MICROBIOTA FECAL DE CÃES ADULTOS SUPLEMENTADOS COM TEORES CRESCENTES DE SACHAROMYCES CEREVISEAE

LARISSA WÜNSCHE RISOLIA1, KARINE M. SANTOS1, PAULA TAKEARA2, ANA LUIZA C. MOREIRA3, JULIO CÉSAR C. BALIEIRO1, CRISTIANA F. F. PONTIERI2, MARCIO ANTONIO BRUNETTO1

1 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), São Paulo/Pirassununga-SP 2 Grandfood Ind. Com LTDA, Premier pet, Dourado - SP 3 Faculdade Anhanguera, Leme - SP
Contato: larissa.risolia@gmail.com

Resumo: Prebióticos podem promover a modulação benéfica da microbiota fecal e a levedura com metabólitos ativos de Saccharomyces cerevisiae (LAM) é um exemplo desse aditivo. Este estudo objetivou avaliar o efeito da adição de dois níveis de LAM na microbiota fecal de cães adultos saudáveis. Dezoito cães adultos com peso médio de 15,8±7,37 kg foram distribuídos de forma casualizada em três tratamentos: CD (dieta controle), LAM 0,3 (CD com 0,3% de LAM) e LAM 0,6 (CD com 0,6% de LAM). A microbiota foi determinada pelo método de sequenciamento Illumina para se identificar a proporção de filos e gêneros. Os resultados foram analisados no SAS, pelo teste de Tukey e foram considerados significativos valores de $p<0,05$. A adição de LAM aumentou os filos Actinobacteria, Firmicutes ($p=0,0048$ e $p<0,0001$, respectivamente) e o gênero Clostridium ($p=0,0059$). Além disso, a inclusão de LAM reduziu o filo Fusobacteria ($p=0,0008$) e os gêneros Allobaculum e Fusobacterium ($p=0,0265$ e $p=0,0006$, respectivamente). A inclusão de 0,6% de LAM aumentou o gênero Collinsela ($p=0,0052$) e reduziu Provotella ($p=0,0003$). Conclui-se que a adição 0,3 e 0,6% de LAM na dieta de cães alterou a proporção de filos e gêneros de bactérias presentes nas fezes de cães saudáveis.
Palavras Chave: bactérias; beta-glucanos; Illumina; mananoligossacarídeos; prebióticos

EFFECTS OF SUPPLEMENTING INCREASING LEVELS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE ON FECAL MICROBIOTA IN ADULT DOGS

Abstract: Prebiotics can promote beneficial modulation of the intestinal microbiota and yeast with active metabolites of Saccharomyces cerevisiae (LAM) is an example of this additive. This study aimed to evaluate the effect of adding two levels of LAM on the intestinal microbiota of dogs. Eighteen adult dogs with a mean weight of 15.8 ± 7.37 kg were randomly assigned to three treatments: CD (control diet), LAM 0.3 (CD with 0.3% LAM) and LAM 0.6 (CD with 0.6% LAM). Microbiota was determined by Illumina sequencing method to identify the proportion of phyla and genus. The results were analyzed by the Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004) by Tukey test, with significant values of $p<0.05$. The addition of LAM increased the phyla Actinobacteria, Firmicutes ($p=0.0048$ and $p<0.0001$, respectively) and the genus Clostridium ($p=0.0059$). In addition, a LAM inclusion reduced the Fusobacteria phylum ($p=0.0008$) and the genera Allobaculum and Fusobacterium ($p=0.0265$ and $p=0.0006$, respectively). A 0.6% LAM inclusion increased the Collinsela genus ($p=0.0052$) and reduced Provotella ($p=0.0003$). It was concluded that the addition 0.3 and 0.6% of LAM in the diet altered the proportion of phylum and genus of healthy dogs, and could improve animal health.
Keywords: bacteria; beta-glucan; Illumina; mannanoligosaccharides; prebiotic

Introdução: A microbiota fecal é determinada principalmente pela dieta e os prebióticos podem modular sua composição (Beloshapka et al., 2013). Estes aditivos estimulam seletivamente o crescimento de gêneros microbianos intestinais, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro, como proteção contra patógenos, maturação do sistema imunológico e modulação da absorção de nutrientes (Kelder et al., 2014). Um exemplo de prebiótico já utilizado na nutrição animal é a Saccharomyces cerevisiae, que pode ser processada para concentrar suas porções ativas, sendo então chamada de levedura com metabólitos ativos (LAM). Considerando os potenciais benefícios da modulação da microbiota, o objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da suplementação de níveis crescentes de LAM na microbiota fecal de cães adultos saudáveis.

Material e Métodos: Dezoito cães adultos com peso médio de 15,8 ± 7,37 kg e idade média de 3,3 ± 1,58 anos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em três tratamentos isonutritivos: CD (dieta controle); LAM 0,3 (CD com 0,3% de LAM) e LAM 0,6 (CD com 0,6% de LAM). Os animais foram adaptados aos tratamentos por 21 dias e, após esse período, fezes frescas foram coletadas de forma estéril para a análise da microbiota. O DNA das amostras foi extraído de acordo com McInnes e Cutting (2010). Após a amplificação do DNA, as amostras foram submetidas ao sequenciamento Illumina de acordo com Caporaso et al. (2010). As sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) para serem então comparadas ao banco de dados OTU Greengenes 13_8, com similaridade limite de 97%. Ao final da comparação, foram obtidos os resultados da composição de filo e gênero dos animais alimentados com os diferentes tratamentos. Os resultados foram analisados no SAS e comparados pelo teste de Tukey. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

Resultado e Discussão: Os filos predominantes foram Firmicutes, Fusobacteria e Bacteriodetes (Tabela 01), semelhante ao observado por Beloshapka et al. (2013). A LAM aumentou os filos Actinobacteria (p=0,0048) e Firmicutes (p<0,0001) enquanto Fusobacteria (p=0,0008) apresentou redução. O aumento de Actinobacteria foi reportado com o uso de prebióticos por Barry et al. (2012) e correlacionou-se este efeito ao aumento dos gêneros deste grupo. No presente estudo, o aumento de Collinsela (p=0,0052) pode ter proporcionado este efeito. O mesmo mecanismo pode explicar o aumento do filo Firmicutes, possivelmente causado pelo aumento de Clostridium (p=0,0059). Apesar de algumas cepas de Clostridium serem patogênicas, outras podem ser benéficas por atuarem na oxidação de carboidratos (Kelder et al., 2014). Como não foram observados sinais clínicos de infecção, pode-se aferir que o aumento tenha sido de cepas não patogênicas. As concentrações dos gêneros Prevotella (p=0,0003), Allobaculum (p=0,0265) e Fusobacterium (p=0,0006) diminuíram com a ingestão de LAM pelos cães. A redução do gênero Fusobacterium é considerada benéfica, uma vez que o gênero está associado ao desenvolvimento de doenças gastrintestinais (Swidsinksi et al., 2011). Apesar da literatura associar o aumento do gênero Prevotella com o conteúdo em carboidratos (Xu et al., 2015) este gênero reduziu, indicando a necessidade de mais estudos à respeito de substratos que favorecem seu crescimento.

Tabela 1 – Filos e gêneros bacterianos predominantes (em porcentagem das sequências totais) em fezes de cães alimentados com as dietas experimentais

	Dietas			
	DC	**LMA 0,3**	**LMA 0,6**	**Valor de p**
Filos				
Actinobacteria	0,160^{b}±0,0016	0,703^{ab}±0,0034	1,869^{a}±0,0055	0,0048
Bacteroidetes	11,990^{a}±0,0133	9,370^{ab}±0,0119	8,150^{b}±0,0112	0,0768
Firmicutes	60,050^{b}±0,0200	70,380^{a}±0,0186	70,760^{a}±0,0186	<0,0001
Fusobacteria	25,500^{a}±0,0178	17,960^{b}±0,0157	17,620^{b}±0,0156	0,0008
Proteobacteria	2,280±0,0061	1,560±0,0051	1,570±0,0051	0,5709
Gêneros				
Actinobateria				
Bifidobacterium	0,056±0,0010	0,090±0,0012	0,016±0,0005	0,8422
Collinsella	0,050^{b}±0,009	0,427^{b}±0,0027	1,441^{a}±0,0049	0,0052
Bacteroidetes				
Bacteroides	6,946±0,0104	7,392±0,0107	6,465±0,0100	0,8188
Parabacteroides	0,126±0,0014	0,070±0,0011	0,079±0,0011	0,9446
Prevotella	3,044^{a}±0,0070	0,584^{b}±0,0031	0,561^{b}±0,0031	0,0003
Firmicutes				
Lactobacillus	0,003±0,0002^{b}	0,402±0,0026^{a}	0,003±0,0002^{b}	0,0841
Streptococcus	0,0150,0005	0,061±0,0010	0,007±0,0003	0,8391
Clostridium	18,185^{b}±0,0158	24,513^{a}±0,0176	25,043^{a}±0,0177	0,0059
Allobaculum	6,905^{a}±0,0104	3,850^{b} ±0,079	3,996^{b}±0,0080	0,0265
Clostridium	0,024±0,0006	0,018±0,0006	0,021±0,0006	0,9975
Fusobacteria				
Fusobacteriaceae Other	0,611±0,0032	0,643±0,0033	0,692±0,0034	0,9849
Fusobacterium	24,888^{a}±0,0177	17,32^{b}±0,0155	16,928^{b}±0,0153	0,0006
Proteobacteria				
Sutterella	0,894±0,0038	0,487±0,0028	0,300±0,0022	0,3770
Campylobacter	0,000±0,0000	0,051±0,0009	0,016±0,0005	0,8022

As médias são seguidas pelo erro padrão; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,10).

Conclusão: A adição de 0,3 e 0,6% de LAM na dieta de cães foi capaz de alterar a proporção de filos e gêneros nas fezes, o que pode possivelmente melhorar a saúde geral do animal e demonstra seu potencial prebiótico para inclusão em alimentos para cães.

Referências Bibliográficas: Barry, K.A.; Middelbos, I.S.; Vester Boler, B.V.; Dowd, S.E.; Suchodolski, J.S.; Fahey J.R. Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. Journal of proteome research, v.11, p.5924-5933, 2012.
Beloshapka, A.N.; Dowd, S.E.; Suchodolski, J.S.; Steiner, J.M.; Swanson, K.S. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. FEMS microbiology ecology, v.84, p.532-541, 2013.
Caporoso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Costello, E.K. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods, v.7, p.335, 2010.
Kelder, T., Stroeve, J.M.; Bijlsma, S.; Radonjic, M.; Roeselers, G. Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. Nutrition & diabetes, v.4, p.122, 2014
McInnes, P.; Cutting, M. 2010. 1st ed.Manual of Procedures for Human Microbiome Project, Core Microbiome Sampling, Protocol A. Swidsinski, A.; Dorffel, Y.; Loening-Baucke, V.; Ruckert, J.C.; Ismail, M. Acute appendicitis is characterised by local invasion with Fusobacterium nucleatum/necrophorum. Gut, v.60, p.34-40, 2011.
Xu, Z.; Knight, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. British Journal of Nutrition, v.113, p.1-5, 2015.