AVALIAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA FECAL EM CÃES SAUDÁVEIS ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM PREPARAÇÕES DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS

STEPHANIE S. THEODORO1, THAILA C. PUTAROV1, KATIA SIVIERI2, VICTORIA MESA3, CAROLINE T. IKUDA1, LARA M. VOLPE1, FERNANDA S. MENDONÇA4, CAMILA GOLONI1, LUCAS SCARPIM1, ERICO M. RIBEIRO1, AULUS C. CARCIOFI1

1Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal – SP2Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp Araraquara – SP3University of Oviedo – Asturias - ES4PremierPet – Dourado - SP
Contato: sstheodoro@gmail.com

Resumo: A microbiota gastrointestinal é composta por população complexa de microrganismos. Alterações na composição da dieta e prebióticos têm sido os principais guias de pesquisa para a microbiota intestinal canina. Assim, objetivou-se avaliar a microbiota fecal de cães saudáveis adultos no período basal e após 30 dias de tratamento com três dietas: uma formulação recebeu 0% (CON), 0,3% de parede celular de levedura convencional (YCW) ou 0,3% de parede de celular de levedura solúvel (YCWs). Foram utilizados 24 cães beagle com oito repetições por dieta, em delineamento em blocos casualizados. Cada bloco durou 32 dias, foram coletados fezes frescas no início e final do experimento para análise de microbiota fecal. Alterações na composição da microbiota foram avaliadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Após 30 dias, houve aumento ($p<0,05$) de Fusobacteria e diminuição de Firmicutes na dieta YCW ($p<0,05$). Observou-se o efeito do tempo, independentemente tratamento, sugerindo efeito da formulação basal sobre a microbiota ($p<0,05$). Este estudo fornece informações sobre a resposta das comunidades bacterianas intestinais em cães após a administração de potenciais preparações prebióticas de YCW.
PalavrasChaves: Microbioma, bactéria, prebiótico

MOLECULAR ASSESSMENT OF THE FECAL MICROBIOTA IN HEALTHY DOGS BEFORE AND AFTER SUPPLEMENTATION WITH YEAST CELL WALL PREPARATIONS

Abstract: The gastrointestinal microbiota is composed by a complex microorganisms population. Changes in the composition of the diet and prebiotics have been the main research guides for the canine intestinal microbiota. Thus, the objective was to evaluate the fecal microbiota of healthy adult dogs at baseline and after 30 days of treatment with three diets: one formulation received 0% (CON), 0.3% of conventional yeast cell wall (YCW) or 0.3% soluble yeast cell wall (YCWs). 24 beagle dogs were used with eight repetitions per diet, in a randomized block design. Each block lasted 32 days, fresh feces were collected at the beginning and end of the experiment for analysis of fecal microbiota. Changes in the composition of the microbiota were evaluated by sequencing the 16S rRNA gene. After 30 days, there was an increase ($p <0.05$) in Fusobacteria and a decrease in Firmicutes in the YCW diet ($p<0.05$). The effect of time was observed, regardless of treatment, suggesting the effect of the basal formulation on the microbiota ($p<0.05$). This study provides information on the response of intestinal bacterial communities in dogs after the administration of potential prebiotic preparations of YCW.
Keywords: Microbioma, bacteria, prebiotic

Introdução: A microbiota gastrointestinal (GI) é composta por população complexa de microrganismos (Suchodolski, 2011), que contribuem com as funções metabólicas, protegem contra patógenos, afetam o sistema imunológico e, por meio dessas funções básicas, afetam direta ou indiretamente a maioria das funções fisiológicas (Pilla et al., 2020). Comparada aos fatores ambientais, a dieta desempenha papel importante no ajuste do equilíbrio do microbioma GI em cães. Diferentes proporções de proteínas e carboidratos, prebióticos e hábitos alimentares são os principais guias de pesquisa para a microbiota intestinal canina (Huang et al., 2020). Objetivou-se avaliar a microbiota fecal de cães saudáveis adultos no período basal e após 30 dias de tratamento com três diferentes dietas: uma controle e a formulação controle adicionada de duas preparações de parede celular de leveduras, com diferentes quantidades de mananoligossacarídeos solúveis.

Material e Métodos: Foram utilizados 24 cães beagle (3,5±0,91 anos), divididos em três dietas extrusadas: controle (CON) sem inclusão de parede celular de levedura, 0,3% PCL convencional (YCW) (composição: mananoligossacarídeos (MOS) totais 17,1%; MOS solúveis 2,1%, glucanas 25,1%) e 0,3% PCL solúvel (YCWs; composição: MOS 23,9%; MOS solúvel 22,2%, glucanas 24,9%). O experimento seguiu delineamento em blocos casualizados, com dois blocos de oito cães por tratamento. No tempo 0 (T0) e tempo 30 (T30) foram coletadas durante três dias consecutivos fezes frescas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. Para extração do DNA total das amostras foi empregado o kit comercial “ZR Fecal DNA MiniPrep®” de acordo com as recomendações do fabricante. Alterações na composição da microbiota foram avaliadas pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA. Os amplificados foram reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador “MiSeq” da Illumina® (Degnan and Ochman, 2012). Para determinar a diferença estatística da prevalência de táxons bacterianos entre os tratamentos foi aplicado o teste de Anova com teste post-hoc de Tukey-Kramer ($P < 0,05$) e posterior correção de Bonferroni. As análises foram feitas no programa estatístico de metagenômica STAMP: statistical analysis of metagenomic profiles (Parks et al., 2014). Os valores referentes à biodiversidade foram comparados pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Resultado e Discussão: O microbioma fecal de cães saudáveis foi co-dominado por cinco filos: Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria (Fig, 1). Dentro desta comunidade, muitos táxons principais pertenceram ao

filo Firmicutes. Após 30 dias de tratamento, observou-se aumento ($p<0,05$) de Fusobacteria e diminuição de Firmicutes ($p<0,05$) na dieta YCW (Fig. 1). Fusobacterium spp foi predominante após 30 dias em todos os tratamentos. Alguns autores associaram o filo Fusobacteria e o gênero Fusobacterium a cães controles saudáveis (Kim et al., 2017; Coelho et al., 2018). Porém, em humanos, este está associado a doenças GI, o que indica que o Fusobacterium desempenha papel diferente no trato GI de cães (Vazquez-Baeza et al., 2016; Pilla et al., 2020). Na dieta YCWs observou-se decréscimo de Proteobacteria, efeito potencialmente desejável pois alguns membros deste filo estão associados a diversas doenças (Garcia-Mazcorro et al., 2017; Pilla et al., 2020). Uma análise de correspondência simples foi realizada para investigar a associação entre os tratamentos e a composição da microbiota. Observou-se efeito do tempo; independentemente do tipo de tratamento a microbiota apresentou-se diferente ($p<0,05$) do período basal. Ao comparar apenas os grupos no T30 foram observadas as seguintes diferenças: YCWs; aumento de Lactobacillus ssp. e Bifidobacterium spp; YCW; aumento de Faecalibacterium spp., Fusobacterium spp. e Bacteroides spp; CON; aumento de Prevotella spp. e Megamonas spp. ($P<0,05$) (Fig. 2).

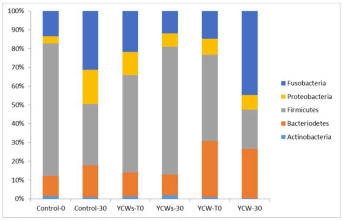


Figura 1: Determinação dos filos por tempo em todas as dietas.

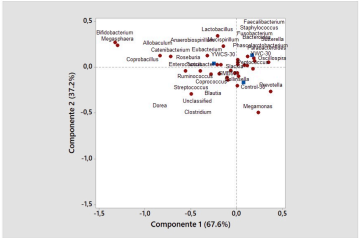


Figura 2: Análise dos principais componentes no tempo 30.

Conclusão: Conclui-se que independente da dieta administrada, Fusobacterium spp foi predominante no tempo 30. Houve decréscimo de Proteobacteria na dieta YCWs, o que pode ser relacionado a efeito positivo no trato gastrointestinal. São necessários mais estudos para explorar os efeitos potencialmente benéficos na saúde do hospedeiro, além das mudanças nas comunidades bacterianas.

Agradecimentos: À CAPES e FAPESP (2017/13623-7) pelo auxílio financeiro. À Affinity e Manfrim pelo suporte ao Laboratório. À Biorigin pelo financiamento do projeto.

Referências Bibliográficas: Suchodolski JS. 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. Veterinary Clinics North America Small Animal Practices. Garcia-Mazcorro et al. (2017), Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing. PeerJ 5:e3184; DOI 10.7717/peerj.3184. Kim et al. Differences in the gut microbiota? of dogs (Canis lupus familiaris) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform?. Gut Pathog (2017) 9:68. Coelho et al. Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. Microbiome (2018) 6:72. Pilla R and Suchodolski JS (2020) The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. Front. Vet. Sci. 6:498. Zongyu Huang, Zhiyuan Pan, Ruifu Yang, Yujing Bi & Xiaohui Xiong (2020): The canine gastrointestinal microbiota: early studies and research frontiers, Gut Microbes. Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. Degnan, P.H., Ochman, H., 2012. Illumina-based analysis of microbial community diversity. The ISME Journal 6, 183-194. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. Bioinformatics 30, 3123-3124.