

VERÔNICA DOS SANTOS VANZO

**Efeito da adição de probiótico em alimento coadjuvante hipocalórico fornecido
para cães obesos submetidos a perda de peso**

São Paulo

2022

VERÔNICA DOS SANTOS VANZO

**Efeito da adição de probiótico em alimento coadjuvante hipocalórico fornecido
para cães obesos submetidos a perda de peso**

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:

Departamento de Clínica Médica (VCM)

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Márcia de Oliveira Sampaio
Gomes

São Paulo

2022

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4215 FMVZ	<p>Vanzo, Verônica dos Santos Efeito da adição de probiótico em alimento coadjuvante hipocalórico fornecido para cães obesos submetidos a perda de peso / Verônica dos Santos Vanzo. – 2022. 60 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2022.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária. Orientadora: Profa. Dra. Márcia de Oliveira Sampaio Gomes.</p> <p>1. Obesidade. 2. Simbiótico. 3. Modulação. 4. Microbioma. I. Título.</p>
-----------------	--



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da adição de probiótico em alimento coadjuvante hipocalórico fornecido para cães obesos submetidos a perda de peso", protocolada sob o CEUA nº 6511100221 (ID 008699), sob a responsabilidade de **Márcia de Oliveira Sampaio Gomes** e equipe; *Verônica dos Santos Vanzo; Layne Carolina Pereira* - 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 11/02/2021.

We certify that the proposal "Effect of adding probiotic to hypocaloric coadjuvant food provided for obese dogs subjected to weight loss", utilizing 24 Dogs (males and females), protocol number CEUA 6511100221 (ID 008699), under the responsibility of **Márcia de Oliveira Sampaio Gomes** and team; *Verônica dos Santos Vanzo; Layne Carolina Pereira* - 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 02/11/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2021** a **06/2022**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 14 anos**

N: **24**

Linhagem: **variável**

Peso: **6 a 60 kg**

Local do experimento: Os animais serão avaliados nas dependências do HOVET da FMVZ / USP.

São Paulo, 23 de agosto de 2021

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: VANZO, Verônica dos Santos

Título: **Efeito da adição de probiótico em alimento coadjuvante hipocalórico fornecido para cães obesos submetidos a perda de peso**

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: _____

Dedico este trabalho aos meus pais e marido. Não se vence uma batalha sozinha. E, mais uma vez estive acompanhada de pessoas amadas dispostas a doar forças para que eu pudesse lutar.

AGRADECIMENTOS

Pode parecer um agradecimento um tanto quanto vago, mas, sinto uma imensa vontade de gratificar a vida por ter me dado a oportunidade de chegar a este momento de conclusão do mestrado. O caminho dos últimos anos foi o mais difícil que percorri, até hoje e, sem minha família (humana e canina) talvez não houvesse uma conclusão. Então, ao meu marido, Ruan, meus pais, Albino e Geni e meus cães, Ariel, Rafa, Clarinha e Sandy, agradeço de todo meu coração pelo universo ter nos colocado juntos nessa jornada que é a vida.

À minha companheira de projeto, Layne, agradeço o enorme apoio e resiliência, que foram inspirações em muitos momentos para mim, foi uma grande sorte ter te conhecido. Ao Caio, agradeço por toda a experiência compartilhada, sempre com muita boa vontade em nos auxiliar. À minha orientadora, Márcia, agradeço primeiramente a oportunidade e, a todos os aprendizados e exemplo, que certamente levarei para além da vida acadêmica.

Agradeço também aos cães e seus responsáveis que participaram desse estudo, alguns dos quais pude acompanhar por muitos meses: Mel, Freddy, Dastan, Natalina, Moana, King, Millie, Luna, Malu, Duffy, Mel, Sofia, Chicão, Will, Jhujhu, Lolla, Princesa, Vitória, Kyra, Billy e Aslan.

Agradeço à Adimax pelo financiamento do projeto de pesquisa e à agência de fomento CNPq pela bolsa fornecida (nº do processo: 130228/2020-6). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Se existe uma força que alimenta a raiz da dor, ela é a recusa de aprender além do momento presente.”

Clarissa Pinkola Estés

RESUMO

VANZO, V.S. **Efeito da adição de probiótico em alimento coadjuvante hipocalórico fornecido para cães obesos submetidos a perda de peso.** 2022. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A obesidade é uma doença cronicamente associada a alterações metabólicas, hormonais e inflamatórias que, dentre diversos fatores predisponentes, discute-se sobre o papel do microbioma intestinal na sua gênese ou como potencial recurso terapêutico. Desse modo, os benefícios sobre a modulação bacteriana por meio do uso de probióticos, prebióticos e simbióticos são cada vez mais estudados em diferentes aplicações. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar os possíveis efeitos da adição de probiótico, em alimento seco hipocalórico, fornecido para perda de peso de cães obesos. Para tal, foram produzidos dois alimentos de igual composição, diferindo pela adição de ingrediente probiótico por cobertura em um deles. O uso destes alimentos de forma randomizada em pacientes obesos resultou na formação de dois grupos experimentais, controle (CON) e probiótico (PRO). Por meio da coleta de amostras fecais obtidas após o procedimento de perda de peso foi determinada a composição da microbiota fecal. Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros obtidos da perda de peso, assim como o perfil bioquímico (triglicérides, colesterol, frutossamina, glicemia, perfil renal e hepático), inflamatório (proteína C reativa e citocinas séricas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) e metabólico (insulina, leptina, glucagon, grelina, amilina, PPY, GLP1, CCK) dos animais. O projeto foi conduzido em um ensaio clínico prospectivo randomizado onde 14 cães obesos, classificados com escore de condição corporal (ECC) 8 ou 9 em uma escala de 9 pontos foram conduzidos mensalmente até que atingissem 20% de perda de peso ou o ECC ideal 5/9. Os grupos não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) com relação as métricas do programa de perda de peso, como: tempo para perda de peso ($p = 0,744$), taxa de perda de peso semanal ($p = 0,195$), quantidade de peso perdido ($p = 0,228$), bem como os parâmetros bioquímicos, inflamatórios e hormonais. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos e nas condições do estudo a adição do ingrediente probiótico não resultou em diferença para o tratamento da obesidade.

Palavras-chave: obesidade, simbiótico, modulação, microbioma

ABSTRACT

VANZO, V.S. **Effect of probiotic addition in hypocaloric adjunct food provided to obese dogs undergoing weight loss.** 2022. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Obesity is a disease chronically associated with metabolic, hormonal and inflammatory changes that, among several predisposing factors, discuss the role of the intestinal microbiome in its genesis or as a potential therapeutic resource. In this way, the benefits on bacterial modulation through the use of probiotics, prebiotics and symbiotics are increasingly studied in different applications. In this context, the present study aimed to evaluate the possible effects of adding probiotics to hypocaloric dry food provided for weight loss to obese dogs. To this end, two foods of the same composition were produced, differing by the addition of a probiotic ingredient by covering one of them. The use of these foods in a randomized manner in obese patients resulted in the formation of two experimental groups, control (CON) and probiotic (PRO). Through the collection of fecal samples obtained after the weight loss procedure, the composition of the fecal microbiota was determined. Additionally, the parameters obtained from weight loss were evaluated, as well as the biochemical profile (triglycerides, cholesterol, fructosamine, glycemia, renal and hepatic profile), inflammatory (C-reactive protein and serum cytokines IL-1 β , IL-6, IL -10 and TNF- α) and metabolic (insulin, leptin, glucagon, ghrelin, amylin, PPY, GLP1, CCK) of the animals. The project was conducted in a prospective randomized clinical trial where 14 obese dogs, classified as a body condition score (BCS) of 8 or 9 on a 9-point scale were conducted monthly until they reached 20% weight loss or the ideal BCS 5 /9. The groups showed no statistical difference ($p < 0.05$) in relation to weight loss program metrics, such as: time to weight loss ($p = 0.744$), weekly weight loss rate ($p = 0.195$), amount of weight lost ($p = 0.228$), as well as biochemical, inflammatory and hormonal parameters. Thus, based on the results obtained and under the conditions of the study, the addition of the probiotic ingredient did not result in a difference in the treatment of obesity.

Keywords: obesity, symbiotic, modulation, microbiome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microrganismos predominantes no trato gastrointestinal, urogenital e pele de cães saudáveis.....	22
Figura 2 - Sistema para determinação de ECC em cães.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química analisada na matéria seca, energia metabolizável e ingredientes ¹ dos alimentos PRO (A) e CON (B) secos hipocalóricos utilizados no experimento.....	28
Tabela 2 - Composição do aditivo probiótico Probiotic cães e gatos C.....	29
Tabela 3 - Panorama da participação dos animais incluídos no estudo.....	38
Tabela 4 - Valores descritivos das variáveis: idade, sexo, status reprodutivo, raça, tempo até a perda de peso, TPPS e peso meta, segundo o grupo de estudo.....	39
Tabela 5 - Percentual de cães classificados em cada ponto de ECC de acordo com o grupo e tempo do experimento.....	40
Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão da ingestão de Kcal/dia.....	41
Tabela 7 - Valores de média e desvio padrão do peso em kg, segundo o momento de avaliação e o grupo de estudo.....	41
Tabela 8 - Valores de média e desvio padrão das variáveis bioquímicas, de acordo com o momento e grupo do estudo.....	42
Tabela 9 - Valores de média e desvio padrão das variáveis inflamatórias, de acordo com o grupo e momento de avaliação.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers iniciadores para amplificação da região 16S.....	33
Quadro 2 - Iniciadores utilizados na detecção quantitativa de diferentes microrganismos em amostras fecais de cães.....	35

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PANORAMA SOBRE A OBESIDADE CANINA	
2.2 RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM A OBESIDADE	
2.3 USO COADJUVANTE DE PROBIÓTICO NO TRATAMENTO DA OBESIDADE	
3. HIPÓTESE.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
5.MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
5.2 ALIMENTO	
5.3 PROTOCOLO PARA PERDA DE PESO	
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL	
5.4.1 Extração do material genético	
5.4.2 Amplificação da região 16S (V4)	
5.4.3 Reação de indexação	
5.4.4 Purificação e quantificação da biblioteca	
5.4.5 Bioinformática	
5.5 PARÂMETROS AVALIADOS	
5.5.1 Hemograma e análises bioquímicas	
5.5.2 Perfil inflamatório e hormonal	
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	
6.RESULTADOS.....	38
6.1 PERFIL DOS ANIMAIS PARTICIPANTES E O PROCESSO DE PERDA DE PESO	
6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	
6.3 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E HORMONAIS	
6.4 DESISTENCIAS E REMOÇÕES DE INDIVÍDUOS DO PROJETO	
7.DISSCUSSÃO	46
7.1 PROGRAMA DE PERDA DE PESO	
7.2 EFEITOS DA ADIÇÃO PROBIÓTICA	

7.3 LIMITAÇÕES

8.CONCLUSÕES51

REFERÊNCIAS.....52

ANEXOS58

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo aborda de modo conexo os temas obesidade e microbioma intestinal canino. Ambos os assuntos muito relevantes na medicina veterinária atual. Até pouco tempo atrás a relação de microrganismos, como bactérias e fungos, com células do trato gastrointestinal foi estudada sob a perspectiva de enfermidade. No entanto, a modulação da microbiota através de probióticos, prebióticos e simbióticos, tem ganhado cada vez maior atenção pelo seu potencial no tratamento e/ou prevenção de diversas doenças.

Na história da ciência é relativamente recente um olhar para os microrganismos intestinais de acordo com a função que desempenham na saúde do hospedeiro. E embora ainda não seja esclarecida a relação de causalidade, sabe-se que a composição da microbiota é alterada em muitas enfermidades. A obesidade é uma dessas doenças em que sabidamente há um desequilíbrio no ecossistema bacteriano intestinal. O fato dessa temática ser um tópico contemporâneo, implica em um conhecimento ainda incerto sobre o assunto. Adicionalmente, a obesidade canina ganha cada vez maior espaço nas discussões na comunidade veterinária, justamente por ser uma afecção extremamente comum no presente momento. À vista desse contexto, estudos que abordam esses temas podem contribuir para um conhecimento aprofundado, o que foi primariamente prezado na execução desse projeto de pesquisa.

Ao longo do estudo questionou-se quais os efeitos que a adição de um probiótico provoca na microbiota de cães emagrecidos. A fim de responder esse questionamento foram produzidos dois alimentos secos hipocalóricos (um deles com adição probiótica) e fornecidos para perda de peso de cães obesos, de acordo com o protocolo estipulado. Através de amostras fecais coletadas após o procedimento de perda de peso foi determinada a microbiota intestinal dos animais participantes do experimento, sendo este, portanto, o objetivo primário desse trabalho. De modo secundário, procurou-se entender se a modulação da microbiota a partir da adição de um probiótico pode alterar parâmetros da perda de peso, assim como o perfil bioquímico, inflamatório e hormonal do animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA SOBRE A OBESIDADE CANINA

A obesidade é uma doença que apresenta uma tendência crescente de prevalência tanto na população humana como canina (GERMAN, 2006), sendo definida pelo excesso de tecido adiposo acumulado (ZORAN, 2010). Os adipócitos, células componentes desse tecido, compõem em sua totalidade um grande órgão endócrino que apresenta um metabolismo altamente dinâmico (DA SILVA et al., 2020). Dessa forma, o acúmulo excessivo das células adiposas está associado a alterações hormonais e metabólicas, evidenciando diversos riscos à saúde (ZORAN, 2010). Estudos relacionados a esta enfermidade apresentam cada vez maior importância devido ao posto que vem ocupando nos últimos tempos de doença nutricional mais comum em cães e gatos, propiciando várias comorbidades secundárias, assim como diminuição na qualidade e tempo de vida (LARSEN; VILLAVERDE, 2016).

O princípio da enfermidade está em um desbalanço energético, o que significa que frequentemente há um acúmulo calórico maior do que é requerido pelo organismo (WHO), ou que há o uso inadequado da energia ingerida pelo indivíduo (PREET et al., 2021). Diversos fatores podem contribuir para esta condição como a genética (em casos de algumas raças específicas como por exemplo, Labradores e Golden retrievers), sexo, idade, status reprodutivo, além de algumas enfermidades metabólicas (como endocrinopatias) e alguns medicamentos (ZORAN, 2010). Ademais, alterações na composição dos microrganismos residentes do trato gastrointestinal também estão associadas a obesidade (HANDL et al., 2013).

Múltiplos estudos com o propósito de determinar a prevalência do sobrepeso e obesidade em animais de companhia apresentaram resultados que variam entre 19,7-59,3% para os cães (CHANDLER et al., 2017). No Brasil, especificamente na cidade de São Paulo, a prevalência do sobrepeso e obesidade canina é de 40,5%, na devida ordem de 25,9% e 14,6% (PORSANI et al, 2020). Os números parecem acompanhar a prevalência de sobrepeso e obesidade em humanos, 39% e 13%, respectivamente, no ano de 2016 (WHO).

Corroborando com os fatos apresentados anteriormente, pesquisas encontraram uma forte correlação entre a condição corporal de humanos e a de seus

respectivos cães (LINDER; SANTIAGO; HALBREICH; 2021), indicando que o compartilhamento de hábitos semelhantes entre os humanos e seus pets, incluindo o sedentarismo e consumo de alimentos com alto teor calórico estão resultando em condições precárias de saúde e bem-estar para ambos (SODER et al., 2022).

O acúmulo excessivo de gordura corporal pode culminar em diversos malefícios ao organismo animal como o aumento do risco anestésico, alterações osteoarticulares, doença cardiorrespiratória, aumento da predisposição a neoplasias, assim como problemas no trato urinário (GERMAN, 2006). No contexto da obesidade, o tecido adiposo que é um regulador energético - participante do metabolismo de carboidratos e lipídeos - também um modulador das cascatas inflamatória e de coagulação, sofre alterações significativas (CLARK; HOENIG, 2016).

Nessas circunstâncias, é comumente evidenciada a ocorrência de uma resistência insulínica em cães obesos (CLARK; HOENIG, 2016), o que prejudica consideravelmente o controle e tratamento daqueles animais que possuem diabetes mellitus (DM), usualmente semelhante a DM tipo 1 em humanos, concomitante à obesidade (CHANDLER et al., 2017). E muito embora, nessa espécie a ocorrência de DM associada a resistência insulínica, semelhante a DM humana tipo 2, não seja totalmente esclarecida, pode sim haver uma conexão entre as duas comorbidades (CLARK; HOENIG, 2016).

A hiperlipidemia é outra condição frequentemente reportada em cães obesos, caracterizada pelo incremento na concentração plasmática de triglicérides e colesterol (JEUSETTE et al., 2005). Adicionalmente há um aumento de marcadores inflamatórios no sangue, como citocinas e interleucinas (proteína C reativa, IL6, TNF α) (CLARK; HOENIG, 2016), caracterizando a obesidade também como uma doença inflamatória de baixo grau, por vezes intitulada lipoinflamação (IZAOLA et al., 2015). A liberação dessas adipocinas pelo tecido adiposo está diretamente relacionada com o desencadeamento de afecções secundárias a obesidade - como é o caso da DM, osteoartrite, neoplasias (GERMAN et al., 2010).

Para o estabelecimento do diagnóstico dessa enfermidade existem diversos métodos disponíveis, porém, em muitos casos, com uma aplicabilidade bastante desfavorável na rotina clínica veterinária (PREET et al., 2021). Portanto, usualmente é realizado através da avaliação física do escore de condição corporal do animal (ECC) (LAFLAMME, 1997), que consiste em um sistema subjetivo e semiquantitativo

envolvendo a observação, palpação e estabelecimento de um ECC de 1 a 9 pontos pelo profissional veterinário (CHANDLER et al., 2017).

Considerando a obesidade primária (que não é provocada por outra doença ou medicação), o tratamento preconizado é a restrição calórica, viabilizando um balanço energético negativo que permite a metabolização do excesso de gordura acumulado (SHEPHERD, 2021). Nesse caso, o estabelecimento de uma dieta adequada é essencial para o sucesso do programa de perda peso (PPP), sendo importante que a formulação desse alimento seja específica para esse objetivo, como a restrição em calorias sem a limitação de nutrientes essenciais (LAFLAMME, 2006). Adicionalmente, sendo viável a associação de atividade física com a dieta pode-se obter maiores benefícios no processo de perda de peso, além de melhorar a qualidade de vida do animal (FLANAGAN et al., 2017).

Para um tratamento bem-sucedido muitos fatores são envolvidos, especialmente aqueles relacionados a mudança de hábitos e comportamentos dos responsáveis para com seus animais obesos. A adequação de um protocolo geral de perda de peso para as necessidades e expectativas individuais tem grande importância para o êxito do tratamento e posterior manutenção dos benefícios atingidos (GERMAN, 2016). Durante o processo de perda de peso são recomendadas visitas periódicas (quinzenais ou mensais) ao veterinário, para o monitoramento preciso da readequação do manejo alimentar e da aderência do responsável pelo animal à esta recomendação que, afinal, representam a chave para o êxito tanto do tratamento como da manutenção de uma condição corporal saudável do cão (CLINE et al., 2021).

O fato de o tratamento estar pautado, majoritariamente, na adequação da dieta pode transmitir, equivocadamente, a ideia de que é descomplicado, pois na prática implica muito esforço e empenho. Por consequência, falhas no tratamento são observadas com frequência, seja por desistência ou não cumprimento da prescrição (HANDL et al., 2013). Atingir a condição corporal ideal pode ser um processo difícil não somente para os responsáveis dos animais, mas também para os próprios cães, de forma que a prevenção deva ser a prioridade na medicina veterinária (SHEPHERD, 2021).

Tendo em vista os números alarmantes que a obesidade vem atingindo em todo o mundo além das consequências negativas relacionadas a afecção, é importante que o tema seja tratado na rotina veterinária desde a primeira consulta do animal (SHEPHERD, 2021). Dessa forma, pode-se atuar preventivamente através do cálculo correto da energia necessária para o organismo do indivíduo, isto posto, a quantidade de alimento (e petiscos, se for o caso) a ser fornecida diariamente, além da disseminação de informações nutricionais para os responsáveis dos pets (BERMINGHAM et al., 2014).

2.2 RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM A OBESIDADE

A microbiota do trato gastrointestinal de cães, embora distinta em número e variedade quando comparada a de humanos e outros animais (GRZESKOWIAK et al., 2015), também consiste em um complexo ecossistema que compreende microrganismos como bactérias, fungos, arqueas, protozoários e vírus. (AZAD et al., 2018; SUCHODOLSKI, 2011). Embora a ciência ainda não tenha esclarecido totalmente as multifacetadas interações desses microrganismos com o respectivo hospedeiro, sabe-se que a microbiota em equilíbrio está intimamente relacionada à saúde animal e humana (YOU; KIM, 2021).

Algumas das atribuições já conhecidas da microbiota intestinal no organismo incluem: o desenvolvimento adequado do sistema imunológico, manutenção da integridade da barreira intestinal, proteção contra a invasão de patógenos (CHAITMAN; GASCHEN, 2020), produção de vitaminas (AZAD et al., 2018), contribuição na capacidade de metabolização, aproveitamento energético e nutricional (HANDL et al., 2012), assim como a regulação da glicose e metabolismo lipídico (WIEERS et al., 2020).

Algumas bactérias integrantes da microbiota produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como seus produtos de fermentação (MONDO et al., 2019). Dentre os AGCC destacam-se o acetato, butirato e propionato, que constituem a principal fonte energética para os colonócitos e, cuja produção inadequada pode estar associada a desordens gastrointestinais (WONG et al., 2006). Adicionalmente, os AGCC auxiliam no fortalecimento da barreira epitelial, regulação da motilidade

intestinal, estímulo de produção de compostos anti-inflamatórios (MONDO et al., 2019), assim como modulam funções metabólicas (YOU; KIM, 2021).

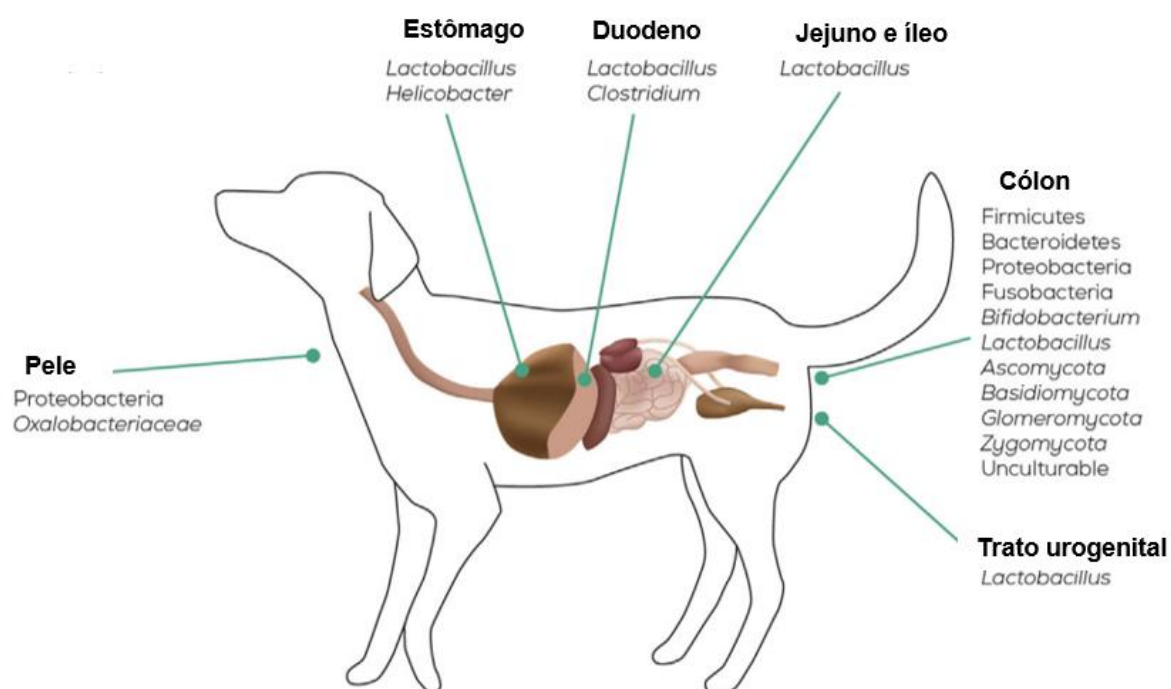
Dessa forma, a interação da microbiota com o hospedeiro é essencial para a manutenção da saúde do organismo como um todo (PATTERSON et al., 2016). Consequentemente, o funcionamento intestinal adequado está diretamente associado ao equilíbrio desse ecossistema (eubiose) (YOU; KIM, 2021). Em contrapartida, a disbiose (alteração quantitativa e qualitativa da microbiota) está relacionada com diversas doenças, tanto localizadas no próprio intestino como alterações sistêmicas (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020), abrangendo a obesidade (LEY et al., 2006).

Diversos fatores podem alterar esse microbioma como o ambiente no qual o animal vive, a idade - considerando que animais mais velhos apresentam uma diminuição na diversidade bacteriana intestinal (YOU; KIM, 2021), a dieta - uma alimentação que contempla adequadamente as necessidades nutricionais é responsável por uma maior diversidade da microbiota (PATTERSON et al., 2016), assim como características individuais (SUCHODOLSKI, 2011). Tal como o escore de condição corporal (ECC), outro fator relacionado a alteração de microbiota intestinal, diferindo entre cães obesos e em ECC ideal (CHUN et al., 2020), assim como em humanos obesos (SODER et al., 2022).

Para a identificação dos componentes bacterianos da microbiota intestinal é comumente utilizada a técnica de sequenciamento do gene 16S de RNA ribossomal (rRNA 16S), que consiste em um método relativamente rápido de ser realizado e preciso (RODICIO; MENDONZA, 2004). Essa é uma das técnicas moleculares que permitiu um avanço significativo no conhecimento microbiológico, tendo em vista que muitas bactérias eram desconhecidas por não ser viável a identificação pelo método de cultivo (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020).

Embora o aprimoramento de técnicas para identificação de microrganismos seja crescente, a determinação dos componentes da microbiota canina como um todo, ainda enfrenta limitações metodológicas. No entanto, sabe-se através do sequenciamento de rRNA 16S que os filos bacterianos predominantes em cães são: Firmicutes e Bacteroidetes, seguidos de Fusobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020). E em condição de obesidade, sabidamente, a diversidade bacteriana desses filos está diminuída, resultando em dificuldade na metabolização energética que consequentemente predispõe ao acúmulo de tecido adiposo (PATTERSON et al., 2016).

Figura 1 - Microrganismos predominantes no trato gastrointestinal, urogenital e pele de cães saudáveis



Fonte: Adaptado de GRZESKOWIAK et al., 2015

A mudança na ecologia bacteriana intestinal em quadros de obesidade parece predispor a uma maior extração de energia do alimento consumido. Um estudo com ratos obesos que tiveram sua microbiota transferida para ratos germ free, através do transplante fecal, mostrou que os receptores da nova microbiota passaram a apresentar maior adiposidade corporal, o que corrobora com a hipótese de maior extração energética do alimento, uma vez que nessa pesquisa não houve nenhuma alteração na dieta de todos os animais (LEY et al., 2006).

Em humanos obesos é consistentemente descrito um aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes, sucedendo uma alta relação Firmicutes/Bacteroidetes (F/B), retratada em diversos estudos com obesidade (SODER et al., 2022). Embora, as diferenças encontradas na microbiota de cães obesos ainda sejam controversas (YOU; KIM, 2021), recentemente demonstrou-se uma significativa mudança na diversidade bacteriana de cães obesos domiciliados após submissão a tratamento de perda de peso, com decaimento na relação F/B, assim como em humanos (SANCHEZ et al., 2020). A composição nutricional de uma dieta hipocalórica empregada para perda de peso, de modo geral, aumenta a proporção de Bacteroidetes e reduz a de Firmicutes (FONTANÉ et al., 2018).

Até o momento as pesquisas ainda são escassas para o completo entendimento de como ocorre essa interação microbiota-hospedeiro, especialmente na medicina veterinária, não sendo totalmente elucidados os mecanismos associados com a obesidade (MONDO et al., 2019). Entretanto, através de estudos com outros modelos animais estabeleceu-se dois meios principais para a promoção da obesidade a partir da microbiota: a alteração da homeostase do metabolismo energético, e o aumento da inflamação sistêmica. Sendo ainda inconclusivo o pretexto para essas alterações (FONTANÉ et al., 2018).

O conhecimento mais profundo sobre a patogenia da obesidade, especificamente com relação a microbiota, pode trazer muitos benefícios para o tratamento da afecção (HANDL et al., 2013). Pesquisas que esclareçam a relação dos microrganismos com o hospedeiro possibilitarão a modulação da microbiota em disbiose de maneira mais segura e assertiva (PILLA; SUCHODOLSKI, 2021). Atualmente, existem algumas formas de modulação da microbiota: através de modificações dietéticas, prebióticos, probióticos, antibióticos e transplante fecal (GREEN et al., 2020). Porém, essa manipulação não é inteligível, os resultados ainda são bastante diversos e, conseqüentemente exige-se muita cautela na utilização desse recurso (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020).

2.3 USO COADJUVANTE DE PROBIÓTICO NO TRATAMENTO DA OBESIDADE

A utilização de microrganismos com a finalidade de favorecer a saúde é uma prática antiga, datada de mais de meio século pelos chineses. No entanto, um maior interesse pela ciência da aplicação de cepas específicas para uma prerrogativa clínica tem completado apenas poucas décadas (WIEERS et al., 2020). Atualmente os probióticos ocupam mundialmente o posto de um dos suplementos alimentares mais consumidos pela população humana, despertando cada vez maior interesse e movimentando uma enorme indústria (SUEZ et al., 2019).

A coexistência e proximidade dos animais de companhia com seus responsáveis humanos desperta igual interesse nos benefícios que a suplementação probiótica pode trazer para a saúde e bem-estar desses animais, especialmente cães e gatos (GRZESKOWIAK et al., 2015). Na medicina veterinária, em particular no âmbito da pecuária o uso de probióticos é bastante amplo e frequente. No entanto, a

aplicação na prática clínica e o conhecimento sobre os reais benefícios na nutrição de pequenos animais ainda está em desenvolvimento (MONDO et al., 2019).

No Brasil, os probióticos destinados ao consumo animal são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e são definidos como um aditivo zootécnico, composto de microrganismos que são administrados enquanto viáveis e em quantidade adequada para auxiliar no equilíbrio da microbiota intestinal (MAPA, 2004). Esses microrganismos, usualmente bactérias, atuam compartilhando genes e metabólitos propícios ao microbioma, promovendo efeitos benéficos ao organismo sem necessariamente provocar grandes alterações na microbiota (WIEERS et al., 2020), bem como sem colonizá-la permanentemente (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020).

Previamente a afirmação de benefícios ou malefícios à saúde são necessárias considerações sobre algumas características inerentes ao probiótico, como: conhecer o gênero, espécie e cepa do microrganismo, assim como a realização de testes *in vitro* e *in vivo* para determinação dos efeitos favoráveis, adversos e, inclusive, contraindicações (FAO/WHO, 2001). Embora os probióticos sejam utilizados com relativa segurança há alguns anos, não são conhecidos com exatidão os efeitos inequívocos para saúde, particularmente em contextos de imunocomprometimento, doenças que alterem a barreira gastrointestinal, neonatos, idosos e com relação a um longo período de utilização do produto (SUEZ et al., 2019).

Os microrganismos componentes de um produto probiótico interagem com o organismo hospedeiro ao se ligarem em receptores celulares intestinais (por exemplo, receptores toll-like) e, a atuação desses microrganismos é bastante complexa, contando com diversos mecanismos de atividade como: imunomodulação, proteção contra o estresse fisiológico, redução de endotoxemia e inflamação, supressão de patógenos por exclusão competitiva e o melhoramento da função da barreira epitelial (FONTANÉ et al., 2018; SUEZ et al., 2019).

Diversas publicações demonstraram que a modificação do microbioma intestinal provoca alterações também no metabolismo energético do hospedeiro (WIEERS et al., 2020), o que destaca a utilização desse recurso para a obesidade, uma vez que se sabe que o microbioma de um indivíduo obeso tem particular dificuldade nessa metabolização, predispondo ao acúmulo de gordura (PATTERSON et al., 2016). Estudos apontam que alguns probióticos poderiam atuar modulando a

expressão de genes relacionados a lipogênese e lipólise, modificando a absorção e excreção de gordura no organismo (FONTANÉ et al., 2018).

De certa forma, os probióticos têm se mostrado úteis na prevenção e tratamento, na medicina veterinária, de quadros gastrointestinais (como diarreias agudas, doença inflamatória intestinal), alergias (como dermatite atópica) e, têm sido bastante estudados com relação ao seu potencial como recurso terapêutico em quadros infecciosos do trato urinário e obesidade (GRZESKOWIAK et al., 2015). Outra aplicabilidade promissora dos produtos probióticos pode também estar relacionada a prevenção de colonização bacteriana multirresistente a antibióticos utilizados na rotina clínica (WIEERS et al., 2020).

Progressivamente as evidências atuais têm demonstrado que a modulação da microbiota de um indivíduo obeso, seja através de um probiótico, prebiótico ou simbiótico, pode auxiliar e favorecer o tratamento dessa enfermidade, ao influenciar o funcionamento do metabolismo do hospedeiro (DA SILVA et al., 2020). Estudos realizados com modelos roedores obesos corroboraram que a utilização de probióticos com diferentes tipos de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* promoveram efeitos benéficos como a diminuição de massa gorda, redução nos níveis de leptina – associada a regulação de ingestão alimentar (ABENAVOLI et al., 2019; DA SILVA et al., 2020) – diminuição da resistência insulínica e diminuição da colesterolemia (FONTANÉ et al., 2018).

Embora os estudos sobre probióticos para animais de companhia sejam mais limitados comparados àqueles destinados para o uso humano (GRZESKOWIAK et al., 2015), já é conhecido o papel positivo de algumas bactérias probióticas para pets como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* (GASPARDO et al., 2020). Um estudo piloto demonstrou que a administração de *Lactobacillus gasseri* BNR17 pode, futuramente, ser um potencial auxiliador no tratamento de cães obesos por alterar a composição corporal ao diminuir massa gorda e melhorar o metabolismo energético (LEE et al., 2022).

Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* representam, de fato, as espécies mais promissoras de probióticos para humanos e animais (GRZESKOWIAK et al., 2015; AZAD et al., 2018), podendo, inclusive, desenvolver um papel preventivo de doenças degenerativas, obesidade, DM, entre outras. Em uma abordagem generalizada, as espécies de *Lactobacillus* podem desempenhar um papel protetivo em processos inflamatórios do organismo (estimulando a produção de IL 10, IL 17, IL 22, que são

citocinas anti-inflamatórias). Assim como, as espécies de *Bifidobacterium* podem melhorar a barreira intestinal e aumentar a capacidade metabólica (AZAD et al., 2018). A *Enterococcus faecium* também merece destaque por estar presente em muitos produtos probióticos para cães (GRZESKOWIAK et al., 2015), e parece ter propriedades imunomoduladoras nesses animais (SIMPSON et al., 2009).

Embora alguns ensaios clínicos tenham demonstrado resultados positivos da modulação do microbioma obeso através de probióticos, ainda é necessário apurar as demais variáveis componentes da interação múltipla entre bactérias e o trato intestinal animal (como a diversidade de dieta, sexo, idade e ambiente) (ABENAVOLI et al., 2019). Os resultados encontrados até o momento ainda são muito heterogêneos e incomparáveis, devido ao contexto da aplicação de uma infinidade de cepas, associações probióticas diversas e diferentes condições de experimento (WIEERS et al., 2020). Além disso, é necessário o esclarecimento de quais as cepas de microrganismos probióticas são de fato benéficas para o uso em casos de obesidade, bem como a dose e o tempo de utilização recomendados (FONTANÉ et al., 2018).

3. HIPÓTESE

A hipótese do estudo é que a adição de um produto probiótico, em alimento para perda de peso de cães obesos, promova alterações benéficas na microbiota dos mesmos animais após tratamento para emagrecimento. A hipótese secundária é a de que a inclusão probiótica no tratamento para obesidade possa contribuir no processo de perda de peso, como a diminuição no tempo de tratamento.

4. OBJETIVOS

O objetivo primário do estudo é avaliar a composição da microbiota de cães obesos após o tratamento para emagrecimento e comparar os resultados entre o grupo de animais que recebeu o alimento hipocalórico para perda de peso sem probiótico e o grupo que recebeu o mesmo alimento com a adição probiótica. De modo secundário, procurou-se entender se a modulação da microbiota a partir da adição de um probiótico pode alterar parâmetros da perda de peso, assim como o perfil bioquímico, inflamatório e hormonal do animal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais participantes desse estudo foram recrutados através dos serviços hospitalares de pequenos animais do HOVET FMVZ USP e, a partir da divulgação em redes sociais. Todos os cães passaram por uma triagem presencial e somente participaram do projeto pós ciência e autorização dos seus respectivos responsáveis, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que foi disponibilizado e previamente explanado. O projeto foi viabilizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e sob aprovação da Comissão de Ética e Uso de Animais e Comissão de Ética Hospitalar da FMVZ USP (CEUA FMVZ), protocolada sob o número CEUA 6511100221.

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL










Inicialmente, os cães foram submetidos ao processo de triagem que incluía exames físico, hematológico (hemograma com contagem de plaquetas) e bioquímico (ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, proteínas totais, albumina, triglicérides e colesterol). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da FMVZ USP, com o objetivo de descartar doença sistêmica que pudesse interferir na condição corporal e muscular do cão, ou que pudesse prejudicar o processo de perda de peso. Desse modo, somente animais sem comorbidades, com exceção da obesidade, foram empregados no estudo.

O sexo e castração não foram critérios de exclusão. Anteriormente à coleta dos exames laboratoriais de triagem os animais eram avaliados de acordo com seus históricos e precisavam corresponder aos atributos de idade (>1 ano), última utilização de antibióticos superior a 6 meses e serem diagnosticados com obesidade (ECC 8/9 ou 9/9) de acordo com a classificação de ECC (Figura 2) descrita por LAFLAMME et al. (1997). Desse modo, somente após a exclusão de alterações metabólicas possivelmente detectadas pelas análises de triagem os animais que atendiam aos critérios eram inclusos no experimento.

O projeto foi conduzido em um ensaio clínico prospectivo randomizado onde os animais elegíveis foram divididos de modo aleatório em dois grupos (PRO – alimento com adição probiótica, denominado alimento A; e CON – alimento controle, sem

adição probiótica, denominado alimento B). Os participantes tiveram reavaliações mensais para o acompanhamento da perda de peso e execução de ajustes, caso necessário, no manejo alimentar. Durante esses retornos eram realizadas pesagem, determinação da taxa de perda de peso semanal (TPPS), ECC e determinação do escore de massa muscular (EMM), de acordo a descrição em escala de 0 a 3, por Michel et al. (2011).

Figura 2 - Sistema para determinação de ECC em cães

MAGRO DEMAIS	1	Costelas, vértebras lombares, ossos pélvicos e todas as proeminências ósseas visíveis à distância. Ausência de gordura corporal perceptível. Perda de massa muscular evidente.	 	6	Costelas palpáveis com leve excesso de cobertura adiposa. Cintura visível quando vista de cima, mas não é acentuada. Reentrância abdominal aparente.		
	2	Costelas, vértebras lombares e ossos pélvicos facilmente visíveis. Ausência de gordura palpável. Algumas proeminências ósseas podem estar visíveis. Perda mínima de massa muscular.		7	Costelas palpáveis com dificuldade; grossa cobertura adiposa. Depósito de gordura evidente sobre a área lombar e a base da cauda. Cintura ausente ou sutilmente visível. A reentrância abdominal pode estar presente.	 	
	3	Costelas facilmente palpáveis e podem estar visíveis sem gordura palpável. Ossos pélvicos tornando-se visíveis. Topo das vértebras lombares visível. Cintura e reentrâncias abdominais evidentes.	 	PESADO DEMAIS	8	Impossível palpar as costelas situadas sob cobertura adiposa muito densa ou palpáveis somente com pressão acentuada. Denso depósito de gordura sobre a região lombar e a base da cauda. Cintura inexistente. Ausência de reentrância abdominal, podendo existir distensão abdominal evidente.	
IDEAL	4	Costelas facilmente palpáveis com cobertura adiposa mínima. Vista de cima, a cintura é facilmente observada. Reentrância abdominal evidente.			9	Depósitos de gordura maciços sobre tórax, espinha e base da cauda. Depósitos de gordura no pescoço e membros. Distensão abdominal evidente.	 
	5	Costelas palpáveis sem cobertura adiposa excessiva. Vista de cima, a cintura é observada atrás das costelas. Abdome retraído quando visto de lado.	 				

Fonte: Diretrizes para avaliação nutricional, WSAVA (2011)

Os retornos tinham como objetivo proporcionar uma perda de peso saudável, eficaz, e com a manutenção da massa muscular do animal. Para a finalização e alta do programa de perda de peso foi inicialmente determinado que uma das seguintes metas deveria ser alcançada: atingir ECC 5/9, considerado o ECC ideal para cães, ou perder no mínimo 20% do peso corporal inicial.

No momento da inclusão e finalização do estudo os cães foram submetidos à coleta de fezes frescas para análise de microbiota, dosagem bioquímica sérica incluindo frutossamina, glicemia, triglicérides, colesterol, perfil hepático (ALT, FA, PT) e renal (ureia e creatinina). Assim como, avaliações do perfil hormonal do metabolismo de carboidratos e saciedade (incluindo: insulina, leptina, glucagon, grelina, amilina,

PPY, GLP1, CCK) e do perfil inflamatório (incluindo: proteína C reativa e citocinas séricas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α).

5.2 ALIMENTO

Para realização do programa de perda de peso foi produzida uma dieta extrusada coadjuvante hipocalórica experimental (Tabela 1), formulada de forma a atender as necessidades nutricionais de um cão adulto de acordo com os valores apresentados pela FEDIAF (2018). A ração seca foi disponibilizada nas formas A e B, sendo que o alimento A (grupo PRO) foi acrescido de um probiótico (Tabela 2) por cobertura e o alimento B (grupo CON) apresentava a mesma composição, porém sem a adição probiótica. Os pacotes de ração fornecidos de forma controlada para os responsáveis durante o processo de perda de peso de seus animais, e eram identificados somente por “alimento A” ou “B”, sendo duplo-cego a composição da dieta que estava sendo ofertada.

O aditivo probiótico foi adicionado ao alimento A somente após o processo de extrusão da ração. O produto comercial é denominado Probiotic cães e gatos C, sob registro no MAPA nº SP- 0538730018. As cepas componentes desse produto, de acordo com o fabricante, foram adquiridas de coleções e culturas de microrganismos de referências nacionais e internacionais mantidas no laboratório industrial de biotecnologia da Biomart Nutrição Animal (Tabela 2).

Tabela 1 - Composição química analisada na matéria seca, energia metabolizável e ingredientes¹ dos alimentos PRO (A) e CON (B) secos hipocalóricos utilizados no experimento

Item	%
Umidade	5,01
Proteína Bruta	34,86
Extrato Etéreo	9,75
Extrativos Não Nitrogenados	37,11
Matéria Mineral	8,58
Matéria Fibrosa	9,70
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3.022,00

FONTE: VANZO,2022

¹Carne de frango, carne de mecanicamente separada de frango, fígado de frango, farinha de vísceras de aves, fécula de mandioca, farinha de mandioca, levedura seca de cerveja, fibra de cana de açúcar, polpa de beterraba, farelo de goiaba, maçã e tomate desidratados, óleo de aves, óleo de salmão, hidrolisado de fígado, semente de linhaça, cloreto de sódio, farinha de algas Schizochytrium sp., zeolita, prebióticos (parede celular de levedura, fruto-oligossacarídeos e inulina), extrato de yucca, colágeno

hidrolisado (2,5%), sulfato de condroitina, sulfato de glucosamina, vitaminas (retinol, colecalciferol, vitamina E, menadiona bissulfito de sódio, ácido ascorbico, tiamina, riboflavina, piridoxina, cianocobalamina, biotina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina, cloreto de colina), minerais (sulfato de ferro, sulfato de cobre, iodato de cálcio, cloreto de potássio, proteinato de zinco, óxido de zinco, óxido de manganês, proteinato de selênio, selenito de sódio), lisina, metionina, taurina, triptofano, L-carnitina, extratos de chá verde, alecrim e cúrcuma, concentrado de tocoferóis (antioxidante natural) (0,01%). Vitamina A 24.000UI; Vitamina D3 1.800UI; Vitamina E 300UI; Vitamina C 150mg; Vitamina K3 0,15mg; Vitamina B1 4,5mg; Vitamina B2 6,0mg; Vitamina B6 3,0mg; Vitamina B12 36mcg; Biotina 0,11mg; Ácido Pantotênico 15mg; Ácido Fólico 0,3mg; Niacina 24mg; Colina 600mg; Ferro 60mg; Cobre 7,5mg; Iodo 2,1mg; Potássio 500mg; Manganês 17,5mg; Zinco 90mg; Zinco quelato 45mg; Selênio 0,3mg; Selênio quelato 0,15mg.

Tabela 2- Composição do aditivo probiótico Probiotic cães e gatos C

Gênero e espécie	Contagem total UFC/g (mínimo)
Bacillus subtilis	1,2 x 10 ⁹
Bifidobacterium bifidum	1,2 x 10 ⁹
Enterococcus faecium	2,4 x 10 ⁹
Lactobacillus acidophilus	3,0 x 10 ⁹
Lactobacillus casei	2,4 x 10 ⁹
Lactobacillus lactis	1,8 x 10 ⁹
UFC/g total	1,2 x 10 ¹⁰

Fonte: VANZO, 2022

5.3 PROTOCOLO PARA PERDA DE PESO

Os animais receberam a dieta de forma controlada durante todo o ensaio. Para calcular a quantidade de calorias que deveriam ser fornecidas diariamente ao animal foi realizado o cálculo da necessidade energética para perda de peso (NEPP), cuja fórmula utilizada para estimativa foi (CLINE, 2021):

$$NEPP \left(\frac{\text{kcal}}{\text{dia}} \right) = 70 \times \text{peso meta}^{0,75}$$

De acordo com Laflamme et al. (2006) os cães que durante o exame físico foram classificados com ECC 8/9 e 9/9 apresentam aproximadamente 20% de acréscimo de gordura corporal. Dessa forma, nesse estudo o peso meta (PM) para os animais obesos foi determinado a partir da subtração de 20% do peso corporal inicial do animal, conforme a seguinte equação:

$$PM = \text{peso corporal} \times 0,8$$

Dessa forma, após determinado, o valor da NEPP, para cada animal era dividido pela energia metabolizável do alimento (3000 kcal/kg), de modo a definir a

quantidade em gramas que deveria ser fornecida diariamente. Os responsáveis eram instruídos a pesar em balança digital de cozinha a quantidade de alimento oferecida a fim de garantir que a prescrição estava sendo seguida corretamente. Petiscos e outros alimentos deveriam ser suspensos durante todo o tratamento. Não houve restrição em relação ao consumo de água.

Os cães foram reavaliados mensalmente para acompanhamento da perda de peso e, a quantidade de alimento era ajustada de acordo com a taxa de perda de peso semanal (TPPS) obtida. O intuito era manter a TPPS entre 1,0 e 2,0% de modo que o processo de perda de peso não demorasse muito, ou fosse rápido demais de modo a prejudicar a saúde do animal. Para determinação da TPPS pode-se utilizar a seguinte equação:

$$TPPS = \frac{\frac{\text{peso da última consulta} - \text{peso atual}}{\text{peso da última consulta}}}{\text{Número de semanas}} \times 100$$

Os reajustes e acompanhamentos foram conduzidos dessa forma até o momento em que os animais atingissem o ECC ideal (5/9) ou 20% de perda do peso inicial.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL

Para identificação dos componentes da microbiota foram coletadas amostras fecais no tempo final T2 do programa de perda de peso. As amostras foram coletadas ainda frescas, imediatamente após a defecação, de forma asséptica através do uso de luvas para procedimentos cirúrgicos e acondicionamento em recipiente estéril. Em seguida, foram congeladas diretamente em freezer -80°C até o envio para o laboratório BPI Biotecnologia Pesquisa e Informação, onde foram realizadas as análises, após os animais terem completado o programa de emagrecimento.

A metodologia aplicada para identificação dos microrganismos foi a técnica de sequenciamento de rRNA 16S, a partir da análise do DNA das amostras fecais e da amplificação pelo PCR real time.

5.4.1 Extração do material genético

A primeira parte do procedimento consiste na extração do DNA total de cada amostra para a qual foi utilizado o kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research cód. D6005) de acordo com o protocolo do fabricante.

5.4.2 Amplificação da região 16S (V4)

O próximo passo corresponde a amplificação de gene a partir das amostras, com reações em cadeia de polimerase (PCR) em termociclador feitas com base em uma mistura composta por 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3µM de oligonucleotídeo forward, 0,3µM de oligonucleotídeo reverse, 1µL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para completar o volume final de 20µL.

O termociclador utilizado para conduzir as reações foi o Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) e o processo é composto pelas seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 55°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para a reação de amplificação da região 16S foram utilizados dois primers iniciadores descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Primers iniciadores para amplificação da região 16S

Iniciador	Sequência 5'- 3'
16s V4 – F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16s V4 – R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT

5.4.3 Reação de indexação

A próxima etapa consiste na determinação da sequência de nucleotídeos da amplificação. Dessa forma, foi realizada a amplificação de cada amostra ampliada na etapa anterior através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,3% (v/v). Em seguida, foram inseridos os indexadores nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de clusters e, por fim, sequenciamento das amostras. Esta reação é denominada indexação e foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina).

5.4.4 Purificação e quantificação da biblioteca

As bibliotecas geradas na etapa anterior foram submetidas à uma purificação para remoção de fragmentos muito pequenos e restos de primers, através do uso de bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Logo após foi realizada a quantificação pela metodologia de PCR real time utilizando o kit KAPA – KK4824 (Library Quantification Kit – Illumina/Universal), de acordo com o protocolo do fabricante.

Seguidamente, o pool equimolar de DNA gerado através da normalização de todas as amostras a 3nM foi submetido ao sequenciamento que, por sua vez, 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.

5.4.5 Bioinformática

Para completar o processo de identificação é necessário comparar as sequências obtidas anteriormente com uma base de dados. Esta etapa é denominada bioinformática, na qual as análises foram realizadas através da plataforma QIMME2 versão 2019.10. As leituras forward e reverse foram sobrepostas com o programa Flash (CCB, Johns Hopkins University), usando como mínimo de sobreposição, 8 pares de bases. Em seguida, as sequências foram limpas dentro da plataforma QIIME2, pelo programa DADA2, retirando-se 20 pares de bases do início, representando o oligonucleotídeo “forward” e 20 pares do final, representando o oligonucleotídeo “reverse”.

Para minimizar a detecção de microrganismos semelhantes incorretos foi utilizada a estratégia de agrupamento de sequências (OTU). Essas OTUs foram selecionadas levando-se em conta 99% de similaridade como limite e, de cada uma foi extraída uma sequência representativa. Posteriormente, essas sequências foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética – que de forma esquemática retrata o grau de parentesco genético entre os microrganismos analisados (RODICIO; MENDONZA, 2004).

Para a análise taxonômica existem diversos bancos de dados disponíveis e, no caso desse estudo, as sequências representativas foram comparadas com o banco

de dados GreenGenes versão 13.8 (Quadro 2). As unidades taxonômicas (táxons) significativamente diferentes entre as amostras, controle e teste, foram selecionadas através do método “Analysis of composition of microbiomes (ANCOM)” (MANDAL et al., 2015).

Quadro 2 - Iniciadores utilizados na detecção quantitativa de diferentes microrganismos em amostras fecais de cães

Microrganismo	Iniciadores 5'- 3'	Referência
<i>Bifidobacterium</i> spp.	GCGTGCTTAACACATGCAAGTC CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	PENDERS et al. (2005)
<i>Escherichia coli</i> – <i>Hafnia alvei</i> e <i>Shigella</i> spp.	GTTAATACCTTTGCTCATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	MALINEN et al. (2003)
<i>Clostridium perfringens</i>	AAAGATGGCATCATCATTCAAC TACCGTCATTATCTTCCCCAAA	WANG et al. (1994)
<i>Campylobacter</i> spp.	CACGTGCTACAATGGCATAT GGCTTCATGCTCTCGAGTT	LUND et al. (2004)
<i>Salmonella</i> spp.	TCGTCATTCCATTACCTACC AAACGTTGAAAACTGAGGA	NAM et al. (2005)
<i>Lactobacillus</i> spp.	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	WALTER et al. (2001); HEILIG et al. (2002); CARROLL et al. (2010)

5.5 PARÂMETROS AVALIADOS

5.5.1 Hemograma e análises bioquímicas

No processo de triagem foram realizadas análises hematológica (hemograma com contagem de plaquetas) e bioquímicas (perfil hepático e renal, triglicérides e colesterol). No momento inicial e final do projeto (T1 e T2) as análises bioquímicas eram complementadas com a dosagem de glicose e frutamina séricas. O hemograma e análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Patologia Clínica do HOVET da FMVZ USP, conforme a metodologia aplicada no mesmo. Para realização do hemograma com contagem de plaquetas foram coletados 1mL de sangue colocado em tubo com anticoagulante EDTA.

Para mensuração da glicemia foi coletado 1mL de sangue disposto em tubo com fluoreto de sódio e, as concentrações plasmáticas foram determinadas por teste de glicose oxidase pelo kit Labtest. Da mesma forma, 1mL de sangue foi inserido em

tubo seco sem anticoagulante para determinação da frutossamina, através de kit Biosystems.

Para realização das demais análises bioquímicas foram coletadas 3mL dispostos em tubo seco, tanto no início como no final do projeto de pesquisa. A mensuração de proteínas totais, albumina, ureia, creatinina e colesterol foram realizados com kits Labtest. Enquanto FA, ALT e triglicérides foram realizados com kits Biosystems.

5.5.2 Perfil inflamatório e hormonal

Os perfis hormonal e inflamatório também foram realizados nos tempos T1 e T2 do experimento. O perfil hormonal, nesse estudo, é composto pelas análises de insulina, leptina, glucagon, grelina, PPY, GLP1, CCK e amilina. Enquanto o perfil inflamatório é constituído pelas análises de IL10, IL6, IL1 β , PCR e TNF α . Todas as análises foram realizadas no LEAC (Laboratório especializado em análises clínicas), São Paulo/SP, sendo que para CCK, PCR e IL1 β foi utilizada a metodologia ELISA e, para as demais análises (insulina, leptina, glucagon, grelina, PPY, amilina, GLP1, IL10, IL6 e TNF α) foram utilizados painéis Multiplex (CGTMAG-98K-03).

Para determinação específica de GLP1, grelina, amilina e glucagon foram coletados 4 ml de sangue dispostos em tubo seco e adicionados reagentes inibidores. Imediatamente após cada coleta foram adicionados os inibidores da seguinte forma: 10 μ L do inibidor Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV: EC 3.4.14.5) por mL de sangue coletado, para dosagem de GLP1; 10 μ L do inibidor Pefabloc® SC (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, AEBSF) por mL de sangue coletado, para dosagem de grelina ativa; 20 μ L do inibidor MS-SAFE Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail por mL de sangue coletado, para dosagem de amilina e glucagon.

Para as demais análises foram coletados 4ml de sangue também dispostos em tubo seco, mas sem nenhuma adição de reagente. As amostras sanguíneas coletadas precisavam permanecer à temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos antes do processamento. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 1000xg e as alíquotas foram armazenadas em eppendorfs em freezer -20°C até o momento em que foram enviadas para o LEAC onde foram feitas as análises.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros avaliados foram tabulados e apresentados como média e erro padrão da média para dados paramétricos, e mediana com valores mínimos e máximos para dados não paramétricos. Para as variáveis qualitativas foram calculadas as frequências absolutas e relativas.

Os dados foram verificados de acordo com as pressuposições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos erros através do teste de Shapiro-Wilks. Para a comparação de médias de dois grupos foi utilizado o teste t de Student, quando a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. E, para testar a homogeneidade entre as proporções foi utilizado o teste exato de Fisher (ROSNER, 1986).

Para a comparação dos grupos ao longo das avaliações foi utilizada a Análise de Variância com medidas repetidas (TIMM, 1975). O software utilizado para os cálculos foi o SPSS 17.0 for Windows. Para todos os testes o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Para análise dos dados de microbiota foi utilizada a metodologia descrita no tópico “3.5.2 Bioinformática” acima e, da mesma forma as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 PERFIL DOS ANIMAIS PARTICIPANTES E O PROCESSO DE PERDA DE PESO

O processo de triagem foi realizado em 82 cães classificados, de acordo com o ECC, em sobrepeso ou obesidade. Somente aqueles que foram classificados em ECC 8/9 ou 9/9 foram submetidos aos exames laboratoriais de triagem. Dentre estes 32 animais atenderam aos critérios estabelecidos e foram iniciados no experimento. A conclusão bem-sucedida, de acordo com os critérios estabelecidos, foi possível para 14 animais nesse estudo.

Tabela 3 - Panorama da participação dos animais inclusos no estudo

	Grupo PRO	Grupo CON
Total de indivíduos inclusos	16	16
Desistentes	4	3
Removidos	6	5
Amostra concluída	n=6	n=8

Considerando os 14 indivíduos que concluíram de forma bem-sucedida o programa de perda de peso, temos uma população de maioria fêmea (64,3%), praticamente com todos os animais castrados (92,9%) e com média de idade $7,4 \pm 2$ anos (tendo o animal mais velho 10 anos e o mais novo 3 anos de idade). A distribuição racial desses cães demonstrou uma predominância de animais sem raça definida (SRD), representando 35,7% da população.

O período de tratamento teve uma média geral de $7,2 \pm 2$ meses, sendo o maior tempo de 10 meses (2 cães do grupo PRO e 1 do grupo CON) e o menor tempo de 4 meses (de um indivíduo do grupo PRO). As TPPS médias dos animais ao longo do tratamento estiveram dentro do esperado (perda de 1% a 2% por semana) somente em dois indivíduos da população estudada (14,4%), um do grupo PRO (TPPS média de 1,47%) e um do grupo CON (TPPS média de 1,03%). Os demais indivíduos mantiveram as TPPS entre 0,46% e 0,83%.

Os dados pormenorizados de acordo com cada grupo estão apresentados na tabela 4, na qual pode ser observada que não há diferença estatística significativa entre os grupos em relação as características dos animais participantes (idade, sexo,

status reprodutivo e raça), assim como com relação ao tempo para perda de peso, TPPS média e peso meta.

Tabela 4 – Valores descritivos das variáveis: idade, sexo, status reprodutivo, raça, tempo até a perda de peso, TPPS e peso meta, segundo o grupo de estudo

Variável	Amostra (n=14)	Grupo		p
		PRO (n=6)	CON (n=8)	
Idade (anos)				0,549 ⁽¹⁾
Média ± dp	7,43 ± 1,91	7,00 ± 2,76	7,75 ± 1,04	
Sexo - n (percentual)				1,000 ⁽²⁾
Fêmea	9 (64,3)	4 (66,7)	5 (62,5)	
Macho	5 (35,7)	2 (33,3)	3 (37,5)	
Status reprodutivo - n (percentual)				0,429 ⁽²⁾
Castrado	13 (92,9)	5 (83,3)	8 (100,0)	
Inteiro	1 (7,1)	1 (16,7)	0 (0,0)	
Raça – n (percentual)				0,627 ⁽²⁾
Border collie	1 (7,1)	1(16,7)	0 (0,0)	
Dachshund	1 (7,1)	1(16,7)	0 (0,0)	
Labrador retriever	3 (21,4)	1(16,7)	3 (25,0)	
Lhasa apso	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (12,5)	
Pug	1 (7,1)	1(16,7)	0 (0,0)	
SRD	5 (35,7)	2 (33,3)	3 (37,5)	
Shih-tzu	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (12,5)	
Whippet	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (12,5)	
Tempo para perda de peso (meses)				0,744 ⁽¹⁾
Média ± dp	7,21 ± 2,01	7,00 ± 2,53	7,38 ± 1,69	
TPPS média				0,195 ⁽³⁾
Média ± dp	0,80 ± 0,24	0,77 ± 0,37	0,81 ± 0,10	
Mediana	0,78	0,69	0,81	
Peso meta (kg)				0,190 ⁽¹⁾
Média ± dp	20,09 ± 9,85	16,01 ± 7,79	23,15 ± 10,58	

Legenda: (1) Nível descritivo de probabilidade do teste t de Student; (2) Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher; (3) Nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Como descrito anteriormente todos os participantes do experimento precisavam estar inicialmente com um ECC indicando obesidade. O ECC 9/9, que representa a condição mais grave da doença, predominou na população de um modo geral, retratando 71,4%. Os demais cães (28,6%) iniciaram o programa de perda de

peso com ECC 8/9. Dentre os resultados observados em relação ao EMM todos os indivíduos mantiveram o escore inicial, constatando que visivelmente não houve perda de massa muscular durante o processo de perda de peso.

Tabela 5 – Percentual de cães classificados em cada ponto de ECC de acordo com o grupo e tempo do experimento

	Percentual de cães Grupo PRO	Percentual de cães Grupo CON
ECC inicial T1		
8/9	50%	12,5%
9/9	50%	87,5%
ECC final T2		
5/9	67%	62,5%
6/9	33%	25%
7/9	-	12,5%

Através da realização do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para o ECC, foi possível constatar que não houve diferença significativa entre os grupos nos momentos inicial ($p=0,282$) e final ($p=0,852$). Em ambos os grupos foi possível perceber um decréscimo significativo de ECC do momento T1 para o T2 ($p= 0,010$ para o grupo CON e $p=0,026$ para o grupo PRO).

Os animais que concluíram a perda de peso atingindo as duas metas (perda de 20% do peso inicial e ECC 5/9) representam 50% da população em ambos os grupos do estudo. Alguns (33% no grupo PRO e 37,5% no grupo CON) tiveram suas coletas de dados finais realizadas quando atingiram ou superaram a perda de 20% do peso inicial, sem ter alcançado o ECC 5/9. E uma minoria dos animais (17% do grupo PRO e 12,5% do grupo CON), atingiram o ECC ideal 5/9 sem ter completado a perda de 20% do peso inicial (os dois indivíduos alcançaram uma perda de 18%).

Dessa forma, foram necessários ajustes na quantidade energética fornecida aos animais, que na média diminuiu em 12% em relação a prescrição inicial. Apenas dois cães do grupo CON não tiveram alteração na quantidade de kcal/dia ingerida durante o tratamento. A menor redução esteve em 5% e a maior em 27%, ambas em animais pertencentes ao grupo PRO.

Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão da ingestão de Kcal/dia

Momento	Amostra (n=14)	Grupo		p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾
		PRO (n=6)	CON (n=8)		
Ingestão T1	651,6 ± 244,9 kcal/dia	554,7 ± 200,1 kcal/dia	724,2 ± 262,2 kcal/dia	0,973	<0,001
Ingestão T2	574,1 ± 221,2 kcal/dia	476,6 ± 195,2 kcal/dia	647,3 ± 225,1 kcal/dia		

Legenda: (1) valor de p para comparação entre os grupos; (2) valor de p para comparação entre os tempos de tratamento dos grupos

Através da análise de variância com as medidas da tabela 6 foi possível perceber que não há diferença significativa entre os grupos de estudo ($p=0,973$). Os grupos não apresentaram diferença significativas nas médias inicial e final ($p=0,184$). No entanto, no que diz respeito ao decréscimo da ingestão de Kcal/dia do momento inicial para o momento final foi possível observar um decréscimo significativo nos dois grupos avaliados ($p<0,001$).

Com relação ao peso é importante destacar que há uma grande discrepância em relação aos tamanhos dos cães participantes. No entanto, na média os animais do grupo PRO perderam 4,5 kg e, os do grupo CON 6,1kg, ao longo de todo o processo. Enquanto o percentual médio de perda de peso se manteve acima de 20% em ambos os grupos (21% PRO e 22% CON). Os dois grupos também apresentaram peso final médio inferior ao peso meta médio estipulado para cada um.

Tabela 7 – Valores de média e desvio padrão do peso em kg, segundo o momento de avaliação e o grupo de estudo

Informações	Total Amostra (n=14)	Grupo PRO (n=6)	Grupo COM (n=8)
Peso meta médio	20,9 ± 9,8kg	16 ± 7,7kg	23,1 ± 10,5kg
Peso T2 médio	19,7 ± 9,6kg	15,7 ± 7,3kg	22,8 ± 10,5kg
Percentual médio de peso perdido	21% ± 3%	21% ± 2%	22% ± 3%

Os grupos não apresentaram diferença entre si no comportamento relativo à perda de peso, segundo a análise de variância ($p=0,228$) e, não apresentaram diferença significativa nas médias inicial e final ($p=0,187$). Porém, ambos os grupos

apresentaram decréscimo significativo de peso quando comparados o momento inicial e final ($p < 0,001$).

A descrição detalhada das informações referentes a cada animal, assim como sobre o processo de perda de peso individual, está disponível no Anexo 1.

6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Tabela 8 - Valores de média e desvio padrão das variáveis bioquímicas, de acordo com o momento e grupo do estudo

Parâmetro bioquímico	Tempo	Valor de referência (unidade)	Amostra (n=14)	Grupo PRO (n=6)	Grupo CON (n=8)	p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾
Triglicérides	T1*	40-169 mg/dL	117,39 ±86	92,3 ± 50	136,1 ±105	0,213	0,430
	T2*		96,98 ±61,8	112,3 ± 94	85,4 ± 21		
Colesterol	T1	125-279 mg/dL	208,78 ±33,8	189 ± 26	223,6 ±32	0,492	<0,001
	T2		167,97 ±37,4	155 ± 43	177,6 ±31		
Glicose	T1	70-100 mg/dL	85,73 ±11,7	85,3 ± 12	86 ± 12	0,507	<0,001
	T2		69,69 ±6,7	71,8 ± 5	68 ± 7		
Frutosamina	T1	350-450 μmol/L ⁽³⁾	351,38 ±71,5	359,5 ± 52	328,6 ±93	0,666	0,082
	T2		302,62 ±53,7	298,3 ± 70	306,3 ±40		
Ureia	T1	20-40 mg/dL	36,06 ±6,8	32,8 ± 7	38,7 ± 6	0,236	0,039
	T2		31,41 ±6,2	30,8 ± 7	30,3 ± 7		
Creatinina	T1	0,5-1,4 mg/dL	0,95 ± 0,1	0,91 ± 0,1	0,97 ± 0,1	0,397	0,145
	T2		0,89 ± 0,2	0,83 ± 0,2	0,92 ± 0,1		
Proteína total	T1	5,3-7,6 mg/dL	7,27 ± 0,6	7,11 ± 0,5	7,3 ± 0,5	0,461	0,003
	T2		6,66 ± 0,6	6,6 ± 0,8	6,7 ± 0,5		
Albumina	T1	2,3-3,8 mg/dL	3,97 ± 0,4	3,8 ± 0,3	4 ± 0,4	0,883	0,069
	T2		3,80 ± 0,5	3,6 ± 0,5	3,8 ± 0,4		
ALT	T1*	10-88 mg/dL	49,34 ±75,8	26,7 ± 13	32,7 ± 8	0,263	0,034
	T2*		43,69 ±71,5	14,6 ± 5	33,5 ± 27		
FA	T1*	20-150 mg/dL	63,89 ±57,1	78,6 ± 116	86,3 ± 65	0,277	0,073
	T2*		41,31 ±34,7	80 ± 107	43,8 ± 29		

Legenda: * variável avaliada através da transformação logarítmica; ⁽¹⁾ valor de p para comparação entre grupos; ⁽²⁾ valor de p para comparação entre os momentos T1 e T2 de ambos os grupos; ⁽³⁾ referências

para frutossamina: hipoglicemia=300 μ mol/L, excelente=350-400 μ mol/L, bom= 400-450 μ mol/L, regular= 450-500 μ mol/L, ruim > 500 μ mol/L

Os cães iniciaram o estudo com valor médio de triglicérides e colesterol maior do que a média encontrada nas análises finais, com exceção do triglicérides do grupo PRO que apresentou valor médio maior no T2. O decréscimo de valores só foi considerado significativo ($p < 0,001$) para a variável colesterol, quando comparado o momento inicial e final do projeto, em ambos os grupos. Com relação ao triglicérides não foi constatada alteração entre o momento inicial e final em nenhum dos grupos ($p = 0,430$). Quando comparadas as médias inicial e final entre os grupos, e os próprios grupos entre si, não houve diferença estatística.

Dentre os participantes três indivíduos iniciaram o tratamento com hiperlipidemia e dois tiveram os valores normalizados após a perda de peso. Dois indivíduos, um do grupo PRO (triglicérides T1: 193,2mg/dL; triglicérides T2: 298 mg/dL) e um do grupo CON (triglicérides T1: 383,6 mg/dL; triglicérides T2: 75,6 mg/dL) iniciaram o projeto com hipertrigliceridemia e somente o cão do grupo CON teve esse parâmetro normalizado após tratamento. Um participante do grupo CON (colesterol T1: 289,5mg/dL; colesterol T2: 222,7mg/dL) iniciou o tratamento com hipercolesterolemia e apresentou diminuição e normalização do colesterol no pós-tratamento.

As análises de glicose e frutossamina apresentaram-se de forma semelhante, com os valores de média mais elevados no início do tratamento e menores no final. No entanto, somente para a variável glicose houve uma diminuição significativa quando comparados os valores de T1 e T2, nos dois grupos avaliados ($p < 0,001$). Entre os grupos não há diferença estatística de comportamento, tanto para análise de glicose quanto frutossamina.

Com relação ao perfil renal não foi possível observar diferença de comportamento entre os grupos, tanto para a variável ureia quanto creatinina. A ureia apresentou um decréscimo significativo ($p = 0,039$), nos dois grupos avaliados, quando comparados os tempos iniciais a finais. Para a creatinina não houve diferença ($p = 0,145$), relacionada ao tempo do estudo, em nenhum dos grupos.

Nas variáveis do perfil hepático dos animais observou-se comportamento semelhante entre os grupos, não havendo diferença significativa entre PRO e CON para proteína total ($p = 0,461$), albumina ($p = 0,883$), ALT ($p = 0,263$) e FA ($p = 0,277$). Para

ambos os grupos, a proteína total e ALT demonstraram decréscimos significativos em relação ao tempo de estudo (respectivamente, $p=0,003$ e $p=0,039$).

6.3 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E HORMONAIS

Tabela 9 – Valores de média e desvio padrão das variáveis inflamatórias, de acordo com o grupo e momento de avaliação

Variável	Momento	Amostra (n=14)	Grupo		p ⁽¹⁾
			PRO (n=6)	CON (n=8)	
CCK* (pg/mL)	T1	268,55 ± 210,93	199,20 ± 121,04	320,55 ± 254,85	0,316
	T2	383,55 ± 246,50	361,75 ± 247,99	399,90 ± 261,16	
PCR (ng/mL)	T1	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,112
	T2	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,02	
IL1β* (pg/mL)	T1	64,55 ± 119,66	114,29 ± 177,75	27,24 ± 17,61	0,555
	T2	77,15 ± 148,91	97,43 ± 185,11	61,93 ± 126,83	

Legenda: * variáveis avaliadas através da transformação logarítmica; ⁽¹⁾ valor de p para comparação entre grupos

De acordo com os valores de p obtidos através da análise de variância entre os grupos pode-se perceber que não há diferença significativa de comportamento entre PRO e CON. Entretanto, ao comparar os momentos iniciais e finais de ambos os grupos se observa um acréscimo significativo do hormônio CCK ($p=0,006$). A mesma análise realizada (em relação ao tempo de estudo) para PCR e IL1 β não demonstraram alterações significativas (respectivamente, $p=0,112$ e $p=0,3$).

6.4 DESISTENCIAS E REMOÇÕES DE INDIVÍDUOS DO PROJETO

As desistências ocorreram, principalmente, em função da dificuldade encontrada pelos responsáveis dos cães em mudar o hábito e manejo alimentar do animal e, pela falta de disponibilidade de comparecer com seus animais mensalmente para os acompanhamentos. Alguns cães tiveram uma baixa aceitação do alimento devido ao hábito anterior de comer ração seca misturada a um alimento industrializado úmido ou a alimentos caseiros (como frango, carne moída, legumes e frutas).

Por outro lado, as remoções de indivíduos do projeto ocorreram devido ao não comprometimento dos responsáveis em seguir a prescrição da dieta, assim como o não cumprimento da instrução de suspender o fornecimento de petiscos e outros

alimentos. Aqueles que não compareciam de forma frequente aos retornos também foram desligados da pesquisa.

Casos particulares onde houve a necessidade de tratamento com antibiótico, por causa de outra comorbidade ou procedimento cirúrgico durante a participação no projeto de pesquisa, também precisaram ser suspensos. E, um caso bem-sucedido participante do grupo PRO não teve a coleta final de fezes devido ao seu inesperado falecimento, tendo somente seus outros dados inclusos no tratamento estatístico.

Alguns animais precisaram ter a participação encerrada devido a um tempo de tratamento excessivo e sem resultados satisfatórios. Esse caso abrange a 2 animais do grupo PRO (tempo de tratamento: 17 e 12 meses), cujos dados finais (T2) foram coletados, porém não considerados na análise estatística, por não terem atingido a meta estabelecida no estudo.

7. DISCUSSÃO

7.1 PROGRAMA DE PERDA DE PESO

De forma a iniciar a discussão dos resultados previamente apresentados é importante ressaltar que as características gerais encontradas na população de cães participantes desse experimento, são compatíveis com aquelas demonstradas em literatura como sendo fator de risco para o desenvolvimento da obesidade. No presente estudo observa-se uma população predominantemente castrada (92,8%), de meia-idade ($7,4 \pm 2$ anos) e do sexo feminino (64,3%). Em estudo epidemiológico, com 40.038 cães, desenvolvido por Chiang et al. (2022) estes mesmos atributos são relacionados a um maior risco de sobrepeso/obesidade, com significativa diferença estatística em relação aos demais grupos.

A castração pode promover um decréscimo na necessidade energética do animal (CHIANG et al., 2022), bem como pode provocar alterações no comportamento alimentar predispondo a um aumento no consumo energético, sem necessariamente ocorrer um aumento na atividade diária, para o gasto dessa energia (GERMAN, 2006). A idade, de um modo geral, diminui a atividade do animal e conseqüentemente diminui sua necessidade energética diária (CHIANG et al., 2022). Enquanto o fator sexo por si só predispõe as fêmeas a um maior ganho de peso, como demonstrado por BJORNVAD et al. (2019).

As médias de TPPS de 85,6% dos indivíduos tratados nesse projeto de pesquisa estiveram abaixo da referência esperada (1-2%), descrita em literatura por Brooks et al. (2014). Esse achado é semelhante ao descrito no estudo de Porsani et al. (2020b), no qual 64,4% dos cães não alcançaram os valores de TPPS 1-2% durante o tratamento. No entanto, de fato o processo de perda de peso em cães domiciliados é bastante desafiador, comumente apresentando TPPS mais baixas, inclusive com o decorrer do tempo de tratamento (FLANAGAN, 2017; GERMAN, 2016). A necessidade de restrições energéticas na tentativa de atingir uma TPPS mais alta, torna o processo ainda mais difícil (GERMAN, 2016), como foi o caso de grande parte dos animais participantes desse estudo, que precisaram ter a NEPP restrita, até mais de uma vez, ao longo do tratamento.

O tempo de tratamento observado foi em média $7 \pm 2,5$ meses para o grupo PRO e $7,4 \pm 1,7$ meses para o grupo CON, o que difere do tempo descrito em literatura de 3

a 6 meses de duração, levando em consideração a TPPS ideal de 1-2%. No entanto, esses valores são descritos em estudos realizados com animais de experimento, portanto, em uma realidade bastante distinta de um cão domiciliado, para o qual o tempo de tratamento será, em média, maior e com a TPPS, geralmente, entre 0,5 e 1% (FLANAGAN et al., 2017; GERMAN, 2016). Nesse estudo a TPPS média esteve em $0,77 \pm 0,3\%$ para o grupo PRO e $0,81 \pm 0,1\%$ para o grupo CON, corroborando com o encontrado em literatura.

Ambos os grupos apresentaram um percentual de perda de peso médio acima de 20% (grupo PRO com 21% e grupo CON com 22%) e os animais atingiram o ECC ideal 5/9 em 67% (PRO) e 62,5% (CON) dos casos. Possivelmente, a circunstância de os animais terem atingido a meta de perda de 20%, porém sem necessariamente atingirem o ECC 5/9, se deve ao fato de que cada ponto de ECC acima do ideal equivale a 10% de sobrepeso sobre o atual peso do animal (SHEPHERD, 2021). Portanto, animais com ECC 9/9 poderiam estar com cerca de 30% ou mais de massa gorda do que seria considerado saudável, de modo que a perda de 20% não foi suficiente para o estabelecimento do ECC ideal, em alguns casos.

Entretanto, como para determinar a NEPP é utilizado o peso meta (para estabelecimento do peso metabólico do animal), não foi considerada a perda inicial de 30% ou mais do peso para minimizar uma possível restrição de nutrientes ao longo do estudo. A necessidade nutricional, contudo, foi cuidadosamente observada durante o experimento de modo a garantir que os valores mínimos de nutrientes estavam sendo supridos. O resultado apresentado relativo à manutenção da massa magra, de acordo com a escala de EMM, entre os tempos T1 e T2, corrobora com as recomendações de nível mínimo proteico a ser consumido diariamente – $3,28 \text{ g/kg}^{0,75}$ (SHEPHERD, 2021) a $4,95 \text{ g/kg}^{0,75}$ (FEDIAF, 2018) – para preservar a musculatura de um cão.

Contabilizando as desistências e remoções ocorridas durante o tempo da pesquisa, pode-se dizer que há uma falha de tratamento de 56,2% (18/32 cães) dos animais que iniciaram o programa de perda de peso. Este achado é descrito de forma semelhante por German (2016), que diz que somente metade dos animais que iniciam um programa de perda de peso de fato atingem o peso meta estabelecido. Outro ponto destacado por esse mesmo autor, é o fato de que cães com maior peso a perder (ou seja, aqueles que estão em condição de obesidade) são os com menor chance de

resultados satisfatórios. E, no presente estudo todos os cães para que fossem inclusos precisavam apresentar ECC 8/9 ou 9/9, necessariamente.

Boa parte das desistências estiveram relacionadas a dificuldade dos responsáveis pelos cães em alterar hábitos alimentares pré-estabelecidos em seus pets, como o fornecimento de petiscos, outros alimentos e fornecimento de ração *ad libitum*. Muitos relataram o hábito de seus pets de implorar por mais comida, durante o tratamento, e demonstraram preocupação por suspender outras formas de alimento anteriormente oferecidos, assim como com a quantidade de alimento prescrita para perda de peso. Este é um ponto de extrema importância, para o sucesso ou não, de um programa de perda de peso, e sempre que possível o veterinário deve buscar estratégias alternativas considerando também os objetivos do responsável pelo animal (SHEPHERD, 2021).

Há uma significativa relação entre um programa de perda de peso bem-sucedido, bem como uma TPPS satisfatória, e o comprometimento do responsável do animal com o tratamento (PORSANI et al., 2020). No entanto, por esse trabalho tratar-se de um projeto de pesquisa e estar comprometido com a avaliação de microbiota fecal não foram possíveis o estabelecimento de alternativas para maior aderência ao programa, como é sugerido por Shepherd (2021) com o exemplo da adição de 10% da NEPP em petiscos, como frutas e legumes.

De acordo com os parâmetros obtidos através dos exames laboratoriais não houve diferença estatística entre os grupos estudados. No entanto, algumas diferenças significativas puderam ser observadas em relação ao tempo de tratamento, ou seja, entre as análises coletadas nos tempos T1 e T2. O colesterol é uma dessas variáveis que apresentou um decréscimo significativo entre os indivíduos obesos e emagrecidos. Embora o valor médio inicial de colesterol estivesse dentro do valor de referência estipulado, na literatura a hipercolesterolemia é descrita como uma alteração comum em cães obesos (PIANTEDOSI et al., 2020), o que auxilia a justificativa da diminuição desse componente após o tratamento.

O hormônio colecistoquinina (CCK) está associado a regulação da digestão, estímulo de secreção de insulina e promoção de saciedade, sendo secretado em resposta à alimentação (PATHAK; FLATT; IRWIN, 2018). Pode-se observar que ao comparar os resultados da mensuração da CCK no pré e pós perda de peso houve um acréscimo estatisticamente significativo em ambos os grupos. Esse achado, de certa forma, concorda com o descrito em literatura, na qual diz que a diminuição de

níveis de CKK estão relacionados a obesidade, uma vez que o principal papel fisiológico desse peptídeo é regular o consumo energético (PATHAK; FLATT; IRWIN, 2018).

7.2 EFEITOS DA ADIÇÃO PROBIÓTICA

Previamente a discussão dos efeitos promovidos pela adição do probiótico no alimento para perda de peso, é necessário destacar que conforme os testes de estabilidade microbiológica reportados em informações técnicas do produto, pela empresa responsável, os microrganismos apresentaram boa estabilidade durante o período de validade de 24 meses, inclusive quando adicionados em ração. No entanto, esses testes não foram repetidos nesse projeto de pesquisa a fim de comprovar a estabilidade dos microrganismos no tempo de prateleira do alimento utilizado para perda de peso dos animais.

Com relação as métricas do programa de perda de peso (tempo para perda de peso, percentual de peso perdido, TPPS) não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Os animais que tiveram como alimento a ração hipocalórica adicionada de probiótico se comportaram de modo bastante semelhante àqueles que pertenciam ao grupo controle. Os demais parâmetros (bioquímicos – totalmente analisados – inflamatórios e hormonais – analisados parcialmente) também não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre os grupos. Esses resultados apontam para uma inconclusão sobre a adição probiótica ser benéfica ou não, para essas variáveis da perda de peso, nesse estudo.

7.3 LIMITAÇÕES

O estudo não apresenta todas as análises propostas devido a algumas limitações. Em decorrência da pandemia de covid 19, o HOVET FMVZ USP onde o projeto de pesquisa estava sendo executado precisou ser fechado durante o período do ano de 2020. Desse modo, todo o processo sofreu atrasos, assim como muitos indivíduos desistiram de participar do projeto. As coletas foram finalizadas, porém em virtude do atraso na importação de materiais necessários para a realização das análises laboratoriais, os resultados não ficaram completamente prontos para o depósito.

O acompanhamento dos animais durante o período de fechamento do HOVET ocorreu por telefone. Os responsáveis eram solicitados a pesar os animais em casa e responder a anamnese, quinzenalmente, de modo que fosse possível orientá-los e dar continuidade no processo de perda de peso. Em função disso, alguns responsáveis desistiram do programa de perda de peso.

Ao retomar as atividades, a maioria dos animais foram recrutados através de redes sociais, o que diversificou o público em relação àqueles que eram encaminhados dos demais Serviços do próprio hospital (responsáveis já cientes dos malefícios da obesidade e, frequentemente, enfrentando um tratamento para seus cães com problemas relacionados a obesidade).

Portanto, uma parte dos animais tratados eram encaminhados com a finalidade de tratar a obesidade, outros chegavam até o projeto (e os benefícios oferecidos) através da divulgação na mídia e, nesse contexto, alguns participaram do programa de perda de peso enquanto suas famílias estavam totalmente em casa e outros, enquanto seus tutores estavam retomando as atividades diárias.

O ambiente desses animais não foi controlado, cada cão participante apresentou um perfil de vida totalmente diferente (cães que viviam em chácara, em apartamento ou casa; com e sem outros animais na casa; alguns não pararam de comer os petiscos durante o programa; convivência com crianças e idosos; raças diferentes; acesso a rua para passeios; acesso a comida de outros cães e gatos da mesma casa), o que interfere no estudo da microbiota.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados a partir das métricas do programa de perda de peso (tempo para perda de peso, percentual de peso perdido, TPPS), bem como os parâmetros bioquímicos, inflamatórios e hormonais, pode-se concluir que não houve diferença entre os grupos estudados (PRO e CON). Possivelmente, a adição de probiótico no alimento para perda de peso não teve efeito sobre essas análises.

REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, L.; SCARPELLINI, E.; COLICA, C.; BOCCUTO, L.; SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, J.; AIELLO, V.; ROMANO, B.; LORENZO, A.; IZZO, A.A.; CAPASSO, R. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. **Nutrients**, v.11, n.2690, 2019.
- AZAD, M.A.K.; SARKER, M.; LI, T.; YIN, J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. **BioMed Research International**, v.2018, n.9478630, 2018.
- BASTIEN, B.C.; PATIL, A.; SATYARAJ, E. The impact of weight loss on circulating cytokines in beagle dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 163, p. 174-182, 2015.
- BERMINGHAM, E.N.; THOMAS, D.G.; CAVE, N.J.; MORRIS, P.J.; BUTTERWICK, R.F.; et al. Energy Requirements of Adult Dogs: A Meta-Analysis. **PLoS ONE** 9(10): e109681, 2014.
- BJØRNVAD, C.R.; GLOOR, S.; JOHANSEN, S.S.; SANDOE, P.; LUND, T.B. Neutering increases the risk of obesity in male dogs but not in bitches – A cross-sectional study of dog- and owner- related risk factors for obesity in Danish companion dogs. **Preventive Veterinary Medicine**, v.170, n.104730, 2019.
- CARROL, I. M.; CHANG, Y.; PARK, J.; SARTOR, R. B.; RINGEL, Y. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Gut Pathogens**, v.2, n.19, p.1-9, 2010.
- CHAITMAN, J., GASCHEN, F. Fecal microbiota transplantation in dogs. **Vet Clin Small Anim**, 9: (12), 2020.
- CHANDLER, M.; CUNNINGHAM, S.; LUND, E.M.; KHANNA, C.; NARAMORE, R.; PATEL, A; DAY, M.J. Obesity and associated comorbidities in people and companion animals: a one health perspective. **J. Comp. Path.**, vol 156, 296-309, 2017.
- CHIAN, C-F.; VILLAVERDE, C.; FASCETTI, A.J.; LARSEN, J.A. Prevalence, risk factors, and disease associations of overweight and obesity in dogs that visited the Veterinary Medical Teaching Hospital at the University of California, Davis from january 2006 to december 2015. **Topics in Companion An Med**, v.48, n.100640, 2022.
- CHUN, J.L.; JI, S.Y.; LEE, Y.K.; KIM, B.; KIM, K.H. Difference of gut microbiota composition based on the body condition scores in dogs. **J Anim Sci Technol**, 62(2):239-246, 2020.
- CLARK, M.; HOENIG, M. Metabolic effects of obesity and its interaction with endocrine diseases. **Vet Clin Small Anim**, 46: 797-815, 2016.
- CLINE, M.G.; BURNS, K.M.; COE, J.B.; DOWNING, R.; DURZI, T.; MURPHY, M.; PARKER, V. 2021 AAHA nutrition and weight management guidelines for dogs and cats. **J Am Anim Hosp Assoc**, 57:153-178, 2021.

DA SILVA, T.F.; CASAROTTI, S.N.; OLIVEIRA, G.L.V.; PENNA, A.L.B. The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020.

FEDIAF. Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. **European Pet Food Industry Federation**. Brussels, Belgium, 2018.

FLANAGAN, J.; BISSOT, T.; HOURS, M-A.; MORENO, B; FEUGIER, A.; GERMAN, A.J. Success of a weight loss plan for overweight dogs: the results of an international weight loss study. **PLoS ONE**, 12 (9): e0184199, 2017.

FONTANE, L.; BENAIGES, D.; GODAY, A.; LLAURADÓ, G.; PEDRO-BOTET, J. Influencia de la microbiota y de los probióticos en la obesidad. **Clin Investig Arterioscler**, n. 442, 2018.

GASPARDO, A.; ZANNONI, A.; TURRONI, S.; BARONE, M.; SABETTI, M.C.; ZANONI, R.G.; FORNI, M.; BRIGIDI, P.; PIETRA, M. Influence of Lactobacillus kefir on intestinal microbiota and fecal IgA content of healthy dogs. **Front. Vet. Sci.**, 7:146, 2020.

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

GERMAN, A.J.; HOLDEN, S.L.; BISSOT, T.; MORRIS, P.J.; BOURGE, V. A high protein high fibre diet improves weight loss in obese dogs. **The Veterinary Journal**, v.183, p 294-297, 2010.

GERMAN, A.J. Weight management in obese pets: the tailoring concept and how it can improve results. **Acta Vet Scand**, 58 (Suppl1):57, 2016.

GREEN, J.E.; DAVIS, J.A.; BERK, M.; HAIR, C.; LOUGHMAN, A.; CASTLE, D.; ATHAN, E.; NIERENBERG, A.A.; CRYAN, J.F.; JACKA, F.; MARX, W. Efficacy and safety of fecal microbiota transplantation for the treatment of diseases other than Clostridium difficile infection: a systematic review and meta-analysis. **Gut Microbes**, vol 12, 2020.

GRZESKOWIAK, L.; ENDO, A.; BEASLEY, S.; SALMINEN, S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v.34, p. 14-23, 2015.

HANDL, S.; GERMAN, A.J.; HOLDEN, S.L.; DOWD, S.E.; STEINER, J.M.; HEILMANN, R.M.; GRANT, R.W.; SWANSON, K.S.; SUCHODOLSKI, J.S. Faecal microbiota in lean and obese dogs. **Microbiol Ecol**, vol 84, p 332-343, 2013.

HEILIG, H. G. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; VOS, W. M. Molecular diversity of Lactobacillus spp. and

other latic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, n.68, n.1, p.114-123, 2002.

IZAOLA, O.; LUIS, D.; SAJOUX, I.; DOMINGO, J.C.; VIDAL, M. Inflamacion y obesidad (lipoinflamación). **Nutri Hosp**, v.31, p.2352-2358, 2015.

JEUSETTE, I.C.; LHOEST, E.T.; ISTASSE, L.P.; DIEZ, M.O. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. **Am J Vet Res**, 66:81-86, 2005.

LAFLAMME, D.P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, .22: 10-15, 1997.

LAFLAMME, D.P. Understanding and managing obesity in dogs and cats. **Vet Clin Small Anim**, 36:.1283-1295, 2006.

LARSEN, J.A.; VILLAVERDE, C. Scope of the problem and perception by owners and veterinarians. **Vet Clin Small Anim** 46: 761-772, 2016.

LEE, H-J.; CHO, J.H.; CHO, W-J.; GANG, S-H.; PARK, S-H.; JUNG, B-J.; KIM, H.B.; SONG, K.H. Effects of synbiotic preparation containing *Lactobacillus gasseri* BNR17 on body fat in obese dogs: a pilot study. **Animals**, 12, 642, 2022.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, vol. 444, p. 1022-1023, 2006.

LINDER, Deborah E.; SANTIAGO, Sasha; HALBREICH, Eli D. Is there a correlation between dog obesity and human obesity? Preliminary findings of overweight status among dog owners and their dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, 8:654617, julho, 2021.

LUND, M.; NORDENTOFT, S.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p. 5125-5132, 2004.

MACEDO, H.T.; RENTAS, M.F.; VENDRAMINI, T.H.A.; MACEGOZA, M.V.; AMARAL, A.R.; JEREMIAS, J.T.; BALIEIRO, J.C.C.; PFRIMER, K.; FERRIOLLI, E.; PONTIERI, C.F.F.; BRUNETTO, M.A. Weight-loss in obese dogs promotes importante shifts in fecal microbiota profile to the extent of resembling microbiota of lean dogs. **Animal Microbiome**, 4:6, 2022.

MALINEN, E.; KASSINEN, A.; RINTTILA, T.; PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, v.149, n.1, p. 269-277, 2003.

MANDAL, S.; TREUREN, W.V.; WHITE, R.A.; EGGSBØ, M.; KNIGHT, R.; PEDDADDA, S.D. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial ecology in health and disease**, v.26, n.1, p. 27663, 2015.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº13**. 2004.

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

MIYAKE, Kenta; KITO, Kumiko; KOTEMORI, Ayaka; SASAKI, Kazuto; YAMAMOTO, Junpei; OTAGIRI, Yuko; NAGASAWA, Miho; KUZE-ARATA, Sayaka; MOGI, Kazutaka; KIKUSUI, Takefumi; ISHIHARA, Junko. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.17, n.3498, 2020.

MONDO, E.; MARLIANI, G.; ACCORSI, P.A.; COCCHI, M.; DI LEONE, A. Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. **Open Veterinary Journal**, v.9, p.253-258, 2019.

NAM, H.M.; SRINIVASAN, V.; GILLESPIE, B.E.; MURINDA, S.E.; OLIVER, S.P. Application of SYBR Green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. In dairy farm environment samples. **International Journal Food Microbiology**, v.102, n.2, p. 161-171, 2005.

PATTERSON, E.; RYAN, P.M.; CRYAN, J.F.; DINAN, T.G.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Gut microbiota, obesity and diabetes. **Postrand Med J**, 92:286-300, 2016.

PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THIJS, C.; STOBBERINGH, E. E. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, n.1, p.141-147, 2005.

PATHAK, V.; FLATT, P.R.; IRWIN, N. Cholecystokinin (CCK) and related adjunct peptide therapies for the treatment of obesity and type 2 diabetes. **Peptides**, 100, 229-235, 2018.

PIANTEDOSI, D.; PALATUCCI, A.T.; GIOVAZZINO, A.; RUGGIERO, G.; RUBINO, V.; MUSCO, N.; CARRIERO, F.; FARINA, F.; ATTIA, Y.A.E.W.; TERAZZANO, G.; LOMBARDI, P.; CORTESE, L. Effect of a weight loss program on biochemical and immunological profile, serum leptin levels, and cardiovascular parameters in obese dogs. **Front. Vet. Sci.** 7:398, 2020.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J.S. The gut microbiome of dogs and cats, and the influence of diet. **Vet Clin Small Anim**, vol 51, p 605-621, 2021.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J.S. The role of the canine microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. **Front Vet Sci**, vol 6, 498, 2020.

PORSANI, M.Y.H.; TEIXEIRA, F.A.; AMARAL, A.R.; PEDRINELLI, V.; VASQUES, V.; OLIVEIRA, A.G.; VENDRAMINI, T.H.A.; BRUNETTO, M.A. Factors associated with failure of dog's weight loss programmes. **Vet Med Sci**, v.6, p.299-305, 2020a.

PORSANI, M. Y. H.; TEIXEIRA, F. A.; OLIVEIRA, V.V.; PEDRINELLI, V.; DIAS, R. A.; GERMAN, A. J.; BRUNETTO, M. A. Prevalence of canine obesity in the city of São Paulo, Brazil. **Scientific reports**, 10:14082, agosto, 2020b.

PREET, G.S.; TURKAR, S.; GUPTA, S.; KUMAR, S. Dog obesity: epidemiology, risk factors, diagnosis and management: a review paper. **The Pharma Innovation Journal**, 10(5):698-705, 2021.

RODICIO, M.R.; MENDONZA, M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones em microbiología clínica. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.22, n.4, p.238-245, 2004.

ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. Edição 2. Boston, PWS Publishers, Second edition, 1986. P. 584.

SALAS-MANI, A.; JEUSETTE, I.; CASTILLO, I.; MANUELIAN, C.L.; LIONNET, C.; IRACULIS, N.; SANCHEZ, N.; FERNANDEZ, S.; VILASECA, L.; TORRE, C. Fecal microbiota composition changes after a BW loss diet in beagle dogs. **J. Anim. Sci.**, 96:3102-3111, 2018.

SANCHEZ, S.B.; PILLA, R.; SARAWICHITR, B.; GRAMENZI, A.; MARSILIO, F.; STEINER, J.M.; LIDBURY, J.; WOODS, G.R.T., GERMAN, A.J.; SUCHODOLSKI, J.S. Fecal microbiota in client-owned obese dogs changes after weight loss with a high-fiber-high-protein diet. **PeerJ**, 8:e9706, 2020.

SHEPHERD, M. Canine and feline obesity management. **Vet Clin Small Anim**, 51: 653-667, 2021.

SIMPSON, K.W.; RISHNIW, M.; BELLOSA, M.; LIOTTA, J.; LUCIO, A.; BAUMGART, M.; CZARNECKI-MAULDEN, G.; BENYACOU, J.; BOWMAN, D. Influence of Enterococcus faecium SF68 probiotic on giardiasis in dogs. **J Vet Intern Med**, n.23, p.476-481, 2009.

SODER, J.; WERNERSSON, S.; HOGLUND, K.; HAGMAN, R.; LINDASE, S.; DICKSVED, J. Composition and short-term stability of gut microbiota in lean and spontaneously overweight healthy labrador retriever dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**,64:8, 2022.

STOBBERINGH, E. E. Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, n.1, p.141-147, 2005.

SUCHODOLSKI, J.S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Vet Clin Small Anim**, n.41, p.261-272, 2011.

SUEZ, J.; ZMORA, N.; SEGAL, E.; ELINAV, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, v.25, p.716-729, 2019.

TIMM, N.H. **Multivariate Analysis with applications in educations and psychology.** Monterrey, CA Brooks/Cole, 1975. P. 687.

WALTER, J.; HERTEL, C. TANNOCK, G.W. Detection of Lactobacillus, Pedicoccus, Leuconostoc and Weissella species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel elctrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p. 2578-2585, 2001.

WANG, R.; CAO, W.; FRANKLIN, W.; CAMPBELL, W.; CERNIGLIA, C. E. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of Clostridium perfringens in food. **Molecular and Celular Probes**, v.8, n.2, p.131-138, 1994.

WHO - World Health Organization: Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, **Joint WHO/FAO Expert Consultation on Geneva.** Cordoba, Argentina: WHO; 2001.

WIEERS, G.; BELKHIR, L.; ENAUD, R.; LECLERCQ, S.; DE FOY, J-M.P.; DEQUENNE, I.; DE TIMARY, P.; CANI, P.D. How probiotics affect the microbiota. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, 9:454, 2020.

WONG, J.M.W.; SOUZA, R.; KENDALL, C.W.C.; EMAM, A.; JENKINS, D.J.A. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **J Clin Gastroenterol**, v.40, n.3, p.235-243, 2006.

YOU, I.; KIM, M.J. Comparision of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: breed, age, and body condition score. **Animals**, 11, 2432, 2021.

ZORAN, D.L. Obesity in dogs and cats: A metabolic and endocrine disorder. **Vet Clin Small Anim**, 40: 221-239, 2010.

ANEXO A - Informações do programa de perda de peso detalhado por animal

ANEXO A – Informações do programa de perda de peso detalhado por animal

Animal	4	5	7	25	33	38	3	6	8	9	11	15	17	41
Grupo	PRO	PRO	PRO	PRO	PRO	PRO	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON
Peso T1 (kg)	22	10,8	37,4	22,2	14,8	12,9	41,5	26,5	10,5	35,7	43,3	40,6	12,4	21,2
Peso meta (kg)	17,6	8,6	29,9	17,8	11,8	10,3	33,2	21,2	8,4	28,6	34,6	32,4	9,9	16,9
Peso T2 (kg)	17,2	8,5	28,5	18,1	11,8	10,3	31,9	21,5	8,4	28,6	35,6	30,6	9	16,9
Percentual de peso perdido	22%	21%	24%	18%	20%	20%	23%	19%	20%	20%	18%	25%	27%	20%
ECC T1	8/9	9/9	9/9	8/9	8/9	9/9	9/9	8/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
ECC T2	5/9	5/9	5/9	5/9	6/9	6/9	5/9	5/9	6/9	5/9	5/9	7/9	5/9	6/9
Tempo de tratamento (meses)	10	10	5	6	4	7	8	5	8	6	6	10	9	7
TPPS média	0,62%	0,53%	1,47%	0,8%	0,46%	0,75%	0,83%	1,03%	0,72%	0,83%	0,75%	0,8%	0,82%	0,73%
Idade (anos)	9a	10a	3a	5a	9a	6a	8a	9a	7a	8a	8a	6a	7a	9a
Sexo	M	F	F	M	F	F	F	M	F	F	M	M	F	F
Status reprodutivo	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Raça	SRD	Dach	Labrador	Border	SRD	Pug	SRD	SRD	Shih-tzu	Labrador	Labrador	SRD	Lhasa	Whippet
Ingestão kcal/dia inicial	601,5	352,7	895,05	632	445	402	968	691,6	345,4	865	998,6	950,6	390	585
Ingestão kcal/dia final	438,5	285,7	805,05	604	401,4	325,2	871	691,6	345,4	778	808,8	855	353,5	475
Percentual de redução kcal/dia	27%	19%	10%	5%	19%	19%	10%	0%	0%	10%	19%	10%	9%	19%

Legenda: M: macho; F: fêmea; C: castrado; I: inteiro; cores: cinza para informações do grupo PRO e azul para as informações do grupo CON