

Microbiota de cães com doença inflamatória intestinal suplementados com β-glucanos e um *blend* prebiótico

Thaís Araújo Esteves Pereira¹, Andressa Rodrigues Amaral¹

Orientador: Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FVMZ), Universidade de São Paulo (USP)

thais.araujo.pereira@usp.br

Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram caracterizar a microbiota fecal de cães com doença inflamatória intestinal (DII) através da técnica de sequenciamento de última geração (Illumina) e avaliar os efeitos da suplementação de 0,1% de β-glucanos e 0,1% de um *blend* prebiótico nas populações bacterianas encontradas.

Métodos e Procedimentos

Foram selecionados 18 cães com D II em fase controlada, sem doenças concomitantes, que compuseram três grupos experimentais: A – suplementados com 0,1% de β-glucanos, B – *blend* (MOS + β-glucanos) e C – placebo; todos receberam a mesma dieta hipoalergênica hidrolisada, a qual foram adaptados por 30 dias e, após esse período, a dieta foi associada a um dos prebióticos ou placebo, na forma duplo-cego randomizada por 60 dias. Foram realizados hemograma, exames bioquímicos para *check up*, e para avaliação da microbiota, as abundâncias de cada filo e classe foram determinadas segundo modelo Linear misto generalizado do SAS, assim como o índice de alfa-diversidade Shannon. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, quando apresentaram diferença, comparados pelo teste de Tukey. Valores de P<0,05 foram considerados significativos (CEUA FMVZ USP 1102270218).

Resultados

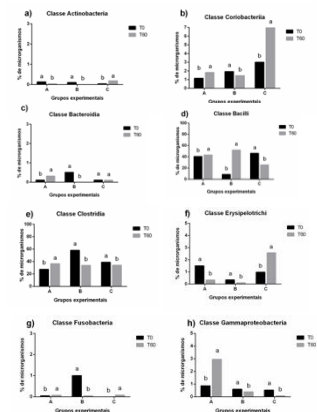
Em geral, nenhum animal incluso no estudo apresentou alterações nos exames laboratoriais que comprometessem a sua participação, de acordo com os critérios de inclusão. Foram identificados 10 filos em todos os grupos, dos quais 5 foram avaliados por testes estatísticos (Tabela 1). Foram caracterizadas 17 classes bacterianas, das quais 8 foram analisadas (Figura 1). A análise ANOVA apontou efeito da interação dos fatores tempo (T0 e T60) e tratamento (A, B e C) para ambos os táxons. A análise do índice de alfa-diversidade Shannon

demonstrou interação entre tempo e tratamento, sendo que somente o tratamento A aumentou a diversidade e a equidade microbiana [(AT0: 2,34^b ± 0,28; AT60: 2,87^a ± 0,28) (BT0: 2,64^a ± 0,28; BT60: 2,29^a ± 0,28) (CT0: 2,48^a ± 0,28; CT60: 2,72^a ± 0,28)] (p<0,05).

Tabela 1 – Porcentagem média de sequências dos filos encontrados pelo sequenciamento Illumina e erro padrão (EP) dos três grupos experimentais (A, B e C) nos tempos T0 e T60.

FILO	TRAT	T0		T60	
		% Média	EP	% Média	EP
Actinobacteria	A	3,44 ^{Ab}	3,82	0,79 ^{Ab}	0,91
	B	5,92 ^{Ab}	6,41	4,31 ^{Ab}	4,75
	C	2,57 ^{Ab}	2,88	14,60 ^{Ab}	14,33
Bacteroidetes	A	0,11 ^{Ab}	0,10	0,31 ^{Ab}	0,28
	B	0,51 ^{Ab}	0,46	0,00 ^{Ab}	0,00
	C	0,11 ^{Ab}	0,09	0,10 ^{Ab}	0,08
Firmicutes	A	84,58 ^{Ab}	5,63	90,69 ^{Ab}	3,65
	B	85,12 ^{Ab}	5,47	90,06 ^{Ab}	3,86
	C	88,79 ^{Ab}	4,30	66,34 ^{Ab}	9,64
Fusobacteria	A	0,04 ^{Ab}	0,05	0,07 ^{Ab}	0,09
	B	1,00 ^{Ab}	1,28	0,04 ^{Ab}	0,05
	C	0,00 ^{Ab}	0,00	0,08 ^{Ab}	0,09
Proteobacteria	A	0,90 ^{Ab}	0,74	3,09 ^{Ab}	2,48
	B	0,61 ^{Ab}	0,50	0,38 ^{Ab}	0,31
	C	0,55 ^{Ab}	0,45	0,06 ^{Ab}	0,05

Figura 1 – Porcentagem de microrganismos das classes Actinobacteria (a), Coriobacteria (b), Bacteroidia (c), Bacilli (d), Clostridia (e), Erysipelotrichi (f), Fusobacteria (g) e Gammaproteobacteria (h) nos tempos experimentais T0 e T60.



Legenda (Tabela 1 e Figura 1) TRAT. = tratamento. A = grupo β-glucano; B = grupo *blend* (MOS + β-glucano); C = grupo placebo. Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si e médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Conclusões

Através dos resultados encontrados, confirma-se a hipótese de que a adição de prebióticos, modula de forma positiva a microbiota fecal. Ao final do estudo, somente os animais tratados com 0,1% de β-glucanos apresentaram melhora da biodiversidade bacteriana fecal.

Referências Bibliográficas

KALENYAK, K. et al. Comparison of the intestinal mucosal microbiota in dogs diagnosed with idiopathic inflammatory bowel disease and dogs with food-responsive diarrhea before and after treatment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 2, 2018; OREL, R.; TROP, T. K. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 33, p. 11505–11524, 2014.

Microbiota of dogs with inflammatory bowel disease supplemented with β -glucans and a prebiotic blend

Thais A. E. Pereira, Andressa R. Amaral

Mentor: Marcio A. Brunetto

School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo

thais.araujo.pereira@usp.br

Objectives

The objectives of this study were to characterize the fecal microbiota of dogs with inflammatory bowel disease (IBD) using the latest generation sequencing technique (Illumina) and to evaluate the effects of 0.1% of β -glucans supplementation and 0.1% of a prebiotic blend on the populations found.

Materials and Methods

Eighteen dogs in controlled phase of IBD, with no concomitant illnesses, were selected and randomized in three experimental groups: A - supplemented with 0.1% β -glucans, or B – a prebiotic blend (MOS + β -glucans) or C - placebo; all received the same hydrolyzed hypoallergenic diet, which dogs were adapted to it for 30 days and, after this period, the diet was associated with one of the prebiotics or placebo in a double blinded form for 60 days. Full blood count, biochemical tests for checkup, and microbiota evaluation were performed, according to the abundance of each phylum and class, by the SAS Generalized Mixed Linear model, as well as the Shanon alpha diversity index. The data were analyzed by variance analysis (ANOVA) and when differences were found, they were compared by the Tukey test. P values < 0.05 were considered significant (CEUA FMVZ USP 1102270218).

Results

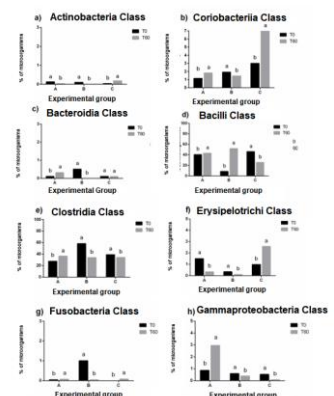
In general, all animals showed no changes in laboratory tests that compromised their participation in the study according to the inclusion criteria. Ten phyla were identified in all groups, of which five were statistically evaluated (Table 1). Seventeen bacterial classes were characterized, of which eight were analyzed (Figure 1). The ANOVA analysis revealed a significant effect of the interaction of the factors time (T0 and T60) and treatment (A,

B and C) for both taxons. The analysis of the Shannon alpha-diversity index showed an interaction between time and treatment, and only treatment A increased the microbial diversity and evenness [(AT0: $2.34^b \pm 0.28$; AT60: $2.87^a \pm 0.28$) (BT0: $2.64^a \pm 0.28$; BT60: $2.29^a \pm 0.28$) (CT0: $2.48^a \pm 0.28$; CT60: $2.72^a \pm 0.28$)] ($p < 0.05$).

Table 1 – Average percentage of phylum sequences found by Illumina sequencing and standard error (SE) of the three experimental groups (A, B and C) at times T0 and T60.

PHYLUM	Tx.	T0		T60	
		% Average	SE	% Average	SE
Actinobacteria	A	3.44 ^{Ab}	3.82	0.79 ^{Bb}	0.91
	B	5.92 ^{Aa}	6.41	4.31 ^{Ab}	4.75
	C	2.57 ^{Ab}	2.88	14.60 ^{Ab}	14.33
Bacteroidetes	A	0.11 ^{Ab}	0.10	0.31 ^{Aa}	0.28
	B	0.51 ^{Aa}	0.46	0.00 ^{Bb}	0.00
	C	0.11 ^{Aa}	0.09	0.10 ^{Aa}	0.08
Firmicutes	A	84.58 ^{Bb}	5.63	90.69 ^{Aa}	3.65
	B	85.12 ^{Bb}	5.47	90.06 ^{Aa}	3.86
	C	88.79 ^{Aa}	4.30	86.34 ^{Ab}	9.64
Fusobacteria	A	0.04 ^{Ab}	0.05	0.07 ^{Aa}	0.09
	B	1.00 ^{Aa}	1.28	0.04 ^{Ab}	0.05
	C	0.00 ^{Bb}	0.00	0.08 ^{Ab}	0.09
Proteobacteria	A	0.90 ^{Ab}	0.74	3.09 ^{Aa}	2.48
	B	0.61 ^{Aa}	0.50	0.38 ^{Bb}	0.31
	C	0.55 ^{Aa}	0.45	0.06 ^{Bb}	0.05

Figure 1 - Percentage of microorganisms of the classes Actinobacteria (a), Choriobacteria (b), Bacteroidia (c), Bacilli (d), Clostridia (e), Erysipelotrichi (F), Fusobacteria (g) and Gammaproteobacteria (h) in the experimental times T0 and T60.



Legend (Table 1 and Figure 1) Tx = treatment A = β -glucan group; B = mixture (MOS + β -glucan) group; C = placebo group. The means in the same column and followed by the same capital letter do not differ from each other and the means in the same line and followed by the same lowercase-letter do not differ by the Tukey-Kramer test ($p < 0.05$).

Conclusions

Through the obtained results, the hypothesis, that the addition of prebiotics positively modulates the fecal microbiota, was confirmed. At the end of the study, only animals treated with 0.1% β -glucans improved fecal biodiversity.

References

- KALENYAK, K. et al. Comparison of the intestinal mucosal microbiota in dogs diagnosed with idiopathic inflammatory bowel disease and dogs with food-responsive diarrhea before and after treatment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 2, 2018;
- OREL, R.; TROP, T. K. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 33, p. 11505–11524, 2014.