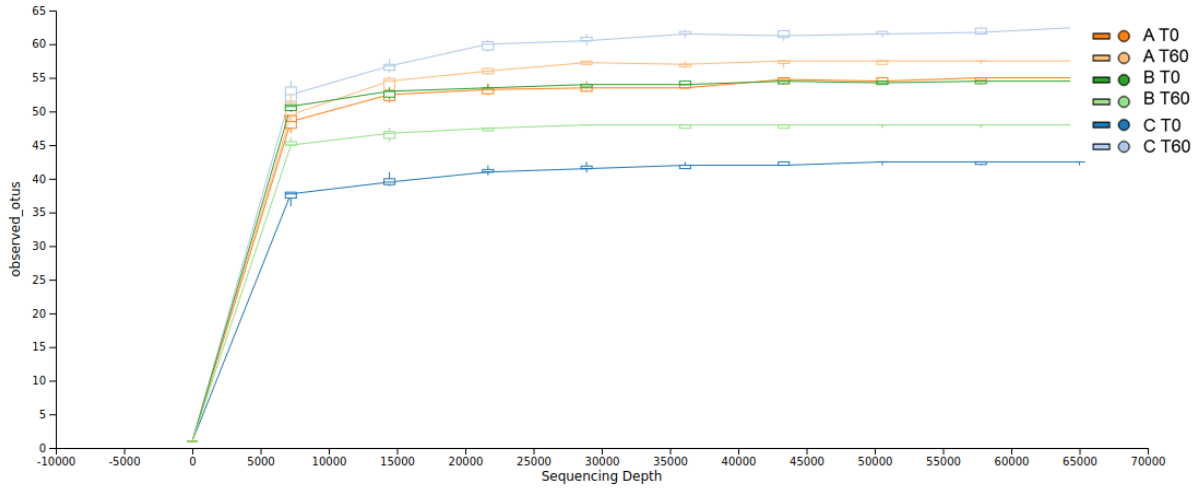
4.4.5 Índices de diversidade

As medidas ecológicas de alfa e beta diversidade estão descritas a seguir.

Com relação a alfa-diversidade, a Figura 7 ilustra as curvas de rarefação construídas ao nível de 97% de similaridade e indica o esforço do sequenciamento, que tendeu à estabilização com, aproximadamente, 10000 leituras e indica que o esforço amostral foi suficiente para a avaliação da comunidade bacteriana nos momentos avaliados.

É possível observar ainda, que existem diferenças no número de OTUS identificados para cada grupo, de forma que as amostras do grupo C apresentaram menor diversidade e as amostras dos grupos A e B, maior diversidade de OTUS. Essas diferenças foram avaliadas de forma mais aprofundada a partir do Shannon Index, o qual avalia tanto a abundância quanto a equitatividade da população bacteriana. Os seus valores foram comparados entre os grupos experimentais e a análise está descrita na Tabela 18.

Figura 7. Diversidade alfa - curva de rarefação das unidades operacionais taxonômicas (*observed_otus*) em função do número de ciclos de sequenciamento dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60.



Legenda: A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C= placebo.

Tabela 18. Média e erro padrão da média (EP) do índice de alfa-diversidade Shannon dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60.

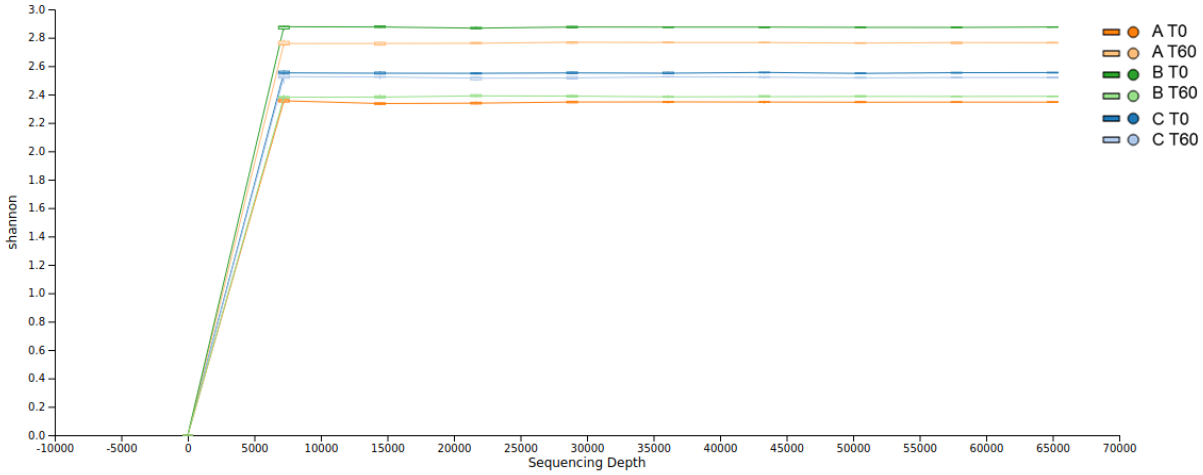
		Tempo			
	TRAT	**T0**		**T60**	
		Média	**EP**	**Média**	**EP**
	A	2,34^{Ab}	0,28	2,87^{Aa}	0,28
Shannon Index	**B**	2,64^{Aa}	0,28	2,29^{Aa}	0,28
	C	2,48^{Aa}	0,28	2,72^{Aa}	0,28

Legenda: TRAT. = tratamento; A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo. Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si e médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

A análise do índice de alfa-diversidade Shannon demonstrou interação entre tempo e tratamento ($p<0,05$). Ao desdobramento, somente o tratamento A produziu aumento dos valores médios desta variável, ou seja, que o consumo de 0,1% de β-glucano durante 60 dias aumentou a diversidade e a equidade microbiana.

Os resultados desta variável também se encontram ilustrados na Figura 8.

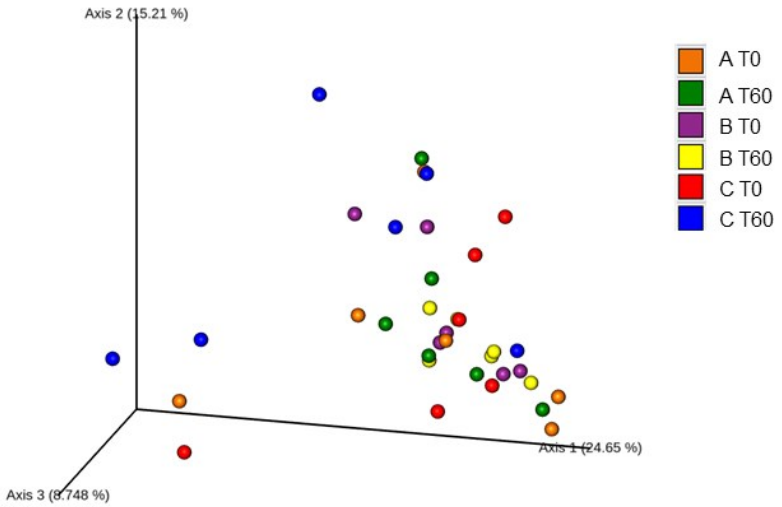
Figura 8. Índice de diversidade Shannon em função do número de ciclos de sequenciamento dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.



Legenda: A= grupo β-glucano; B=grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo.

A beta diversidade, por sua vez, avaliada por meio de análise de coordenadas principais (PCoA) 3D realizada pelo programa QIIME (Figura 9), demonstrou tendência ao agrupamento dos tratamentos experimentais no mesmo eixo e, portanto, pouca variação taxonômica entre os ambientes intestinais estudados, justificável pelo fato dos animais avaliados serem da mesma espécie, possuírem a mesma doença e em fase controlada, bem como sob consumo da mesma dieta.

Figura 9. Análise tridimensional de componentes principais com os dados absolutos obtidos pelo sequenciamento das amostras dos três grupos experimentais.



Legenda: A= grupo β-glucano; B= grupo *blend* (MOS + β-glucanos); C = placebo.

5 DISCUSSÃO

Todos os animais selecionados apresentavam, mesmo que em grau leve, inflamação de ao menos uma porção do trato gastrintestinal superior, a qual está diretamente relacionada com as manifestações clínicas de êmese e diarreia mal absortiva e, por consequência, relacionada à perda de peso (DAVENPORT; JERGENS; REMILLARD, 2010).

Apesar de haver variação dos escores de enteropatia crônica entre os animais incluídos no estudo, é possível concluir que todos estavam em fase controlada da doença conforme critério de inclusão, ou seja, não apresentavam perda de peso expressiva ao longo do período experimental, apresentaram escore fecal, ECC e EMM ideais.

De acordo com Laflamme, (1997), a classificação do ECC define que os escores 4 e 5 são considerados ideais para cães e, portanto, todos os animais dos três grupos apresentavam condição corporal ideal mesmo que houvessem diferenças entre os tratamentos.

Com relação ao escore de massa muscular, os animais geriátricos incluídos apresentaram, no máximo, perda leve de musculatura. Entretanto, de acordo com o quadro geral, esta perda provavelmente está associada ao processo de sarcopenia, ou seja, a perda fisiológica de musculatura decorrente do avanço da idade em virtude do aumento do *turnover* proteico (FREEMAN, 2012).

Durante muito tempo a literatura científica mostrou dificuldades em definir se existia ou não correlação entre o grau de lesão de mucosa e os sinais clínicos apresentados pelo indivíduo com DII. Para retificar esta problemática, os escores de enteropatia crônica foram criados (ALLENSPACH et al., 2019).

De acordo com a classificação do CIBDAI, notas no intervalo de 0 a 3 são classificadas como “doença inflamatória intestinal clinicamente insignificante”, ou seja, apesar do grupo C apresentar escores superiores aos demais grupos, não havia diferença clínica entre os animais dos três grupos, pois a média das pontuações as incluía no mesmo intervalo. Tais conclusões podem ser ainda respaldadas pelos resultados do escore CCECAI, o qual adiciona na sua classificação informações referentes às concentrações séricas de albumina, presença ou não de ascite e graduação de prurido cutâneo. De acordo com este escore, notas de 0 a 3 também

são classificadas como “doença inflamatória intestinal clinicamente insignificante” e, além de não haver diferença entre os grupos para esta variável, os resultados médios deste escore ficaram entre 0 e 3 (JERGENS et al., 2003; ALLENSPACH et al., 2019).

Em estudo recentemente publicado, Mehain et al. (2019) observaram que a concentração média de componentes plaquetários pode estar associada a maiores índices de atividade de enteropatia crônica em cães (CCECAI). Os autores consideraram a possibilidade de utilizar os índices plaquetários como biomarcadores da DII, uma vez que a ativação plaquetária está associada a processos inflamatórios e à existência de evidências que associam estes fatores na medicina humana. Entretanto, em função da homogeneidade dos grupos deste estudo, os quais apresentaram em média a mesma classificação de atividade de enteropatia de acordo com o CCECAI e CIBDAI, essa relação não seria observada. Ainda, é importante ressaltar que, mesmo em face das diferenças entre os grupos, os valores para esta variável ainda se encontraram dentro do intervalo de referência e os estudos a este respeito desenvolvidos com cães apresentaram resultados conflitantes (RIDGWAY; JERGENS; NIYO, 2001; MARCHETTI et al., 2010; MEHAIN; HAINES; LEE, 2019). Portanto, a diferença pode refletir simplesmente uma variação individual dos pacientes.

Comportamento similar também foi observado para as concentrações séricas de colesterol onde, observamos diferenças entre os grupos, embora sem significado clínico importante, exceto para uma paciente do grupo A que apresentava hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia grave (>750mg/dL e >1000mg/dL, respectivamente) (FELDMAN et al., 2014) e a sua inclusão elevou a média para este grupo. Esta paciente foi devidamente tratada com hipolipemiante da família dos fibratos para que pudesse permanecer no estudo.

Em humanos, a dislipidemia é o achado mais comum entre os pacientes com DII (AGOURIDIS; MOSES; MILIONIS, 2011). Esta alteração é justificada pela intensa elevação de citocinas inflamatórias como TNF-α, interferon C e interleucina-1 que inibem a ação da enzima lipoproteína lipase (SAPPATI BIYYANI; PUTKA; MULLEN, 2010).

As concentrações séricas de PCR e FA também ultrapassaram substancialmente os valores de referência para alguns animais incluídos no estudo, embora estas também são alterações justificáveis pela natureza da doença, em

função do processo inflamatório, principalmente nas DIIs, que aumenta as concentrações da primeira e o fato da mucosa intestinal ser o tecido mais rico em FA, seguido pelos rins , placenta, fígado e ossos e, portanto, processos que provocam lesões do TGI podem elevar as concentrações desta enzima (VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS, 2006; CENTER, 2007; TAMURA et al., 2019). Além disso, como não houve diferenças entre os grupos para estas variáveis, é possível inferir que o grau de inflamação era homogêneo entre os animais estudados e concorda com os valores médios dos escores de enteropatia encontrados.

Por fim, com relação às alterações de variáveis sanguíneas, uma observação importante foi o aumento da contagem de monócitos após 60 dias no grupo não suplementado com prebiótico. A literatura (estudos com pessoas) aponta que a monocitose é uma alteração comumente encontrada em pacientes com CU e DC e, trata-se do tipo celular mais relacionado com processos inflamatórios agudos (SCHWARZMAIER et al., 2013; OKBA et al., 2019). Estudos *in vitro* desenvolvidos com as populações leucocitárias de pacientes com DC identificaram redução do recrutamento de neutrófilos em virtude da menor secreção de citocinas quimiotáticas por macrófagos mediante apresentação dos antígenos bacterianos. Tal alteração modifica o padrão inflamatório de forma que ocorre ativação persistente de macrófagos e aumento da contagem de monócitos no sangue periférico, entretanto não existe relação entre os valores desta variável e o grau de severidade da doença (SEGAL; LOEWI, 1976; HARBORD et al., 2006; SMITH et al., 2009; SCHWARZMAIER et al., 2013; HEDIN et al., 2019).

Alguns autores empenharam-se em estabelecer relação entre as proporções de linfócitos e monócitos e a atividade da doença em pacientes com CU (CELIKBILEK et al., 2013; CHERFANE et al., 2015; OKBA et al., 2019). No entanto, os dados ainda são conflitantes e nenhum consenso foi estabelecido a este respeito, além de que informações mais concretas neste sentido ainda são inexistentes na veterinária. Portanto, apesar de terem sido observadas diferenças entre os grupos experimentais estudados, estas ainda permanecem injustificadas do ponto de vista fisiológico de acordo com o conhecimento científico disponível até o momento.

O estudo acerca da microbiota intestinal e de seus produtos de fermentação também receberam atenção especial nos últimos anos para a melhor compreensão da doença inflamatória intestinal e, é possível que o conhecimento acerca do seu

perfil, suas funções e sua modulação sejam pontos-chave para o entendimento da dinâmica da doença de forma geral, bem como para propor novas estratégias de controle (DENG; SWANSON, 2015b).

O ácido lático é um metabólito importante oriundo da fermentação bacteriana. O seu aumento reduz o pH do microambiente intestinal e fecal e seleciona, portanto, o crescimento de bactérias benéficas em detrimento das patogênicas (LOUIS et al., 2007; BLAKE et al., 2019). Em estudo desenvolvido por Blake et al. (2019), os autores estabeleceram o intervalo de 1.0-7.0mM/L como referência de normalidade para as concentrações de ácido lático fecal total após ensaio clínico com 34 cães saudáveis. Ainda, neste estudo, cães com enteropatia crônica apresentaram concentração fecal de ácido lático superiores a esses valores de referência. Tal comportamento não foi observado nos animais deste estudo, os quais apresentaram concentrações de lactato nas fezes de acordo com a referência de normalidade.

No entanto, o estudo supracitado não menciona o tratamento ao qual os animais com enteropatia crônica estavam submetidos, bem como estes não apresentavam padronização da dieta e, portanto, tais diferenças podem refletir diretamente no comportamento da microbiota e de seus produtos de fermentação.

O mesmo estudo também avaliou as concentrações de três gêneros bacterianos envolvidos na produção de ácido lático por qPCR: *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp. e Enterococcus spp.* e, não foram observadas diferenças na abundância destes em relação ao grupo controle e tal resultado pode ser justificado pela técnica utilizada que limitou a escolha de tais gêneros bacterianos, os quais não são os únicos a produzirem ácido lático como produtos finais de seu metabolismo, apesar de serem considerados os principais. Neste sentido, podem ser adicionadas as bactérias do gênero *Streptococcus spp., Eubacterium spp.* (LOUIS et al., 2007) e, de acordo com estudo desenvolvido em gatos, as bactérias da ordem Fusobacteriales e da família Peptostreptococcaceae (OBA, 2018).

O gênero bacteriano *Lactobacillus spp.* não foi identificado nos três grupos experimentais em todos os tempos e, portanto, foi excluído das análises. Ou seja, os cães com DII incluídos neste estudo apresentaram baixíssima concentração fecal deste grupo bacteriano. Adicionalmente, o gênero *Bifidobacterium spp.* não foi encontrado no sequenciamento. Estes resultados corroboram o estudo de Macedo (2020), o qual também não identificou o gênero *Lactobacillus spp.* em estudo com

cães obesos. No entanto, o gênero *Bifidobacteria* fora identificado no grupo emagrecido e controle.

Em estudo desenvolvido por Santos (2018), onde cães saudáveis foram suplementados com teores crescentes de parede celular de levedura, observou-se tendência ao aumento *Lactobacillus* com a suplementação e, apesar de não haver diferença nas concentrações de *Bifidobacteria*, estas foram identificadas no sequenciamento.

Apesar de que as bactérias deste gênero sejam benéficas ao hospedeiro por auxiliar na digestão e absorção de nutrientes, produção de vitaminas e diminuição da proliferação de agentes patogênicos por exclusão competitiva (SILVA; NÖRNBERG, 2003), diversos estudos apontaram a sua baixa representatividade no microbioma de cães que, de acordo com a técnica utilizada, podem não ser identificados (HANDL et al., 2011; GARCIA-MAZCORRO et al., 2012).

Em estudo realizado por Suchodolski et al. (2012), os autores empenharam esforço em tentar caracterizar e diferenciar a microbiota de cães com DII de cães saudáveis, embora, nenhuma diferença na abundância das bactérias estudadas foi encontrada. Os autores conseguiram apenas identificar que a combinação de *Blautia spp.*, *Faecalibacterium spp.* e *Turicibacter spp.* tinham maior poder discriminatório entre animais doentes e saudáveis, de modo que a abundância destes três gêneros se apresentou reduzida em cães com DII em comparação aos cães saudáveis.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram o caráter complexo da modulação microbiana, a qual é influenciada por fatores interdependentes como, principalmente, os nutrientes provenientes da dieta e o tempo de consumo.

Com relação a abundância dos filos encontrados em cães, este estudo corrobora os dados da literatura, os quais definem que Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria são os filos predominantes nas fezes destes animais. Através da técnica 454-pirosequenciamento, Chaban et al. (2012) observaram que cães com DII apresentavam baixa abundância de Bacteroidetes e, alta abundância de Proteobactéria, conforme também observado neste estudo, o filo Bacteroidetes apresentou a menor abundância relativa.

A relação Firmicutes/Bacteroidetes é frequentemente utilizada para avaliação de disbiose, cuja redução destas populações bem como a redução da biodiversidade

já foi reportada em pacientes com DII (FRANK et al., 2007; FRIES; COMUNALE, 2011).

Tais bactérias são conhecidas por beneficiarem a saúde da mucosa, uma vez que o butirato é o principal produto de fermentação do filo Firmicutes, principalmente pela classe Clostridia (que possui por volta de 19 espécies produtoras de butirato). Nessa linha, no presente estudo foi possível observar que a suplementação de β-glucanos aumentou as concentrações fecais deste grupo bacteriano.

É importante ressaltar que os Clostridios são microrganismos eventualmente associados com doenças, entretanto, esta associação não é verdadeira para todos os casos. O supercrescimento de *Clostridium difficile* (ou a infecção por este, propriamente dita) é uma complicação séria em pacientes humanos com DII e piora o prognóstico da doença e, aparentemente, o seu crescimento foi associado com terapias antibacterianas prolongadas (NAGAO-KITAMOTO; KAMADA, 2017). Em nosso estudo, esta espécie não foi identificada (Figura 15 – Anexo A).

Em virtude dos inúmeros benefícios proporcionados pelo butirato (TOPPING, 1996; OREL; TROP, 2014; MATSUOKA; KANAI, 2015), é possível inferir que o aumento das bactérias produtoras deste composto é benéfico, o que foi observado nos grupos suplementados com prebióticos em detrimento do placebo pelo aumento de Firmicutes em ambos. É importante observar que os animais com DII que receberam o placebo, reduziram a abundância de Firmicutes sem alterar as populações de Bacteroidetes e evidenciam, portanto, evolução da disbiose durante o período estudado.

Com relação ao filo Proteobacteria, as suas concentrações também aparentam desempenhar papel fundamental na DII em humanos quando o seu crescimento é acompanhado de redução do filo Firmicutes, o que não foi observado neste trabalho. Em revisão publicada por MUKHOPADHYA et al. (2012), os autores apontaram a teoria de que o filo Firmicutes pode ser considerado um grupo “protetor” e o filo Proteobacteria um grupo “agressor” para pacientes humanos com DII.

Poucos estudos obtiveram resultados em identificar diferenças significativas nas abundâncias de famílias bacterianas na DII. Um estudo em humanos associou o aumento de *Bifidobacteriaceae* e *Coriobacteriaceae* com a remissão da DII (MORGAN et al., 2012; PAPA et al., 2012). Ainda de acordo com o mesmo estudo, as abundâncias de Roseburia, Ruminococcaceae em humanos com DII estavam

reduzidas quando comparadas com indivíduos saudáveis e refletiram de forma negativa na produção de butirato (produzido por Roseburia), acetato (produzido por Ruminococcaceae). Por outro lado, as populações de Enterobacteriaceae aumentaram. Esta família inclui espécies de *Escherichia* e *Shigella*, as quais foram associadas ao desenvolvimento da inflamação intestinal (GARRETT et al., 2010; MORGAN et al., 2012).

Com relação às populações de Enterobacteriaceae, nenhum dos tratamentos estudados neste trabalho modularam seu crescimento. Já com relação à redução de Ruminococcaceae, somente o tratamento B reduziu a sua população ao final do período experimental.

A família Streptococcaceae apresentou uma das maiores abundâncias entre os grupos estudados. Relatos da literatura veterinária evidenciaram que gatos, humanos e cães com enteropatia crônica apresentaram maiores populações destas bactérias (XENOULIS et al., 2008; SANTORU et al., 2017; MARSILIO et al., 2019). Contudo, o papel desempenhado por esta família ainda não é bem compreendido em função da sua diversidade de gêneros e espécies e, as informações disponíveis na literatura ainda são contraditórias. Por exemplo, em estudo publicado por Scarpa et al. (2011) em humanos com ileíte, as abundâncias de *Streptococcaceae* foram inversamente correlacionadas com a infiltração de células inflamatórias na mucosa e presença de úlceras. Portanto, poucas interpretações a respeito das mudanças observadas neste trabalho com relação a esta família bacteriana podem ser concluídas e, o mesmo pode-se dizer para o gênero *Streptococcus spp.*

Um estudo publicado por Pascal et al. (2017) definiu a assinatura microbiana de pacientes humanos com doença de Crohn, na qual oito grupos de microrganismos poderiam diferenciar doentes e saudáveis com 89-94% de especificidade. Entre os grupos estudados no presente trabalho, encontramos o gênero *Collinsella* que, de acordo com os autores supracitados, apresenta abundância relativa menor naqueles com DII.

O papel da *Collinsella* pode estar associado com a redução da expressão das junções de oclusão no intestino e indução da produção de IL-17, mecanismo associado à diversos processos inflamatórios, especialmente a DII. Este gênero bacteriano não degrada a fibra dietética, mas sim uma grande variedade de carboidratos como o amido e o seu crescimento, portanto, é favorecido por dietas com

baixas inclusões de fibras (CHEN et al., 2016; GOMEZ-ARANGO et al., 2018). Neste estudo, as populações deste gênero aumentaram nos grupos A, assim como no grupo placebo e evidencia tendência ao aumento desta bactéria ao longo do tempo nos animais não suplementados, bem como incapacidade do β-glucano em controlar a sua proliferação. Esta capacidade de controle somente foi observada com o tratamento B.

Apesar de mudanças pontuais serem observadas de formas distintas nos tratamentos com prebióticos, em linhas gerais, o tratamento com β-glucanos foi mais promissor ao proporcionar o crescimento de bactérias benéficas em detrimento das patogênicas e, em consequência, melhorar a composição bacteriana de uma forma geral.

O Shannon Index é um dos índices mais comuns utilizados para avaliar a diversidade alfa de cada espécie em uma amostra. Quanto maior é o seu valor, maior é a diversidade da amostra. Este índice ainda atribui peso equivalente às espécies raras e abundantes e fornece, ao mesmo tempo, medida de equidade apesar de atribuir maior peso para a diversidade (MELO, 2008).

Em comparação a indivíduos saudáveis, este índice já apresentou valores inferiores em gatos com diarreia crônica (MARSILIO et al., 2019) e humanos com doença de Crohn (ROJAS-FERIA et al., 2018).

Uma vez que, de acordo com Petersen; Round (2014), a disbiose pode ser caracterizada como a perda da diversidade microbiana, em geral, somente o tratamento com 0,06% de β-glucanos proporcionou melhora para esta variável.

Uma observação prática deste estudo permitiu concluir que os animais que receberam os tratamentos com prebióticos, não apresentaram episódios de reagudização da doença em um período máximo de 6 meses.

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados, nas condições de realização do presente estudo, confirmam a hipótese de que a adição de prebiótico, especialmente β-glucanos, modula de forma positiva a microbiota fecal. Ao final do estudo, somente os animais tratados com 0,06% de β-glucanos apresentaram melhora do índice de biodiversidade Shannon.

7 PRÓXIMOS PASSOS

Em razão da pandemia de COVID-19, as análises dos produtos de fermentação (compostos orgânicos voláteis, AGCC, AGCCR e aminas biogênicas) não puderam ser iniciadas. Estas serão realizadas em momento oportuno e os resultados serão publicados à comunidade científica afim de cumprir com o planejamento inicial proposto para este trabalho.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System**. 9th. ed. Missouri: Elsevier, 2015.

AGOURIDIS, A. .; MOSES, E.; MILIONIS, H. J. An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. **Annals of Gastroenterology**, v. 24, p. 181–187, 2011.

AKRAMIENE, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system**. Medicina (Kaunas)**, v.43, n.8, p. 597-606, 2007.

ALLENSPACH, K. et al. Chronic enteropathies in dogs: Evaluation of risk factors for negative outcome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 4, p. 700–708, 2007.

ALLENSPACH, K. A. et al. Correlating Gastrointestinal Histopathologic Changes to Clinical Disease Activity in Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **Veterinary pathology**, v. 56, n. 3, p. 435–443, 2019.

ALSHAWAQFEH, M. K. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 2017.

ARRIETA, M. C.; FINLAY, B. The intestinal microbiota and allergic asthma. **Journal of Infection**, v. 69, p. S53–S55, 2014.

BABINEAU, T. J. et al. A Phase II Multicenter, Double-blind, Randomized, Placebo-Controlled Study of Three Dosages of an Immunomodulator (PGG-Glucan) in High-Risk Surgical Patients. **Archives of Surgery**, v. 129, n. 11, p. 1204–1210, 1994.

BARSANTI, L. et al. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β-glucans**. Nat Prod Rep**, v.28, n. 3, p. 457-466, 2011.

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.

BINDELS, L. B. et al. Opinion Towards a more comprehensive concept for prebioticsNature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. Nature Publishing Group**, v.12, n. 5, p. 303-310, 2015.

BLAKE, A. B. et al. Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, 2019.

BROWN, C. T. et al. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of β-glucans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, 2003.

CARCIOFI, A. C. et al. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 326–336, 2008.

CASTRO-SÁNCHEZ, P.; MARTÍN-VILLA, J. M. Gut immune system and oral tolerance. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 2, p. S3-S11 2013.

CAUGANT, D. A.; LEVIN, B. R.; SELANDER, R. K. Distribution of multilocus genotypes of Escherichia coli within and between host families. **Journal of Hygiene**, v. 92, n. 3, p. 377–384, 1984.

CAVE, N. Nutritional Management of Gastrointestinal Diseases. In: FASCETTI, A. J.; DELANEY, S. J. (Ed.). **Applied Veterinary Clinical Nutrition**. 1. ed. Hoboken, Nova Jersey, EUA: Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2013. p. 175–219.

CAVE, N. J. Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract of companion animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 262–274, 2003.

CAVE, N. J. Hydrolyzed Protein Diets for Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1251–1268, 2006.

CELIKBILEK, M. et al. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Predictor of Disease Severity in Ulcerative Colitis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, n. 1, p. 72–76, 2013.

CENTER, S. A. Interpretation of Liver Enzymes. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 297–333, 2007.

CERQUETELLA, M. et al. Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans. **World journal of gastroenterology**, v. 16, n. 9, p. 1050–6, 2010.

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.

CHEN, J. et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2016.

CHERFANE, C. E. et al. Monocytosis and a low lymphocyte to monocyte ratio are effective biomarkers of ulcerative colitis disease activity. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1769–1775, 2015.

DAVENPORT, D. J.; JERGENS, A. E.; REMILLARD, R. . Inflammatory bowel disease. In: HAND, M. S. et al. (Ed.). **Small Animal Clinical Nutritional**. 5. ed. Topeka: Mark Morris Institute, 2010. p. 1065–1076.

DAY, M. J. et al. Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, n. 1, 2008.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Companion animals symposium: Future aspects and perceptions of companion animal nutrition and sustainability. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 3, p. 823–834, 2015a.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **The British journal of nutrition**, v. 113, p. S6–S17, 2015b.

FASANO, A. Leaky gut and autoimmune diseases. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 42, n. 1, p. 71–78, 2012.

FELDMAN, E. C. et al. **Canine and Feline Endocrinology**. 4th. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2014.

FERREIRA, C. **Suplementação de Betaglucano e variáveis metabólicas de cães obesos com resistência insulínica**. 2016. Universidade Estadual de São Paulo, 2016.

FIERER, N. et al. Forensic identification using skin bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 14, p. 6477–6481, 2010.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13780–

13785, 2007.

FREEMAN, L. M. Cachexia and sarcopenia: Emerging syndromes of importance in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 1, p. 3–17, 2012.

FRIES, W.; COMUNALE, S. Ulcerative Colitis: Pathogenesis. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 10, p. 1373–1382, 2011.

GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **MicrobiologyOpen**, v. 1, n. 3, p. 340–347, 2012.

GARRETT, W. S. et al. Enterobacteriaceae Act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 3, p. 292–300, 2010.

GASCHEN, L. et al. Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 49, n. 1, p. 56–64, 2008.

GERMAN, A. J.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Chronic Intestinal Inflammation and Intestinal Disease in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 8–20, 2003.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GOMEZ-ARANGO, L. F. et al. Low dietary fiber intake increases Collinsella abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. **Gut Microbes**, v. 9, n. 3, p. 189–201, 2018.

HALLERT, C. et al. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: Controlled pilot study. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 9, n. 2, p. 116–121, 2003.

HANDL, S. et al. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 301–310, 2011.

HANG, I. et al. Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 1-9, 2012.

HARBORD, M. W. N. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in Crohn's disease relates to reduced production of chemokines and can be augmented by granulocyte-colony stimulating factor. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 651–660, 2006.

HEDIN, C. R. H. et al. Gene and Mirna Regulatory Networks During Different Stages of Crohn's Disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 13, n. 5, p. 541–554, 2019.

HEILMANN, R. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Is inflammatory bowel disease in dogs and cats associated with a Th1 or Th2 polarization? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 168, n. 3, p. 131–134, 2015.

HEINSBROEK, S. E. M. et al. Orally delivered β-glucans aggravate dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal inflammation. **Nutrition Research**, v. 35, n. 12, p. 1106–1112, 2015.

HIJOVÁ, E. et al. Use of the prebiotic inulin in the prevention of adverse signs of acute colitis. **Acta Veterinaria**, v. 65, n. 3, p. 339–347, 2015.

HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota**. Gut Microbe**, v. 8, n. 2, p. 172-184, 2017.

HONNEFFER, J. B. et al. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. **Metabolomics**, v. 13, n. 3, 2017.

JERGENS, A. E. et al. Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 10, p. 1603–1608, 1992.

JERGENS, A. E. et al. A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 291–297, 2003.

JERGENS, A. E.; SIMPSON, K. W. Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 1404–19, 2012a.

JERGENS, A. E.; SIMPSON, K. W. Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. **Frontiers in Bioscience - Elite**, v. 4 E, n. 4, p. 1404–1419, 2012b.

JERRY KANEKO, J.; HARVEY, J. J.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th. ed. New York: Academic Press Inc., 2008.

JIA, J. et al. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 2, p. 304–312, 2010.

KALENYAK, K. et al. Comparison of the intestinal mucosal microbiota in dogs diagnosed with idiopathic inflammatory bowel disease and dogs with food-responsive diarrhea before and after treatment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 2, 2018.

KAPLAN, G. G.; NG, S.Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 313- 321.e2, 2017.

LAFLAMME, D. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, v. 22, n. 4, p. 10–15, 1997.

LARSEN, N. et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, 2010.

LEE, K. H. et al. Bacterial β-(1,3)-glucan prevents DSS-induced IBD by restoring the reduced population of regulatory T cells. **Immunobiology**, v. 219, n. 10, p. 802–812, 2014.

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

LI, Q. et al. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. **American Society for Microbiology**, v. 8, n. 1, p. e01703- 01716, 2017.

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.

MACEDO, H. T. **Caracterização da microbiota fecal de cães obesos e após o emagrecimento**. 2020. Universidade de São Paulo, 2020.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β-glucana de Saccharomyces cerevisiae: Constituição, bioatividade e obtenção**. Semina:Ciencias Agrarias**, v.29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MANDIGERS, P. J. J. et al. A Randomized, Open-Label, Positively-Controlled Field Trial of a Hydrolyzed Protein Diet in Dogs with Chronic Small Bowel Enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1350–1357, 2010.

MANICHANH, C. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 205–211, 2006.

MARCHETTI, V. et al. Evaluation of Erythrocytes, Platelets, and Serum Iron Profile in Dogs with Chronic Enteropathy. **Veterinary Medicine International**, v. 28, p. doi: 10.4061/2010/716040., 2010.

MARKS, S.; LAFLAMME, D. P.; MCALOOSE, D. Dietary trial using a commercial hypoallergenic diet containing hydrolyzed protein for dogs with inflammatory bowel disease. **Veterinary Therapeutics**, v. 3, n. 2, 2002.

MARSILIO, S. et al. Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

MATSUOKA, K.; KANAI, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease.

Seminars in Immunopathology, v. 37, n. 1, p. 47–55, 2015.

MEHAIN, S. O.; HAINES, J. M.; LEE, P. M. Platelet indices as biomarkers for characterization and determination of severity in canine chronic enteropathy. **Veterinary Journal**, v. 248, p. 37–41, 2019.

MELO, A. S. O que ganhamos “confundindo” riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 21–27, 2008.

MICHEL, K. E. et al. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy X-ray absorptiometry. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. S1, p. S57–S59, 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, n. 11, p. 3022–3032, 2007.

MINAMOTO, Y. et al. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 6, n. 1, p. 33–47, 2015.

MORGAN, X. C. et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome biology**, v. 13, n. 9, 2012.

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

NAGAO-KITAMOTO, H.; KAMADA, N. Host-microbial cross-talk in inflammatory bowel disease. **Immune Network**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. 2nd. ed. Washington: The National Academies Press, 2006.

NI, J. et al. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 10, p. 573–584, 2017.

OBA, P. M. **Efeitos Da Parede Celular De Levedura Sobre a Microbiota Fecal De Gatos Saudáveis e Naturalmente Infectados Pelo Vírus Da Imunodeficiência Felina**. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.

OKBA, A. M. et al. Neutrophil/lymphocyte ratio and lymphocyte/monocyte ratio in ulcerative colitis as non.invasive biomarkers of disease activity and severity. **Autoimmunity Highlights**, v. 10, n. 1, 2019.

OMORI, M. et al. Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and

intestinal lymphoma. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 11, p. 1840–1847, 2017.

OREL, R.; TROP, T. K. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 33, p. 11505–11524, 2014.

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, n. 1, p. 125–133, 2015.

PAPA, E. et al. Non-invasive mapping of the gastrointestinal microbiota identifies children with inflammatory bowel disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

PASCAL, V. et al. A microbial signature for Crohn's disease. **Gut**, v. 66, n. 5, p. 813–822, 2017.

PETERSEN, C.; ROUND, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1024–1033, 2014.

PETERSON, D. A. et al. Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 6, p. 417–427, 2008.

PILLEMER, L.; ECKER, E. E. ANTICOMPLEMENTARY FACTOR IN FRESH YEAST. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 139–142, 1941.

PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **The Analyst**, v. 26, p. 1151–1152, 1969.

RIDGWAY, J.; JERGENS, A. E.; NIYO, Y. Possible causal association of idiopathic inflammatory bowel disease with thrombocytopenia in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 1, p. 65–74, 2001.

ROJAS-FERIA, M. et al. Modulation of faecal metagenome in Crohn's disease: Role of microRNAs as biomarkers. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 46, p. 5223–5233, 2018.

ROSENFELD, C. S. Special section on drug metabolism and the microbiome - Perspective microbiome disturbances and autism spectrum disorders. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 10, p. 1557–1571, 2015.

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

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, n. 3, p. 297–308, 2013.

SANTORU, M. L. et al. Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

SANTOS, K. de M. **Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas dietas de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade**. 2018. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

SAPPATI BIYYANI, R. S. R.; PUTKA, B. S.; MULLEN, K. D. Dyslipidemia and lipoprotein profiles in patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 4, n. 6, p. 478–482, 2010.

SARINHO, E. et al. Production of interleukin-10 in asthmatic children after Beta-1-3-glucan. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 37, n. 4, p. 188–192, 2009.

SCANLAN, P. D. et al. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3980–3988, 2006.

SCARPA, M. et al. Relationship between mucosa-associated microbiota and inflammatory parameters in the ileal pouch after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. **Surgery**, v. 150, n. 1, p. 56–67, 2011.

SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? **Veterinary Medicine and Science**, v. 2, n. 2, p. 71–94, 2016.

SCHWARTZ, B.; HADAR, Y. Possible mechanisms of action of mushroom-derived glucans on inflammatory bowel disease and associated cancer. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, n. 2, 2014.

SCHWARZMAIER, D. et al. Peripheral Monocyte Functions and Activation in Patients with Quiescent Crohn's Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 62761, 2013.

SEGAL, A. W.; LOEWI, G. Neutrophil dysfunction in Crohn's disease. **The Lancet**, v. 308, n. 7979, p. 219–221, 1976.

SEGARRA, S. et al. Oral Chondroitin Sulfate and Prebiotics for the Treatment of Canine Inflammatory Bowel Disease: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 49, 2016.

SHEN, Z. et al. Update on intestinal microbiota in Crohn's disease 2017: Mechanisms, clinical application, adverse reactions, and outlook**. Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v.32, n.11, p. 1804-1812, 2017.

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

SILVA, R. D. Doenças do intestino delgado - diarreias crônicas. In: JERICO, M. M.; NETO, J. P. DE A.; KOGIKA, M. M. (Ed.). **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2015. p. 980–984.

SILVA, V. D. O. et al. β-Glucans (Saccharomyces cereviseae) reduce glucose levels and attenuate alveolar bone loss in diabetic rats with periodontal disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

SIMPSON, K. W. et al. Subnormal Concentrations of Serum Cobalamin (Vitamin B12) in Cats with Gastrointestinal Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 1, p. 26, 2001.

SMITH, A. M. et al. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 9, p. 1883–1897, 2009.

SOKOL, H. et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 43, p. 16731–16736, 2008.

SPAGNUOLO, R. et al. Beta-Glucan, Inositol and Digestive Enzymes Improve Quality of Life of Patients with Inflammatory Bowel Disease and Irritable Bowel Syndrome. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 102–107, 2017.

STEWART, J. A.; CHADWICK, V. S.; MURRAY, A. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 1239–1242, 2005.

SUCHODOLSKI, J. S. et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3–4, p. 394–400, 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, n. 2, p. 261–272, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S. et al. The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Laboratory assessment of gastrointestinal function. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 4, p. 203–210, 2003.

SWANSON, K. S. et al. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. **ISME Journal**, v. 5, n. 4, p. 639–649, 2011.

TALBOTT, S.; TALBOH, J. Beta 1,3/1,6 glucan decreases upper respiratory tract infection symptoms and improves psychological wellbeing in moderate to highly-stressed subjects. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 21, n. 1, p. 21–24, 2010.

TAMURA, Y. et al. Plasma amino acid profiles in dogs with inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 4, p. 1602–1607, 2019.

TESHIMA, E. **INFLUÊNCIA DA IDADE NA DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES EM FELINOS DOMÉSTICOS**. 2006. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

TOPPING, D. L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 5, n. 1, p. 15–9, 1996.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

TURNBAUGH, P. J. et al. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 4, p. 213–223, 2008.

VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. **Laboratory markers in IBD: Useful, magic, or unnecessary toys?** Gut, v. 55, n. 3, p. 426-431, 2006.

VETVICKA, V. et al. Beta glucan: Supplement or drug? From laboratory to clinical trials. **Molecules**, v. 24, n. 7, 2019.

VOLKMANN, M. et al. Chronic Diarrhea in Dogs – Retrospective Study in 136 Cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1043–1055, 2017.

WALKER, D. et al. A comprehensive pathological survey of duodenal biopsies from dogs with diet-responsive chronic enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 862–874, 2013.

WANG, W. et al. Increased proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 398–406, 2014.

WASHABAU, R. et al. ACVIM Consensus Statement Endoscopic, Biopsy, and

Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals. **J Vet Intern Med**, v. 24, n. 1, p. 10-26, 2010a.

WASHABAU, R. J. et al. Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals. **J Vet Intern Med**, v. 24, n. 1, p. 10–26, 2010b.

WASHABAU, R. J.; DAY, M. J. **Canine and Feline Gastroenterology**. [s.l: s.n.]

WHITESIDE, S. A. et al. The microbiome of the urinary tract - A role beyond infection**.** **Nature Reviews Urology**,v. 12, n. 2, p.81-90, 2015.

WILLARD, M. D. et al. Effect of sample quality on the sensitivity of endoscopic biopsy for detecting gastric and duodenal lesions in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1084–1089, 2008.

XENOULIS, P. G. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 3, p. 579–589, 2008.

ZAINE, L. et al. Nutracêuticos imunomoduladores com potencial uso clínico para cães e gatos. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 35, n. 4, p. 2513–2530, 2014.

ZYŁA, E. et al. Beneficial effects of oat beta-glucan dietary supplementation in colitis depend on its molecular weight. **Molecules**, v. 24, n. 19, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RESULTADOS INDIVIDUAIS (SANGUE, FEZES, EXAME FÍSICO, ESCORES DE ENTEROPATIA)

1. RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E SÉRICAS EM T0

Tabela 19. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 0.

	Animal 1	**Animal 2**	**Animal 3**	**Animal 4**	**Animal 5**	**Animal 6**	**Animal 7**	**Animal 8**	**Animal 9**	**Animal 10**	**Animal 11**	**Animal 12**	**Ref.[1]**
Eritrócitos ($x10^6$/µL)	6,1	6,9	6,9	7,6	7,6	6,62	8,2	6,7	8,0	6,2	6,6	7,9	5,0 – 8,0
Hemoglobina (g/dL)	13,2	15,4	15,6	17,7	16,9	15,30	20	16,1	19,4	14,5	16,2	18,9	12,0-18,0
Hematócrito (%)	43	46	46	53	49	46	57	47	57	42	48	56	37-57
VCM (fL)	71	67	67	70	64	69,49	69	70	69	68	73	71	60-77
HCM (pg)	22	22	23	23	22	23	24	24	22	23	25	23	22-27
CHCM (g/dL)	31	33	34	33	35	33	35	34	32	34	34	33	31-36
Leuc. Totais (/µL)	5.720	6.970	9.000	8.800	10.340	14.630	4.560	12.510	14.100	7.850	9.460	9.330	6.000-15.000
Neut. Totais (/µL)	3.480	5.930	5.950	6.688	7.650	11.996	3.330	8.870	10.152	5.680	6.770	6.560	3.000-12.100
Linfócitos (/µL)	1.240	500	1.270	1.408	7.650	1.316	700	2.150	1.551	1.570	1.930	1.520	1.500-5.000
Monócitos (/µL)	760	510	950	352	1.400	1.024	210	530	282	380	430	520	0-800
Eosinófilos (/µL)	190	30	800	352	690	0	300	930	2.115	190	220	670	0-1.300
Basófilos (/µL)	50	0	20	0	560	0	30	30	0	30	100	80	0-140
Plaquetas(10^3/µL)	702	491	490	353	40	780	258	177	197	426	406	265	200-600.000

Legenda: VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuc. Totais = leucócitos totais; Neut. Totais = neutrófilos totais. Ref. = valor de referência. Grupo A = β-glucano; Grupo B = *blend* (MOS + β-glucanos). [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008).

Tabela 20. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos no estudo referentes ao tempo 0.

	Animal 13	**Animal 14**	**Animal 15**	**Animal 16**	**Animal 17**	**Animal 18**	**Ref.[1]**
Eritrócitos ($x10^6$/µL)	7,0	7,9	7,8	6,1	8,45	6,9	5,0 – 8,0
Hemoglobina (g/dL)	15,7	17,6	15,4	12,9	20	15,6	12,0-18,0
Hematócrito (%)	46	52	46	38	55,5	46	37-57
VCM (fL)	65	66	59	63	65,68	67	60-77
HCM (pg)	22	22	20	13	23,7	23	22-27
CHCM (g/dL)	34	34	33	34	36	34	31-36
Leuc. Totais (/µL)	8.800	6.140	11.940	5.490	5.620	9.740	6.000-15.000
Neut. Totais (/µL)	5.896	3.040	9.630	3.610	4.158	4.660	3.000-12.100
Linfócitos (/µL)	2.200	1.880	1.460	1.310	1.348	3.200	1.500-5.000
Monócitos (/µL)	528	350	420	360	112,4	430	0-800
Eosinófilos (/µL)	176	820	400	150	0	1400	0-1.300
Basófilos (/µL)	0	60	40	60	0	60	0-140
Plaquetas(10^3/µL)	312	257	540	353	277	386	200-600.000

Legenda: VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuc. Totais = leucócitos totais; Neut. Totais = neutrófilos totais. Ref. = valor de referência. Grupo C = placebo; [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008).

Tabela 21. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 0.

	Animal 1	**Animal 2**	**Animal 3**	**Animal 4**	**Animal 5**	**Animal 6**	**Animal 7**	**Animal 8**	**Animal 9**	**Animal 10**	**Animal 11**	**Animal 12**	**Ref.[1]**
Spec cPL (ng/mL)	197	144	70	714	229	104	35	30	69	101	157	275	< 200
TLI (mcg/L)	11	16	50	50	15	38	30	13	51	22	17	41	9 a 50
PCR (mg/L)	50	670	6,1	4,3	3,70	4,10	10	15	10	0,06	0,25	22,8	0-10
Folato (nmol/L)	37	40	53	23	23	60	49	54	28	11	29	35	7 – 39[2]
Cobalamina (ng/L)	433	549	972	463	611	1.043	480	595	431	705	463	377	252 – 836[2]
Proteína total (g/dL)	6,94	6,34	7,21	6,65	7,4	6,0	6,57	5,62	7,79	7,32	7,03	6,93	5,3-7,6
Albumina (g/dL)	3,81	3,35	4,18	3,98	4,17	3,65	4,50	3,58	4,06	4,69	3,89	3,83	2,3-3,8
ALT (U/L)	60	14,1	31,8	10,9	36,8	73	8,6	3,9	16,9	19,0	23,3	26,2	10-88
FA (U/L)	741,9	14,5	32,2	12,6	55,4	969	103,4	55,7	65,5	77,9	28,5	43	20-150
Ureia (mg/dL)	26,1	34,4	15,8	15,4	27,1	42	33,3	41,7	23,9	34,3	19,3	19,6	20-40
Creatinina (mg/dL)	0,72	1,05	0,79	1,19	0,83	1,01	1,0	1,19	1,10	0,72	0,93	1,18	0,7-1,4
Triglicérides (mg/dL)	76,1	90,9	77,5	79,8	197,9	1101	187,3	41,4	202,5	60,6	63,6	72,6	40-169
Colesterol (mg/dL)	232,1	221,0	207,3	266	187,9	522	166	175,7	153	177,6	216,2	119,3	125-270

Legenda: Spec cPL = *Canine pancreas-specific lipase*; TLI = *Trypsin like immunoreactivity*; PCR = proteína C reativa; ALT = alanina aminotransferase; FA = fosfatase alcalina. Ref. = valor de referência. Grupo A = β-glucano; Grupo B = *blend* (MOS + β-glucanos). [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008) exceto folato e cobalamina; [2]Valores de referência segundo Suchodolski; Steiner (2003).

Tabela 22. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos do estudo referentes ao tempo 0.

	Animal 13	**Animal 14**	**Animal 15**	**Animal 16**	**Animal 17**	**Animal 18**	**Animal 6T**	**Ref.[1]**
Spec cPL (ng/mL)	5	78	38	81	120	40	104	< 200
TLI (mcg/L)	13	12	20	12	10	32	38	9 a 50
PCR (mg/L)	100	130	11	80	2,0	10,4	4,10	0-10
Folato (nmol/L)	30	38	13	34	30	62	60	7 – 39[1]
Cobalamina (ng/L)	423	692	416	253	317	455	1.043	252 – 836[2]
Proteína total (g/dL)	7,19	6,08	6,69	7,46	6,09	4,78	6,0	5,3-7,6
Albumina (g/dL)	4,07	3,22	3,82	3,24	3,52	2,94	3,65	2,3-3,8
ALT (U/L)	22,5	17,5	25,4	14,3	37,8	22,2	73	10-88
FA (U/L)	48,4	29,4	55,3	34,8	46,1	35,8	969	20-150
Ureia (mg/dL)	69,9	30,1	40,1	20,5	31,10	36,4	42	20-40
Creatinina (mg/dL)	0,65	1,04	0,77	0,73	0,98	0,77	1,01	0,7-1,4
Triglicérides (mg/dL)	107,9	160,7	154,2	49,7	68,6	35,8	1101	40-169
Colesterol (mg/dL)	244,3	234,4	233,2	329,6	105,9	119	522	125-270

Legenda: Spec cPL = *Canine pancreas-specific lipase*; TLI = *Trypsin like immunoreactivity*; PCR = proteína C reativa; ALT = alanina aminotransferase; FA = fosfatase alcalina. Ref. = valor de referência. Grupo C = placebo; [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008) exceto folato e cobalamina; [2]Valores de referência segundo Suchodolski; Steiner (2003).

2. RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E SÉRICAS EM T60

Tabela 23. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 60.

	Animal 1	**Animal 2**	**Animal 3**	**Animal 4**	**Animal 5**	**Animal 6**	**Animal 7**	**Animal 8**	**Animal 9**	**Animal 10**	**Animal 11**	**Animal 12**	**Ref.[1]**
Eritrócitos ($x10^6$/µL)	6,8	7,2	6,9	7,8	7,8	6,95	6,74	7,2	8,0	6,5	7,2	7,3	5,0 – 8,0
Hemoglobina (g/dL)	14,4	16,8	15,6	18,5	17,4	16,4	16,1	17,1	17,5	15,5	17,2	17,0	12,0-18,0
Hematócrito (%)	43	50	46	53	50	47,3	47,9	50	57	47	49	50	37-57
VCM (fL)	63	70	67	68	65	68,1	71,1	70	69	72	69	69	60-77
HCM (pg)	21	23	23	24	22	23,6	23,9	24	21	24	24	23	22-27
CHCM (%)	33	34	34	35	35	34,7	33,6	34	30	33	35	34	31-36
Leuc. Totais (/µL)	6.650	7.600	9.000	7.640	9.040	6.400	6.300	8.220	15.900	16.650	9.950	7.600	6.000-15.000
Neut. Totais (/µL)	4.190	5.890	5.950	4.850	6.840	5.120	4.914	4.220	12.243	14.730	6.670	5.820	3.000-12.100
Linfócitos (/µL)	1.520	1.060	1.270	2.140	1.140	960	945	3.110	2.067	1.470	2.190	950	1.500-5.000
Monócitos (/µL)	610	530	950	330	460	192	315	300	477	340	690	280	0-800
Eosinófilos (/µL)	280	100	800	250	550	128	126	520	1.113	90	300	530	0-1.300
Basófilos (/µL)	60	10	20	60	50	0	0	80	0	0	100	20	0-140
Plaquetas(10^3/µL)	531	496	490	322	514	468	250	180	246	437	371	263	200-600.000

Legenda: VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuc. Totais = leucócitos totais; Neut. Totais = neutrófilos totais. Ref. = valor de referência. Grupo A = β-glucano; Grupo B = *blend* (MOS + β-glucanos). [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008).

Tabela 24. Resultados de análises hematológicas (hemograma e leucograma) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos no estudo referentes ao tempo 60.

	Animal 13	**Animal 14**	**Animal 15**	**Animal 16**	**Animal 17**	**Animal 18**	**Ref.[1]**
Eritrócitos ($x10^6$/µL)	6,6	7,3	8,4	6,2	6,7	7,5	5,0 – 8,0
Hemoglobina (g/dL)	16,3	17,8	16,4	13,8	16,7	16,1	12,0-18,0
Hematócrito (%)	45	49	0	40	50	47	37-57
VCM (fL)	68	67	59	65	75	63	60-77
HCM (pg)	25	24	19	22	25	22	22-27
CHCM (%)	36	36	33	34	33	34	31-36
Leuc. Totais (/µL)	13.930	8.800	9.740	9.850	9.580	10.470	6.000-15.000
Neut. Totais (/µL)	9.370	5.190	6.800	7.440	5.840	5.740	3.000-12.100
Linfócitos (/µL)	3.120	2.210	1.950	1.760	2.120	3.480	1.500-5.000
Monócitos (/µL)	630	770	670	380	510	460	0-800
Eosinófilos (/µL)	730	530	250	240	1.080	740	0-1.300
Basófilos (/µL)	80	110	70	30	30	30	0-140
Plaquetas(10^3/µL)	365	310	609	424	636	419	200-600.000

Legenda: Spec cPL = *canine pancreas-specific lipase*; TLI = *trypsin like immunoreactivity*; PCR = proteína C reativa; ALT = alanina aminotransferase; FA = fosfatase alcalina. Ref. = valor de referência. Grupo C = placebo; [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008).

Tabela 25. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo referentes ao tempo 60.

	Animal 1	**Animal 2**	**Animal 3**	**Animal 4**	**Animal 5**	**Animal 6**	**Animal 7**	**Animal 8**	**Animal 9**	**Animal 10**	**Animal 11**	**Animal 12**	**Ref.[1]**
Spec cPL (ng/mL)	1,10	48	47	152	112	81	35	27	50	85	153	163	< 200
TLI (mcg/L)	19	12	43	50	18	27	30	13	10	20	15	29	9 a 50
PCR (mg/L)	100	5	5,20	3,50	4,50	2,90	10	17	10	1,02	0,8	15,60	0-10
Folato (nmol/L)	36	51	54	44	48	54	49	52	53	10	23	33	7 – 39[2]
Cobalamina (ng/L)	391	604	837	397	392	1.058	480	595	349	710	470	485	252 – 834[2]
Proteína total (g/dL)	6,93	6,76	7,21	6,61	7,58	7,8	7,68	5,8	7,5	8,13	6,30	7,13	5,3-7,6
Albumina (g/dL)	4,15	3,71	4,06	3,97	4,30	4,3	4,5	3,48	4,57	5,40	3,45	3,60	2,3-3,8
ALT (U/L)	43,6	21,2	38,9	9,1	27,8	54	23,3	28,8	28	27,1	25,4	29,3	10-88
FA (U/L)	377,8	31,4	36,6	9,3	43,1	91	196,7	42,6	65,7	79,7	34,2	33,1	20-150
Ureia (mg/dL)	30,1	50,3	24,4	26,9	40,9	46	32,9	50,1	24,2	32,6	18,4	22,6	20-40
Creatinina (mg/dL)	0,77	1,10	0,76	1,21	0,79	0,67	0,91	1,32	0,89	0,67	1,08	1,13	0,7-1,4
Triglicérides (mg/dL)	79,5	143,4	188,4	38,5	140,7	65,1	203,9	48,5	108,5	79,7	44,5	44,1	40-169
Colesterol (mg/dL)	265,9	302	218,3	258,3	180,9	229	173,4	153,0	152,3	158,2	209,2	122,4	125-270

Legenda: VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuc. Totais = leucócitos totais; Neut. Totais = neutrófilos totais. Ref. = valor de referência. Grupo A = β-glucano; Grupo B = *blend* (MOS + β-glucanos). [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008) exceto folato e cobalamina; [2]Valores de referência segundo Suchodolski; Steiner (2003).

Tabela 26. Resultados de análises bioquímicas séricas (Spec cPL, TLI, PCR, folato, cobalamina, proteína total, albumina, ALT, FA, ureia, creatinina, triglicérides e colesterol) e seus respectivos valores de referência dos animais do grupo C incluídos no estudo referentes ao tempo 60.

	Animal 13	**Animal 14**	**Animal 15**	**Animal 16**	**Animal 17**	**Animal 18**	**Ref.[1]**
Spec cPL (ng/mL)	21	1,14	89	48	95	50	< 200
TLI (mcg/L)	17	11	22	43	15	50	9 a 50
PCR (mg/L)	10	50	0,7	5	1,10	7,0	0-10
Folato (nmol/L)	14	70	15	47	39	28	7 – 39[1]
Cobalamina (ng/L)	229	881	705	237	317	218	252 – 834[2]
Proteína total (g/dL)	6,59	6,19	6,9	7,37	5,76	4,98	5,3-7,6
Albumina (g/dL)	4,03	3,45	4,15	3,38	3,60	3,31	2,3-3,8
ALT (U/L)	16,1	33,0	40,2	14,6	27	17,4	10-88
FA (U/L)	111,9	37,2	67,5	21,6	54,6	37	20-150
Ureia (mg/dL)	51,4	36,4	48,3	19,9	26,5	60,7	20-40
Creatinina (mg/dL)	0,63	1,15	0,83	0,75	0,99	0,75	0,7-1,4
Triglicérides (mg/dL)	267,9	47,2	154,2	54,3	84,7	26,2	40-169
Colesterol (mg/dL)	207,1	357,3	215,5	194,3	127	117,5	125-270

Legenda: Spec cPL = *Canine pancreas-specific lipase*; TLI = *Trypsin like immunoreactivity*; PCR = proteína C reativa; ALT = alanina aminotransferase; FA = fosfatase alcalina. Ref. = valor de referência. Grupo C = placebo; [1]Valores de referência segundo Kaneko (2008) exceto folato e cobalamina; [2]Valores de referência segundo Suchodolski; Steiner (2003).

3. RESULTADOS INDIVIDUAIS DE VARIÁVEIS DO EXAME FÍSICO, CIBDAI E CCECAI

Tabela 27. Descrição de peso (em Kg), ECC, EMM, EF, CIBDAI e CCECAI dos animais dos grupos A e B incluídos no estudo nos tempos 0 e 60.

	Animal 1	**Animal 2**	**Animal 3**	**Animal 4**	**Animal 5**	**Animal 6**	**Animal 7**	**Animal 8**	**Animal 9**	**Animal 10**	**Animal 11**	**Animal 12**
						T0						
Peso (kg)	8,08	36	5,3	24	13,2	5,0	7,8	8,0	21	7,9	28	21,7
ECC (1 a 9)	5	6	6	7	6	6	5	4	5	5	5	6
EMM (0 a 3)	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
EF (0 a 5)	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	4
CIBDAI	2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
CCECAI	4	2	0	0	3	1	1	0	0	2	1	5
						T60						
Peso (kg)	8,7	35,8	5,0	23	13,3	5,0	8,0	7,6	19,1	7,6	27,6	21,2
ECC (1 a 9)	5	6	5	7	6	6	5	4	5	5	5	5
EMM (0 a 3)	3	6	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
EF (0 a 5)	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CIBDAI	1	0	0	0	2	0	0	1	1	1	1	2
CCECAI	3	0	1	0	5	2	1	0	0	0	3	5

Legenda: ECC = escore de condição corporal (1 a 9); EMM = escore de massa muscular (0 a 3); EF = escore fecal (0 a 5); CIBDAI = *Canine IBD activity index*; CCECAI = *Canine chronic enteropathy clinical activity index*. Grupo A = β-glucano; Grupo B = *blend* (MOS + β-glucanos).

Tabela 28. Descrição de peso (em Kg), ECC, EMM, EF, CIBDAI e CCECAI dos animais do grupo C incluídos no estudo nos tempos 0 e 60.

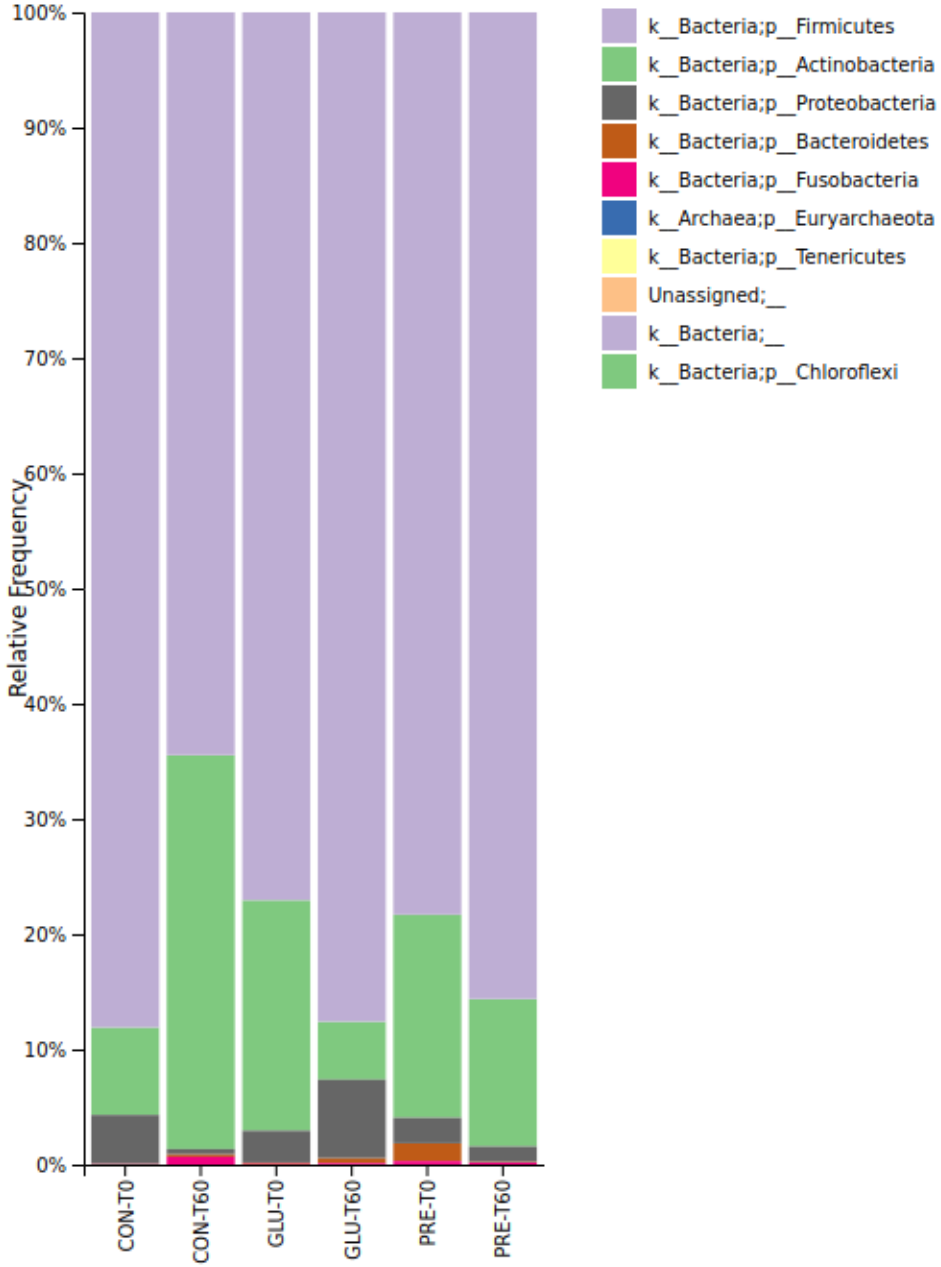
	Animal 13	**Animal 14**	**Animal 15**	**Animal 16**	**Animal 17**	**Animal 18**
			T0			
Peso (kg)	6,4	11,3	5,9	27,4	9,6	2,5
ECC (1 a 9)	5	5	5	5	4	5
EMM (0 a 3)	3	3	2	3	3	2
EF (0 a 5)	3	3	4	3	2	2
CIBDAI	4	3	0	2	4	5
CCECAI	6	3	0	3	6	5
			T60			
Peso (kg)	7,1	10,8	5,2	29,4	9,8	3,0
ECC (1 a 9)	6	4	5	5	4	5
EMM (0 a 3)	3	3	2	3	3	3
EF (0 a 5)	4	3	4	3	4	4
CIBDAI	0	6	1	0	1	1
CCECAI	0	6	0	1	2	0

Legenda: ECC = escore de condição corporal; EMM = escore de massa muscular; EF = escore fecal; CIBDAI = *Canine IBD activity index;* CCECAI = *Canine chronic enteropathy clinical activity index*. Grupo C = placebo.

ANEXOS

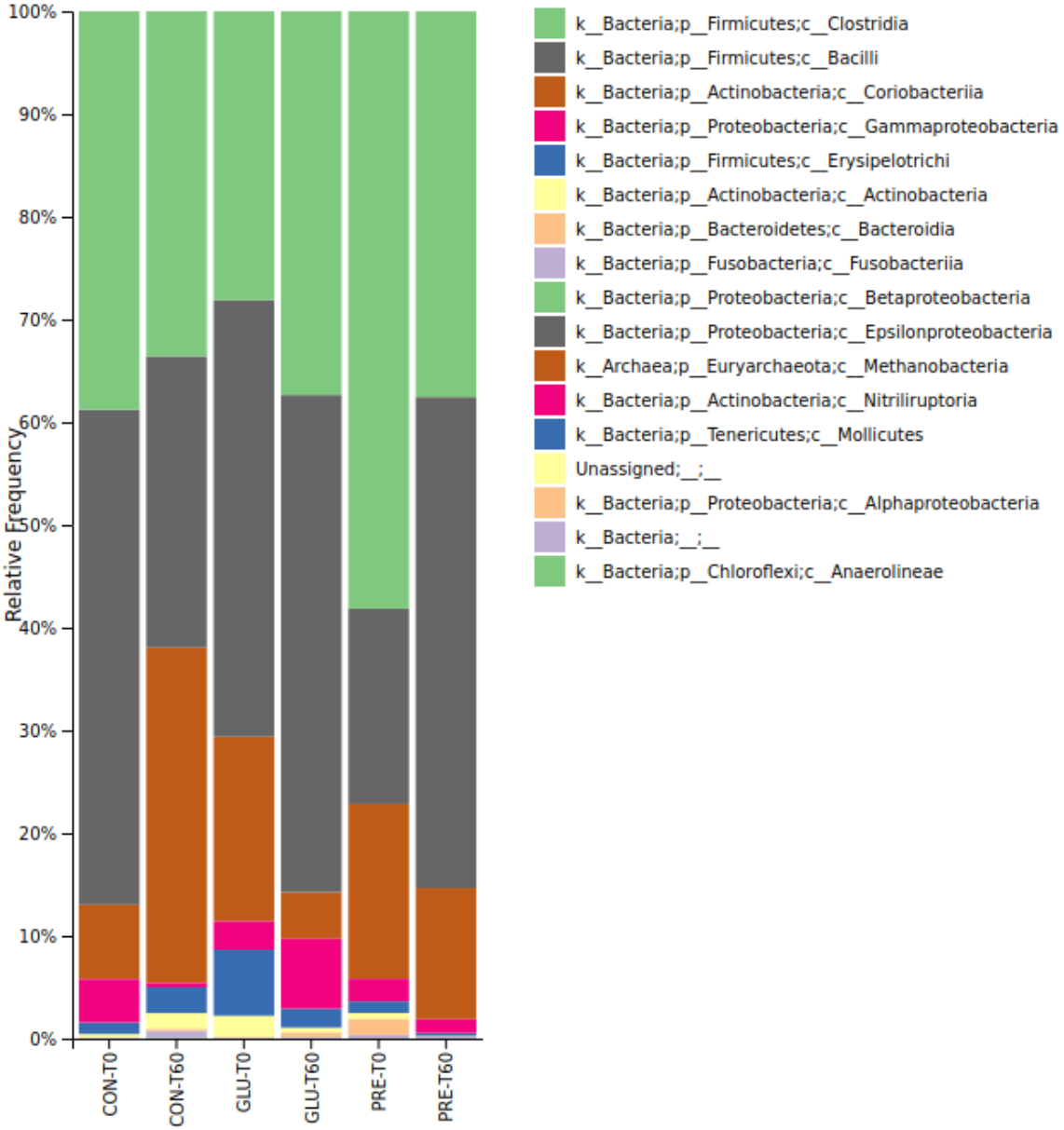
ANEXO A – COMPOSIÇÃO RELATIVA DA MICROBIOTA NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Figura 10. Composição relativa de filos bacterianos dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.



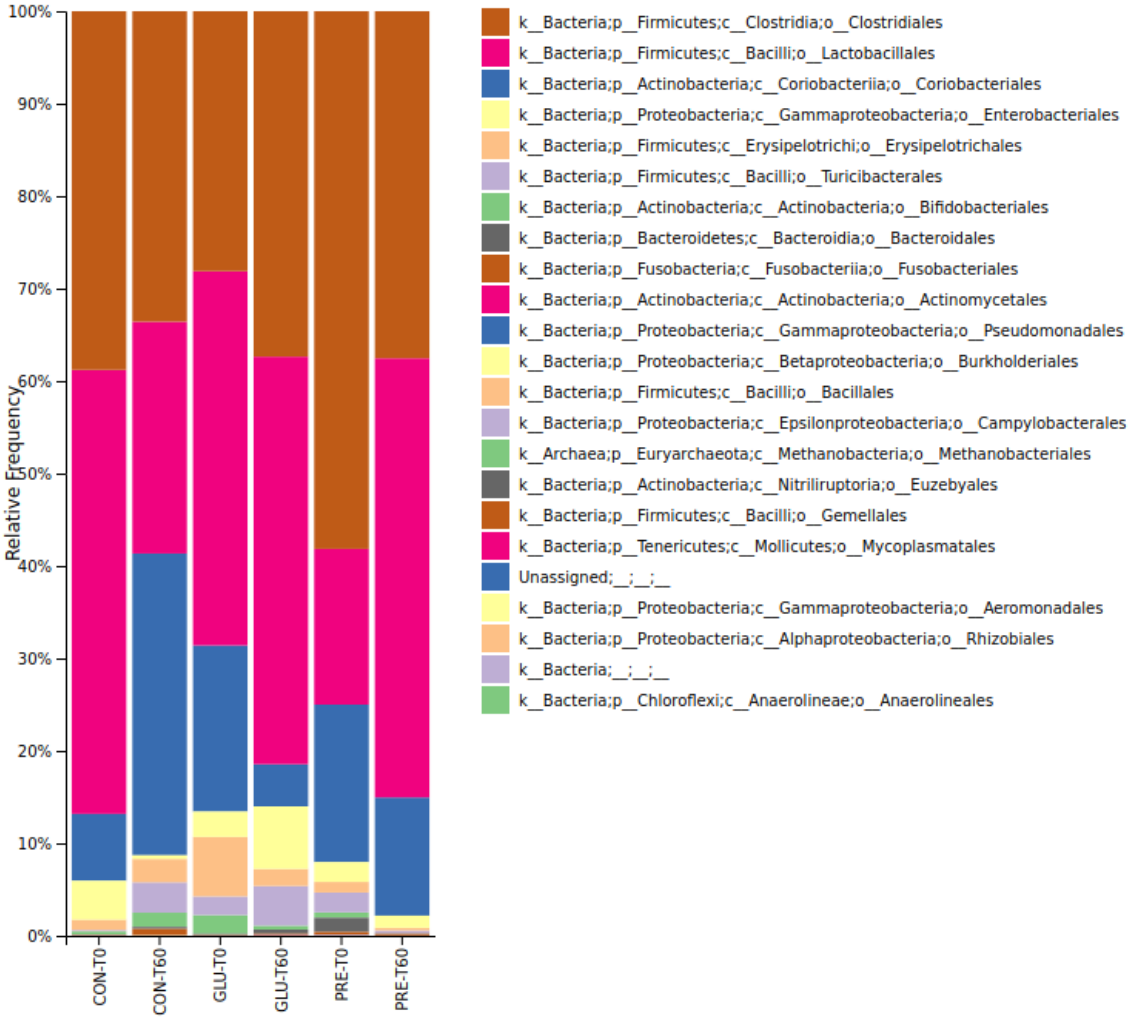
Legenda: CON = Grupo C – placebo; GLU = Grupo A – 0,1% β-glucano; PRE = Grupo B – *blend* (MOS + β-glucanos).

Figura 11. Composição relativa de classes bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.



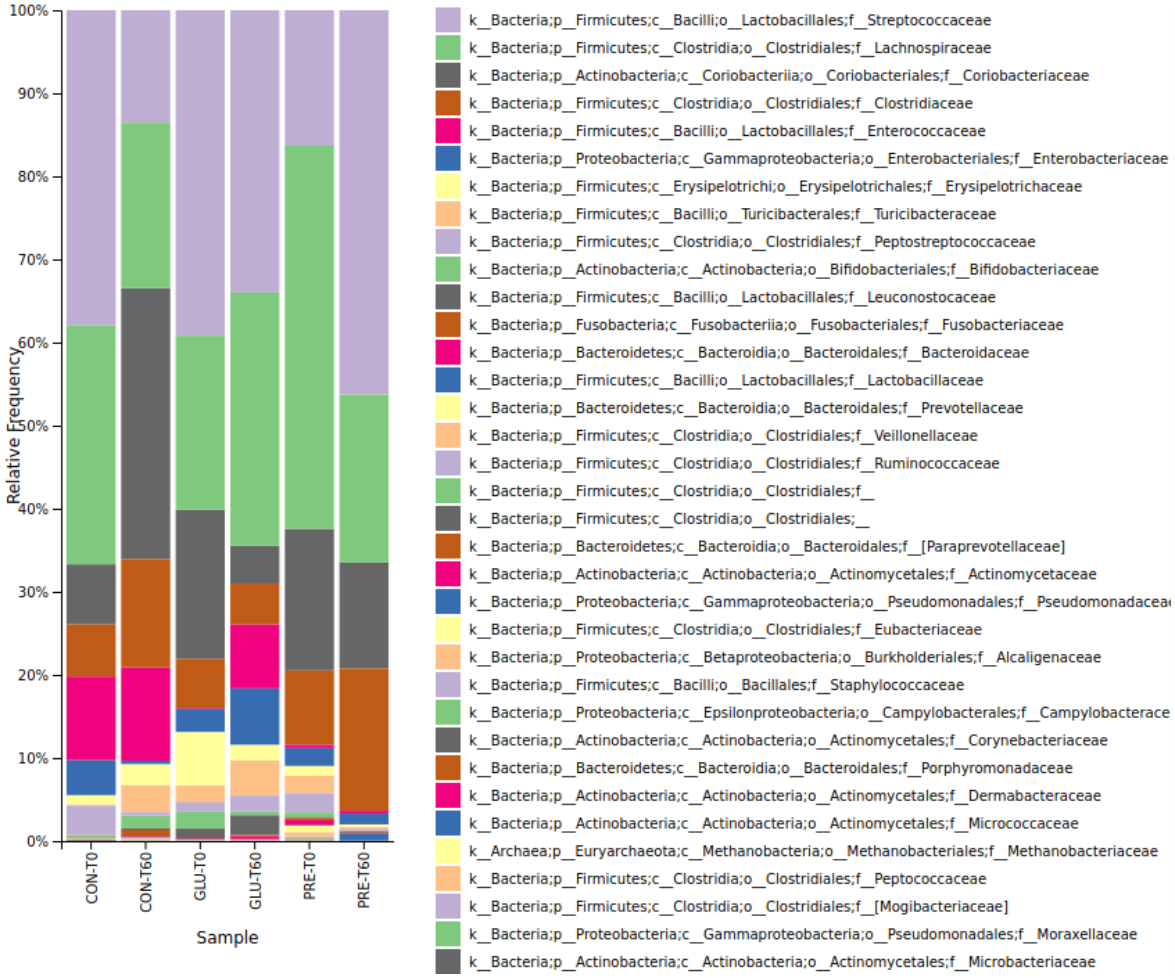
Legenda: CON = Grupo C – placebo; GLU = Grupo A – 0,1% β-glucano; PRE = Grupo B – *blend* (MOS + β-glucanos).

Figura 12. Composição relativa de ordens bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.



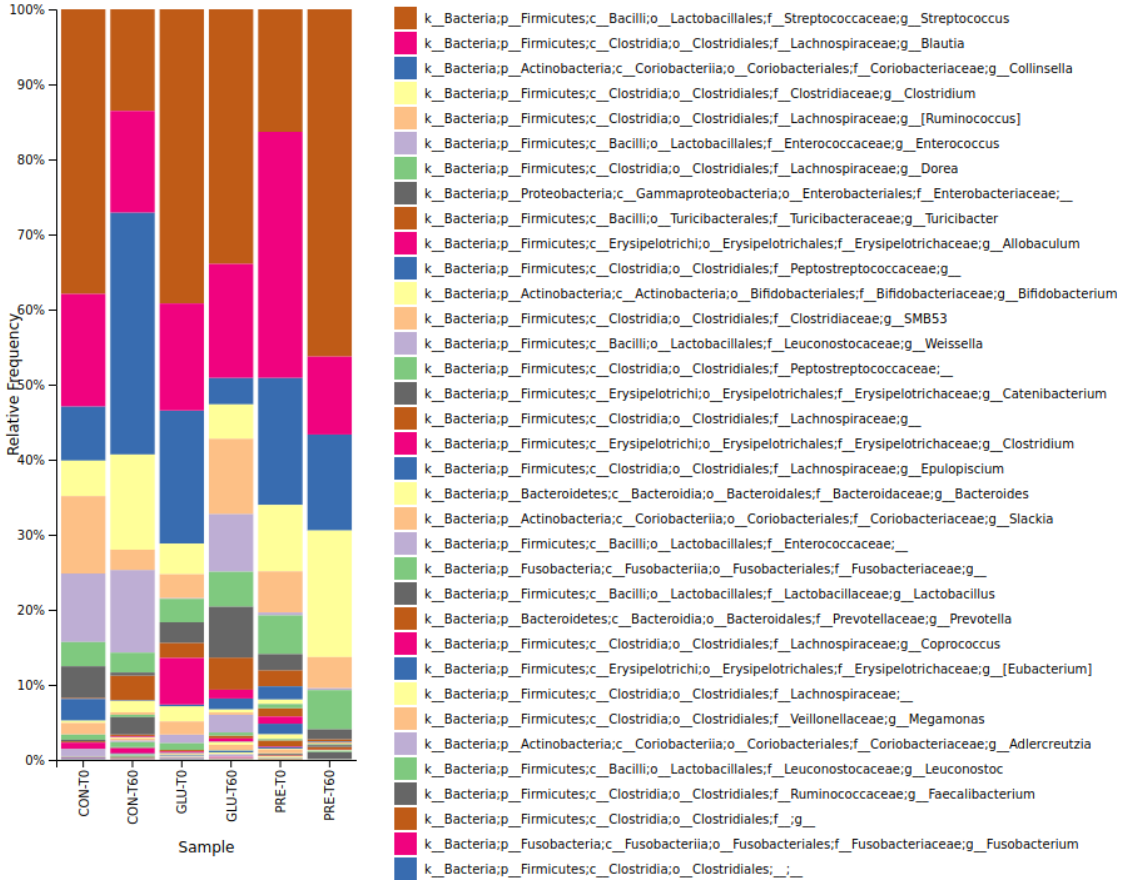
Legenda: CON = Grupo C – placebo; GLU = Grupo A – 0,1% β-glucano; PRE = Grupo B – *blend* (MOS + β-glucanos).

Figura 13. Composição relativa de famílias bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.



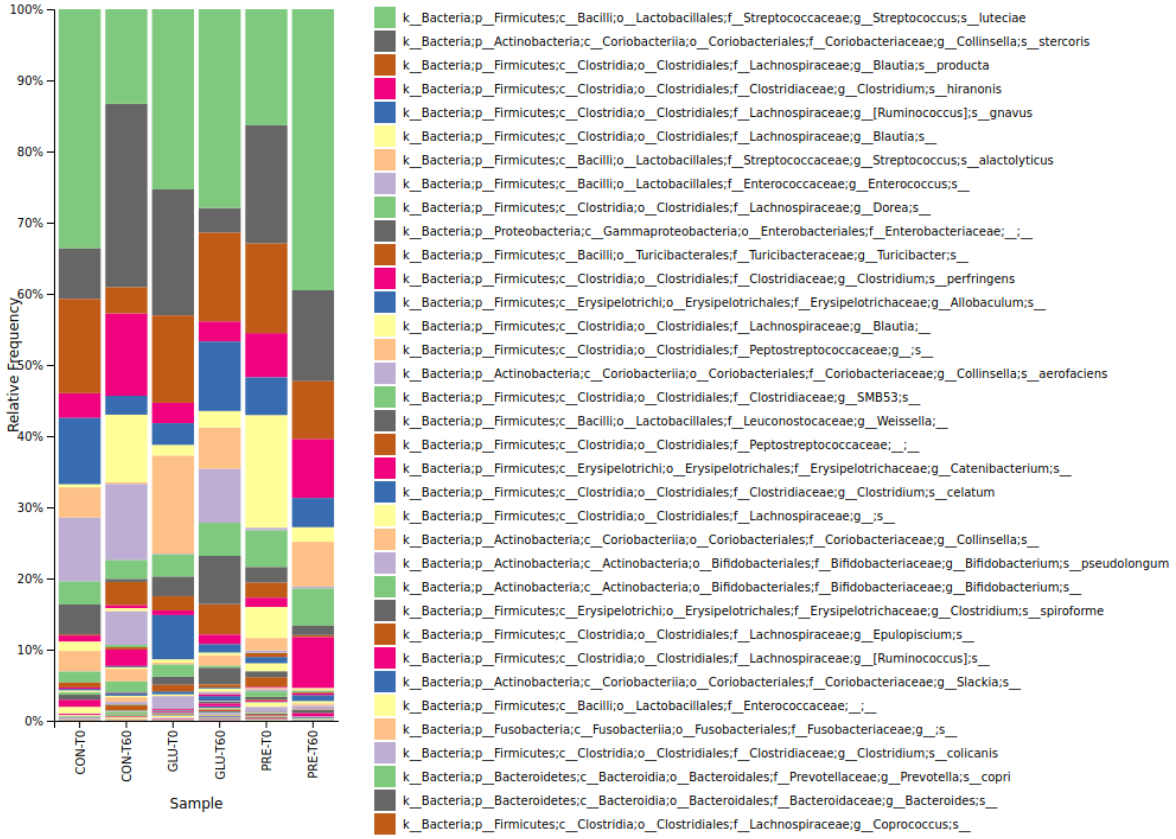
Legenda: CON = Grupo C – placebo; GLU = Grupo A – 0,1% β-glucano; PRE = *blend* (MOS + β-glucanos).

Figura 14. Composição relativa de gêneros bacterianos dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.



Legenda: CON = Grupo C – placebo; GLU = Grupo A – 0,1% β-glucano; PRE = Grupo B - *blend* (MOS + β-glucanos).

Figura 15. Composição relativa de espécies bacterianas dos três grupos experimentais nos tempos T0 e T60.



Legenda: CON = Grupo C – placebo; GLU = Grupo A – 0,1% β-glucano; PRE = Grupo B - *blend* (MOS + β-glucanos).