

EFEITOS DO BACILLUS SUBTILIS SOBRE A MICROBIOTA E METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL E PERFIL INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DE CÃES SUBMETIDOS A TROCA ABRUPTA DE DIETA

BRUNA W. S. ABECHÉ¹

, LAIS M. ANTUNES¹, VANESSA R. OLSZEWSKI¹, DANIELI Z. CYPRIANO¹, LAIANE S. LIMA¹, ISABELI F. BARBISAN¹, ANANDA P. FÉLIX¹, SIMONE G. OLIVEIRA¹

¹Universidade Federal do Paraná, UFPR, Campus de Ciências Agrárias, Curitiba, PR, Brasil.

Contato: bruna.steil@ufpr.br / Apresentador: BRUNA W. S. ABECHÉ

Resumo: Objetivou-se avaliar os efeitos do *Bacillus subtilis* sobre a microbiota fecal, metabólitos de fermentação e indicadores inflamatórios e antioxidantes em cães adultos. Dezesesseis Beagles foram divididos em controle e teste, com administração de uma cápsula ao dia contendo *B. subtilis* ($2,5 \times 10^8$ UFC/animal). Os animais receberam dieta de alta digestibilidade (AD) por 20 dias, seguida de troca abrupta para dieta de baixa digestibilidade (BD) no dia 21. Os cães foram alimentados por mais 20 dias com a dieta BD. Nos dias 20, 23 e 40, fezes frescas e sangue foram coletados para análises de metabólitos de fermentação e microbiota fecal e NF- γ B e capacidade antioxidante total (CAT). O grupo teste apresentou menor pH fecal e tendência à redução de valerato e isovalerato nas fezes ($P < 0,05$). Houve aumento de ácidos graxos de cadeia ramificada nas fezes apenas do grupo controle alimentado com a dieta BD e menor putrescina fecal no grupo teste alimentado com a dieta AD ($P < 0,05$). Observou-se alteração no perfil da microbiota fecal e maior alfa-diversidade no grupo teste ($P < 0,05$). Cães do grupo teste alimentados com a dieta AD apresentaram maior CAT ($P < 0,05$). Os resultados indicam potenciais efeitos benéficos do *B. subtilis* sobre a funcionalidade intestinal e sistema antioxidante de cães.

Palavras-Chaves: Metabólitos fecais; Probiótico; Saúde intestinal; Suplementação.

EFFECTS OF BACILLUS SUBTILIS ON THE GUT MICROBIOTA AND FERMENTATION METABOLITES, AND INFLAMMATORY AND OXIDATIVE PROFILE OF DOGS SUBJECTED TO AN ABRUPT DIETARY CHANGE

Abstract: The objective was to evaluate the effects of *Bacillus subtilis* on the gut microbiota, fermentation metabolites, and inflammatory and antioxidant markers in adult dogs. Sixteen Beagles were divided into control and treatment groups, with the treatment group receiving one capsule/day of *B. subtilis* (2.5×10^8 CFU/animal). The animals received a highly digestible diet (HD) for 20 days, followed by an abrupt change to a low-digestible diet (LD) on day 21. Dogs were fed the LD diet for 20 days. Fresh feces and blood were collected on days 20, 23, and 40 to analyze fecal metabolites and microbiota and NF- γ B and total antioxidant capacity (TAC). The test group exhibited lower fecal pH and a tendency toward reduced fecal valerate and isovalerate ($P < 0.05$). There was an increase in fecal branched-chain fatty acids in the control group fed the LD diet and lower fecal putrescine in the test group fed the HD diet ($P < 0.05$). A change in the fecal microbiota profile and higher alpha-diversity was observed in the test group ($P < 0.05$). Dogs from the test group fed the HD diet exhibited higher TAC ($P < 0.05$). The results indicate potential beneficial effects of *B. subtilis* on gut functionality and antioxidant system of dogs.

Keywords: Fecal metabolites; Intestinal health; Probiotic; Supplementation.

Introdução: Probióticos do gênero *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, destacam-se pela formação de esporos resistentes ao sistema gastrointestinal (SGI) e pelo potencial de modular a microbiota intestinal, alterando benéficamente a sua composição e aumentando a diversidade (Hong et al., 2004; Bastos et al., 2020; Lima et al., 2020). Além disso, metabólitos derivados da fermentação microbiana associada ao *B. subtilis*, como o propionato e butirato, podem apresentar efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios no SGI, podendo interferir na resposta sistêmica (Padilla et al., 2017). Apesar disso, estudos em cães que avaliaram simultaneamente a microbiota intestinal e os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dessa cepa probiótica são escassos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de *Bacillus subtilis* sobre o microbioma, metabólitos de fermentação intestinal e marcadores inflamatórios e antioxidantes em cães adultos submetidos à mudança abrupta de dieta.

Material e Métodos: O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Foram utilizados 16 cães Beagle adultos (8 machos e 8 fêmeas), castrados, com 3 anos, peso médio de $11,3 \pm 1,36$ kg e escore de condição corporal de 4,25 (1: muito magro a 9: obeso). Os animais foram distribuídos ao acaso em dois grupos: Controle (sem probiótico) e Teste (administração de cápsula contendo *B. subtilis* - $2,5 \times 10^8$ UFC/animal/dia). Os cães receberam dieta de alta digestibilidade (AD) por 20 dias, seguida de troca abrupta para dieta de baixa digestibilidade (BD) por mais 20 dias (dias 21-40). Foi feita coleta total de fezes para análises de digestibilidade das dietas entre os dias 15-20 e 35-40. Amostras fecais frescas foram coletadas nos dias 20, 23 e 40 para análise de matéria seca (MS), escore, pH, amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR) e aminas biogênicas, por cromatografia gasosa, além de microbiota por sequenciamento do gene 16S rRNA. Nos mesmos dias, coletaram-se amostras sanguíneas para análise de NF- γ B por ELISA e capacidade antioxidante total (CAT), por espectrofotometria. Metabólitos de fermentação e variáveis sanguíneas foram analisados por ANOVA ou Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), com comparação de médias por Tukey ou Dunn ($P < 0,05$). Valores de $P > 0,05$ e $< 0,10$ foram considerados tendência. A microbiota fecal foi analisada por LEfSe (P corrigido $< 0,05$).

Resultado e Discussão: Os cães do grupo teste ($6,78 \pm 0,06$) apresentaram menor pH fecal que o controle ($7,09 \pm 0,10$), independente da dieta ($P < 0,05$), além de tendência à menor concentração fecal de isovalerato ($P = 0,058$) e valerato ($P = 0,081$). Corroborando, observou-se aumento de AGCR totais apenas nas fezes do grupo controle alimentado com dieta BD ($P < 0,05$).

Figura 1) e menor putrescina no grupo teste alimentado com dieta AD ($P < 0,05$, Figura 1). Esses resultados indicam que o probiótico pode contribuir para a redução de metabólitos putrefativos oriundos da fermentação de compostos nitrogenados no cólon, concordando com o observado por Bastos et al. (2020). O grupo teste apresentou maior alfa-diversidade independente da dieta ($P < 0,05$, Figura 2). O aumento na alfa-diversidade da microbiota é um biomarcador de melhora da funcionalidade intestinal em cães (Félix et al., 2022). As bactérias enriquecidas no grupo teste alimentado com a dieta AD incluíram *Gallintestinimicrobium propionicum*, *Faecalibacillus intestinalis* e *Phocaeicola plebeius* ($P < 0,05$). Durante a troca de dieta, também foram enriquecidas no grupo teste *Peptacetobacter hiranonis*, *Collinsella intestinalis* e *Sutterella*, associadas à eubiose (Lopes et al., 2024). No controle, houve maior abundância de bactérias potencialmente patogênicas, como *Peptostreptococcus russellii* ($P < 0,05$). O grupo teste ($196,3 \pm 4,82 \mu\text{M}$ Trolox) apresentou maior CAT, que o controle ($167,1 \pm 4,82 \mu\text{M}$ Trolox), quando alimentados com a dieta AD ($P < 0,05$), indicando efeito benéfico sistêmico. Não houve diferença nas demais variáveis ($P > 0,05$, dados não apresentados).

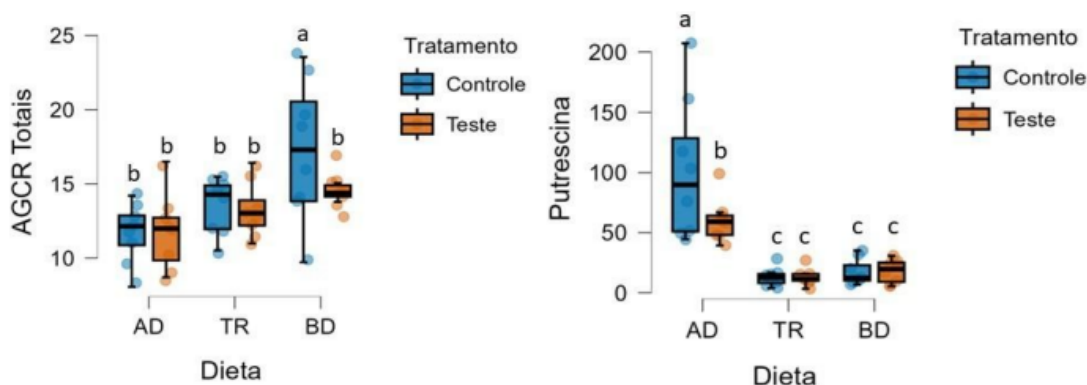


Figura 1. Concentração fecal de ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR, mMol/Mol) totais e putrescina (mg/kg) de cães alimentados com dietas de alta (AD) ou baixa (BD) digestibilidade recebendo (teste) ou não (controle) probiótico. $P < 0,05$ para tratamento x dieta. ^{a,b}Médias com letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

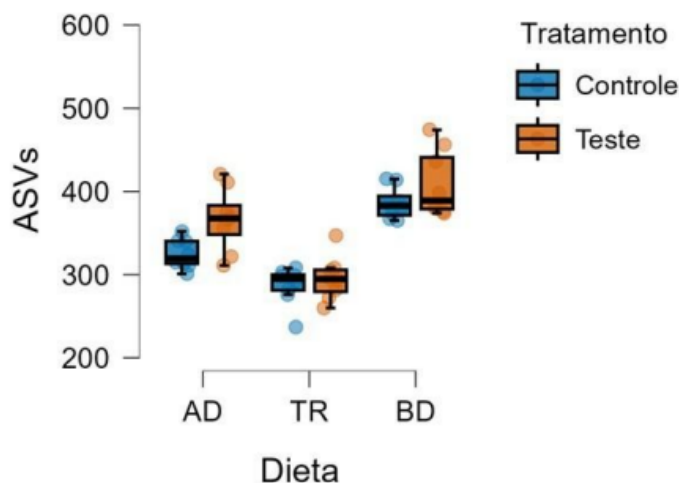


Figura 2. Número de ASVs da microbiota fecal de cães alimentados com dietas de alta (AD) ou baixa (BD) digestibilidade recebendo (teste) ou não (controle) probiótico. $P < 0,05$ para controle x teste e AD x Troca (TR) x BD.

Conclusão: A suplementação com *Bacillus subtilis* reduziu o valerato, isovalerato e putrescina fecal dos cães. Ainda, contribuiu com o aumento da diversidade da microbiota fecal, assim como aumento da capacidade antioxidante total, indicando potenciais benefícios à saúde intestinal e sistêmica dos cães.

Agradecimentos: Agradecemos à Tacto Biotecnologia pelo apoio à pesquisa e a VB alimentos pelo apoio ao laboratório.

Referências Bibliográficas: BASTOS, Tais et al. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n.116. 2020.LIMA, Daniele Cristina et al. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis* C-3102 improves gut health indicators and fecal microbiota of dogs. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 270. 2020.LOPES, Bruna Correa; CHEN, Chih-Chun; SUNG, Chi-Hsuan; ISHII, Patricia Eri; MEDINA, Luis Fernando da Costa; GASCHEN, Frederic P.; SUCHODOLSKI, Jan S.; PILLA, Rachel. Correlation between *Peptacetobacter hiranonis*, the baiCD gene, and secondary bile acids in dogs. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 216, 2024. HONG, H et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. **School of Biological Sciences**, Royal Holloway

University of London, Egham, Surrey TW20 0EX, UK, 2004.PADILLA, Iván; ESCOBAR, Gabriela. Alteraciones en el eje intestino-riñón durante la enfermedad renal crónica: causas, consecuencias y propuestas de tratamiento. **Revista Española de Nutrición Humana y dietética**, Pamplona, v. 21, n. 2, 2017.