

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELLE PONS

MICROBIOTA FECAL E PARÂMETROS DE IMUNIDADE EM CÃES
ALIMENTADOS COM DIETAS DE DIFERENTES DENSIDADES NUTRICIONAIS
COM E SEM ADIÇÃO DE XILANASE

CURITIBA
2023

MARCELLE PONS

MICROBIOTA FECAL E PARÂMETROS DE IMUNIDADE EM CÃES
ALIMENTADOS COM DIETAS DE DIFERENTES DENSIDADES NUTRICIONAIS
COM E SEM ADIÇÃO DE XILANASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, ofertado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como um dos requisitos de obtenção de Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Gisele de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Ananda Portella Felix

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA

Pons, Marcelle

Microbiota fecal e parâmetros de imunidade em cães alimentados com dietas de diferentes densidades nutricionais com e sem adição de xilanase. / Marcelle Pons. – Curitiba, 2023.
1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Simone Gisele de Oliveira
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Ananda Portella Felix

1. Enzimas. 2. Bactérias. 3. Intestino. I. Oliveira, Simone Gisele de. II. Felix, Ananda Portella. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

Bibliotecário: Douglas Alex Jankoski CRB-9/1167



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -
40001016082P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARCELLE PONS** intitulada: **Microbiota fecal e parâmetros de imunidade em cães alimentados com dietas de diferentes densidades nutricionais com e sem adição de xilanase**, sob orientação da Profa. Dra. SIMONE GISELE DE OLIVEIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua *aprovação* no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Fevereiro de 2023.

Simone Gisele de Oliveira
SIMONE GISELE DE OLIVEIRA

Presidente da Banca Examinadora

Chayane da Rocha
CHAYANE DA ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Marcelo Zopollatto
MARCELO ZOPOLLATTO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus e meus guias espirituais, sempre presentes, atentos e benevolentes.

Ao meu marido, Pedro Henrique, o melhor recriador de Beagles do mundo. Ele, que sempre acreditou em mim, obrigada pelo amor, conselhos e broncas, pelo ombro de acalento e, principalmente, por sempre buscar despertar o meu melhor. Obrigada por ser você.

A minha família, pai, mãe e Vinícius, que sempre apoiaram todos os meus sonhos mesmo eu sendo a ovelha negra da família.

As minhas amigas, Fabiana, Bruna e Helena, que mesmo longe se fizeram presente nesses 20 anos de amizade. Obrigada pelo risadas intermináveis e apoio incondicional.

A Universidade Federal do Paraná, e a todo grupo do LENCAN (Renata, Gislaine, Karina, Eduarda, Nayara e Thais) e LEPNAN por sempre estarem dispostos a me ajudar.

A professora Simone e sua paciência e serenidade, obrigada pela oportunidade única e por aguentar as incontáveis dúvidas. A ela, professora Ananda e professor Alex, agradeço o mar de ensinamentos e por serem inspiração.

Aos Beagles mais lindos e amados do mundo: Dory, Pinhão, Lexa, Pedrita, Arya, Flora, Bart, Balu, Naruto, Diana, Phoebe, Dobby, João, Izzie, Bill e Ziggy. Agradeço pelas roupas rasgadas, arranhões e mordidas, mas, principalmente, pelas lambidas e rabinhos abanando todas as vezes que chego ao canil. Sem eles nada disso seria possível.

Aos meus animais Maria Eduarda, Beck Regina e Yasmin Babaloo, que me trazem a alegria e me inspiram a ser uma pessoa melhor todos os dias. Em especial ao Kovu Antônio (em memória), que acompanhou todo meu processo universitário e aguentou - com muito ciúmes, o cheiro de todos os animais possíveis. A saudade é constante.

Muito obrigada, de coração.

Marcelle Pons

“Sê forte e corajoso, pois o senhor teu Deus estará contigo por onde for”

(Josué 1:9)

“Se eu vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

RESUMO

Os estudos e tecnologias utilizadas para a fabricação de alimentos extrusados para cães e gatos crescem exponencialmente devido ao aumento do convívio familiar. Os diferentes teores de macronutrientes encontrados nas rações como, extrato etéreo (EE), proteína (PB) e fibra (FB) possibilitam a prescrição do alimento para objetivos específicos. As fontes de matéria prima utilizadas para a fabricação do alimento podem variar de acordo com o valor agregado ao produto, assim como dependendo do objetivo final a ser alcançado com a dieta. Através dos ingredientes diferentes respostas metabólicas e gastrointestinais são estimuladas no organismo do animal. Neste contexto, a enzima xilanase, amplamente utilizada na alimentação de monogástricos, pode aumentar a disponibilidade de polissacarídeos não amiláceos - comumente presentes na parede celular de alguns alimentos e, assim, facilitar ação de carboidrases endógenas e melhorar absorção de nutrientes. Neste trabalho foi testado o fornecimento de dietas com alta e baixa densidade nutricional, adicionadas ou não com a enzima xilanase, para 12 cães da raça Beagle. Após o fornecimento das dietas por 25 dias, amostras de fezes foram coletadas a fim de avaliar a interferência das dietas e enzima na microbiota. Coleta de sangue foi realizada ao fim do experimento com o objetivo de avaliar o efeito da enzima nos parâmetros de imunidade e potencial redox do organismo. Ao final do estudo não foi observada diferença nos parâmetros de imunidade e potencial redox, enquanto a ação da xilanase foi capaz de aumentar a diversidade da microbiota fecal em todos os tratamentos, independente da dieta. Dessa forma observa-se que a adição de enzimas pode apresentar indicativos de melhora da funcionalidade intestinal através do estímulo de diversidade da microbiota local; contudo, mais estudos serão necessários para assegurar sua relação direta com a imunidade do hospedeiro.

PALAVRAS CHAVES: enzimas, bactérias, intestino, regulação

ABSTRACT

The studies and technologies used for the manufacture of extruded diet for dogs and cats grow exponentially due to the increase of their participation in family life. The different diets and distinct levels of macronutrients, such as ether extract (EE), protein (CP) and fiber (FB) make possible to prescribe specific diets for different purposes. Food sources may vary according to the value added to the product, as well as depending on the final objective to be achieved with the diet. Through the nutritional source, different metabolic and gastrointestinal responses are stimulated in the animal's organism. In this context, the xylanase enzyme, widely used in monogastric feeding, can increase nutritional value to the food by breaking down non-starch polysaccharides - commonly present in the cell wall of carbohydrate source and facilitating the action of endogenous carbohydrase's, improving nutrient absorption. In this work, diets with high and low nutritional density, with or without xylanase, were tested in 12 Beagle dogs. After feeding the diets for 25 days, stool samples were collected to evaluate the interference of the diets and enzyme on the microbiota. Blood samples were collected at the end of the experiment to evaluate the effect of the enzyme on immunity parameters and redox potential of the organism. At the end of the study no difference was observed in the immunity and redox potential parameters, while the action of xylanase was able to increase the diversity of fecal microbiota in all treatments regardless of the diet. Thus, it is observed that the addition of enzymes may modulate the intestinal functionality through the stimulation of local microbiota diversity; however, further studies are needed to ensure its direct relationship with host immunity.

Key words: enzyme; bacteria; gut; regulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS (PNA)	13
FIGURA 2 - ESTRUTURA DOS POLÍMEROS DE HEMICELULOSE	14
FIGURA 3 - ESQUEMA DE FERMENTABILIDADE E SOLUBILIDADE DE FIBRAS E CARBOIDRATOS COMPLEXOS E FIBRAS. FONTES COMUNS DE FIBRAS UTILIZADAS NA INDÚSTRIA PET FOOD	15
FIGURA 4 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PcA) DA COMUNIDADE BACTERIANA EM FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM OU SEM XILANASE	41
FIGURA 5 - INDICADORES DE BIODIVERSIDADE DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM CADA TRATAMENTO. A. ÍNDICE CHAO1 (RIQUEZA). B. ÍNDICE DE SHANNON (DIVERSIDADE). RELAÇÕES SIGNIFICATIVAS SÃO APRESENTADAS PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS	43
FIGURA 6 - POTENCIAL DE REDUÇÃO DO PAR CYS/CYSS EM AMOSTRAS DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM OU SEM XILANASE	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS INGREDIENTES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA ANALISADA (% DE MATÉRIA SECA) DAS DIETAS COM ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM E SEM XILANASE 35

TABELA 2 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS (PNA) PRESENTES NAS DIETAS 36

TABELA 3 - FREQUÊNCIA DOS FILOS BACTERIANOS ENCONTRADOS NAS FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM OU SEM XILANASE 44

TABELA 4 - MEDIANAS DA ABUNDÂNCIA RELATIVA (%) DOS PRINCIPAIS GÊNEROS BACTERIANOS ENCONTRADOS NAS FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM OU SEM XILANASE.....45

TABELA 5 - MÉDIAS DE PORCENTAGEM DA AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM OU SEM XILANASE 46

LISTA DE ABREVIações

AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta

EB - Energia bruta

EE - Extrato etéreo

FB - Fibra bruta

FDA - Fibra em detergente ácido

FDN - Fibra em detergente neutro

g - Gramas

HD - Alta densidade

HD + X - Alta densidade com xilanase

kg - Quilogramas

LD - Baixa densidade

LD + X - Baixa densidade com xilanase

m - Metros

MM - Matéria mineral

MO - Matéria orgânica

PB - Proteína bruta

PNA - Polissacarídeo não amiláceo

TGI - Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 MERCADO PET FOOD	12
2.2 FONTES DE CARBOIDRATOS	12
2.3 POLISSACARÍDEOS NÃO AMILACEOS	13
2.3.1. Fibras insolúveis.....	15
2.3.2 Fibras solúveis	16
2.4 MICROBIOTA INTESTINAL.....	17
2.4.1. Microbiota x Dieta.....	19
2.4.2 Microbiota x imunidade	21
2.5. ADITIVOS ENZIMÁTICOS	23
2.5.1 Xilanase.....	23
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS.....	25

CAPÍTULO II – EFEITO DA ADIÇÃO DA XILANASE SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL E PARÂMETROS DA IMUNIDADE EM CÃES

1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 ANIMAIS, INSTALAÇÕES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS	34
2.3 MICROBIOTA FECAL.....	37
2.4 CITOMETRIA DE FLUXO	38
2.5 PARÂMETROS REDOX	39
2.6. CÁLCULOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
3. RESULTADOS.....	42
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A nutrição de cães e gatos tem entrado em pauta com maior frequência nos últimos anos. A partir da socialização cão x homem, um conceito de relacionamento interespecie foi criado e caracterizado pela sua crescente responsabilidade. Sendo então, o cão, um novo membro familiar, sua saúde têm se tornado foco de estudos a fim de garantir sua longevidade. A ideia de que dietas cumpram as exigências nutricionais específicas e, assim, propiciem saúde, já é amplamente conhecida.

Pesquisadores estudam tipos de alimento e composições dietéticas diversas com o intuito de avaliar sua interferência no organismo animal (BRESCIANI *et al.*, 2018; VASTOLO *et al.*, 2022) A diferente distribuição dos nutrientes, a matéria prima utilizada e a adição de aditivos, são capazes de estimular respostas metabólicas específicas (LI *et al.*, 2017).

Aditivos e enzimas estão sendo amplamente utilizados na nutrição de monogástricos, a fim de incrementar a digestibilidade de nutrientes, assim como proporcionar estímulo imunológico e/ou metabólico, e modulação de microbiota intestinal. Neste contexto, a enzima xilanase, amplamente utilizada em nutrição de monogástricos (CRAIG *et al.*, 2020), é capaz de romper ligações glicosídicas entre cadeias carbônicas de carboidratos e, promover a liberação de nutrientes encapsulados por polissacarídeos não amiláceos, presentes na parede celular desses alimentos. Ao romper tais complexos e degradar a parede celular, a viscosidade do alimento diminui, facilitando a ação de carboidrases endógenas e melhorando a absorção de nutrientes

O melhor aproveitamento de substratos dietéticos modula a microbiota intestinal e favorece o estado de eubiose, influenciado a homeostase e imunidade local e sistêmica do hospedeiro. Esse efeito é amplamente buscado pelo atual mercado *petfood* baseando-se no melhor aproveitamento do alimento e, conseqüentemente mais saúde e longevidade ao animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MERCADO PET FOOD

Em 2022, o mercado pet food representou o maior faturamento da indústria pets em comparação à cuidados veterinários e utensílios (ABINPET, 2022). Os estudos e tecnologias utilizados para a fabricação de alimentos extrusados crescem exponencialmente e justificam o número de diferentes tipos de rações hoje disponíveis. Além de alimentos específicos para cada fase de vida do cão, hoje é possível escolher entre variedades que diferem tanto em composição de nutrientes quanto matéria prima. Os diferentes teores de energia metabolizável (EM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB) e fibra (FB) encontrados nas rações, possibilitam a prescrição do alimento para objetivos específicos e público variado. As fontes de matéria prima utilizadas e suas variadas composições nutricionais, também são capazes de gerar melhor ou pior resposta metabólica e gastrointestinal no organismo do animal.

2.2 FONTES DE CARBOIDRATOS

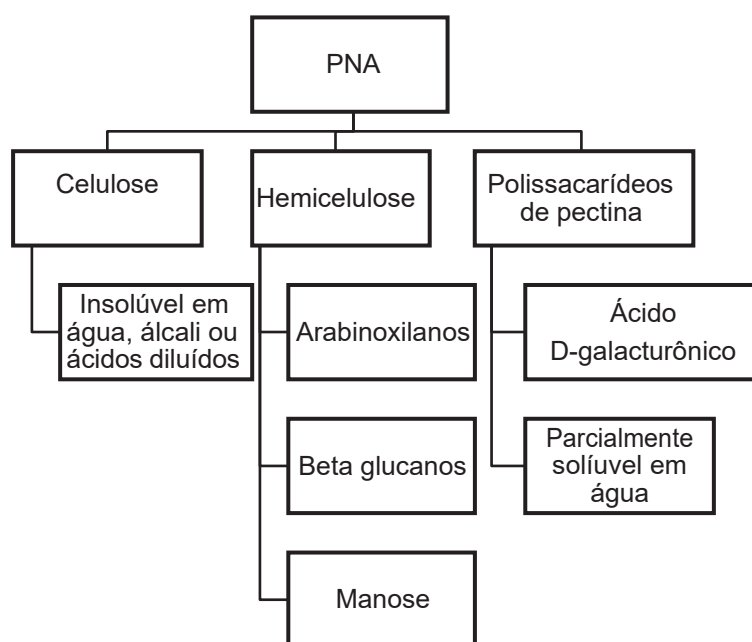
Em alimentos extrusados, o amido gelatinizado corresponde de 30% a 60% de carboidratos (ALVARENGA et al., 2021). Dentre as fontes de carboidratos, o arroz, sorgo, batata e milho são amplamente utilizados na fabricação de alimentos secos para cães devido às suas propriedades físicas e composição nutricional (MURRAY et al., 1998; ALVARENGA et al., 2021;). No estudo de Alvarenga *et al.* (2021), o qual reuniu trabalhos sobre análise química de milhos utilizados na fabricação de rações, foi observado que este ingrediente possui em média 74% de amido, 10% de polissacarídeos não amiláceos (PNA), 12% de fibra dietética total (FDT) e 10,6% de proteína bruta (PB), os quais estão distribuídos de forma heterogênea no grão e podem variar dependendo do cultivar do milho (ex. convencional, alto teor de proteína, alta amilose (AI; JANE, 2016)).

A digestibilidade do milho será influenciada tanto pela concentração de amilose:amilopectina presente no grão, quanto pela sua fração não digerível denominada polissacarídeo não amiláceo. Este, não sendo capaz de ser digerido no intestino delgado, chega ao intestino grosso onde é submetido a fermentação microbiana.

2.3 POLISSACARÍDEOS NÃO AMILACEOS

As fibras, ou polissacarídeos não amiláceos (PNA) (Figura 1), são ingredientes da parede celular de vegetais que podem variar de acordo com a classificação (ex. leguminosas, tubérculos, grãos) e o tecido de onde foi extraída. Os PNAs não são digeríveis pelas amilases endógenas e exógenas, e podem ou não ser fermentados quando chegam ao cólon, dependendo de sua composição estrutural (QI; TESTER, 2019).

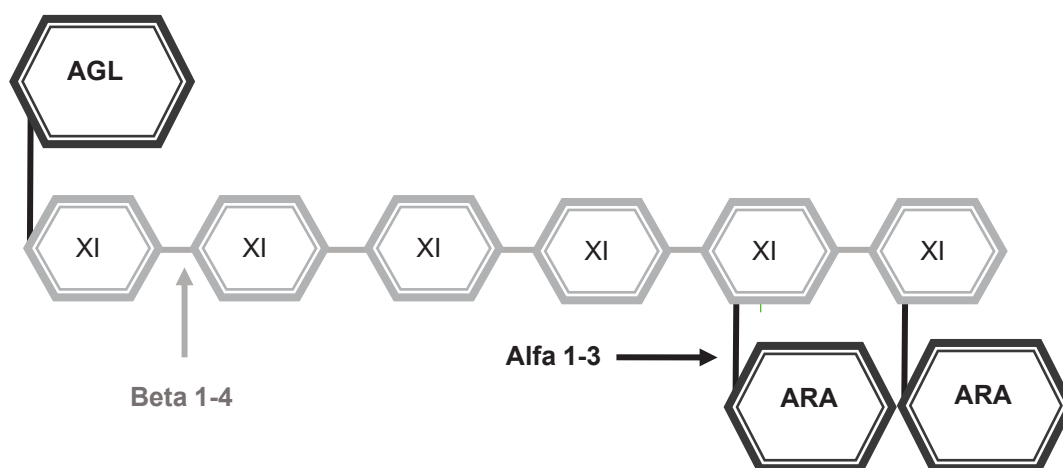
FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS(PNA).



FONTE: Adaptado de CHOCT *et al.* (2010).

No grão de milho, a celulose (22%) e hemicelulose (70%) são os PNAs em maior concentração, especialmente quando na forma de farelo. A celulose caracteriza-se como um polissacarídeo linear de moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β 1,4 (GEORGE; SABAPATHI, 2015; AI; JANE, 2016). Já a hemicelulose possui moléculas de D-xilose em sua cadeia principal e arabinose nas cadeias laterais, denominando-se como arabinoxilanas (AI; JANE, 2016) (Figura 2). Ambas possuem como finalidade garantir resistência e flexibilidade à célula devido ao entrelaçamento com pectinas e ligninas na parede celular (RAVEN *et al.*, 2007).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DOS POLÍMEROS DE HEMICELULOSE: GLUCORONOARABINOXILANO.



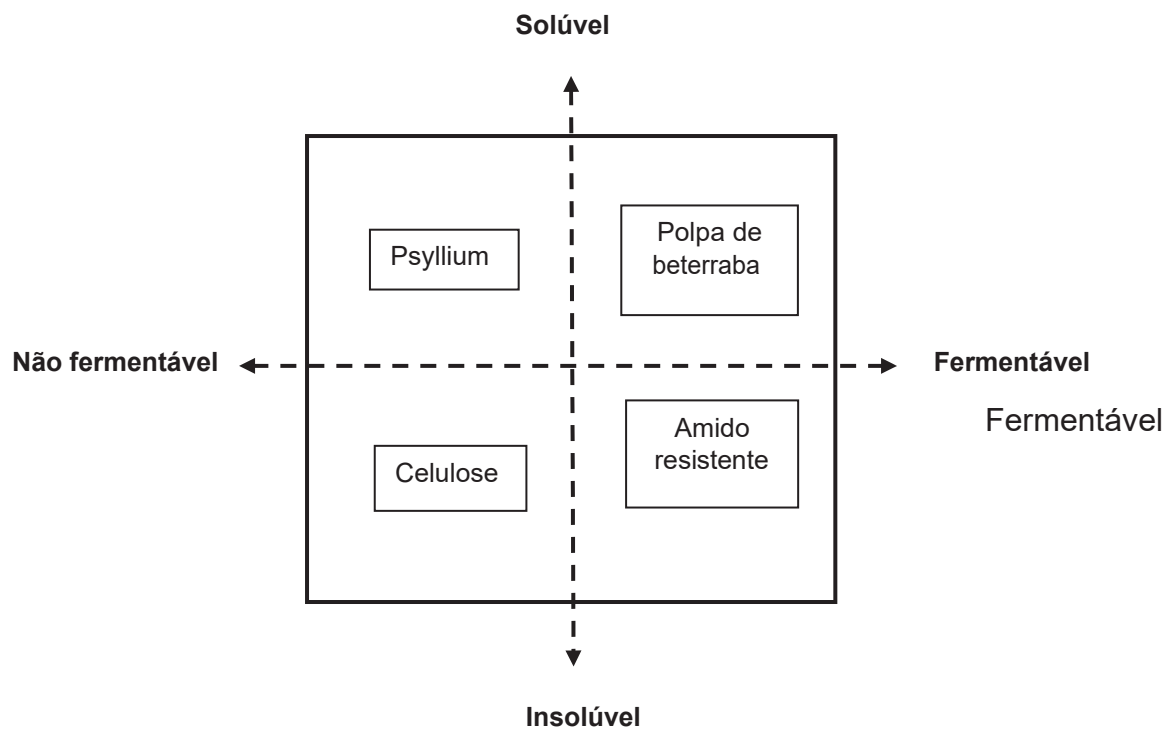
FONTE: Adaptado de RAVEN *et al.* (2007)

AGL = Ácido glucurônico, ARA = Arabinose, XIL = Xilose

Seu consumo e aplicabilidade clínica pode estar correlacionado a quatro características: fermentação, solubilidade, viscosidade e capacidade de formar gel (MCRORIE, 2015). Enquanto a polpa de beterraba é considerada uma fibra solúvel, viscosa e fermentável a celulose é insolúvel, não fermentável e não viscosa (GODOY *et al.*, 2013). As duas classes apresentam funções e características distintas no trato gastrointestinal e, assim, são capazes de alterar química e fisicamente o bolo alimentar de diferentes maneiras (Figura 3) (GUEVARA *et al.*, 2008). Dentre os benefícios, são capazes de modular o trânsito intestinal e estimular bactérias locais e

seus metabólitos secundários à fermentação, promovendo melhora na funcionalidade intestinal (SOUZA NOGUEIRA et al., 2019).

FIGURA 3 - ESQUEMA DE FERMENTABILIDADE E SOLUBILIDADE DE FIBRAS E CARBOIDRATOS COMPLEXOS. FONTES COMUNS DE FIBRAS UTILIZADAS NA INDÚSTRIA PET FOOD.



FONTE: Adaptado de Wernimont et al. (2020),

2.3.1. Fibras insolúveis

As fibras insolúveis possuem limitada capacidade de retenção de água em sua estrutura, ou seja, não são capazes de transformar o bolo alimentar em consistência gelatinosa (GODOY et al., 2013; MCRORIE, 2015). Exemplos de fibras insolúveis comumente utilizadas são: celulose, farelo de trigo e farelo ou casca de arroz (MCRORIE; FAHEY, 2013). Estas, por possuírem baixa ou ausente capacidade fermentativa, podem promover redução do tempo de passagem no trânsito gastrointestinal (MCRORIE, 2015). Dentre os exemplos, a celulose é acrescida à alimentação com o objetivo de diminuir a energia metabolizável, aumentar volume de alimento ou melhorar a qualidade das fezes ao prevenir a constipação (PROLA et al.,

2010). Entretanto, os variados tipos de celulose podem gerar respostas diferentes de acordo com o tamanho e formato da partícula. A variação ocorre devido ao estímulo mecânico que estas fibras geram na mucosa intestinal estimulando a secreção de água e a propagação de contrações intestinais. Ações essas, proporcionais ao tamanho e forma das partículas (rugosa ou lisa) (LEWIS; HEATON, 1999).

O estudo de Bueno et al. (2000) concluiu que o incremento de celulose à dieta de gatos domésticos estimulou o consumo de alimento e água, além de promover crescimento bacteriano intestinal de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Pasteurella spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Salmonella spp.*, além de diminuir *E. coli* e *Streptococcus spp.* Em frangos de corte (ABAZARI et al., 2016), a lignocelulose da casca de arroz também resultou em aumento da população de *Lactobacillus sp.* e diminuição de *E. coli* no trato gastrointestinal. Entretanto, a adição de 2.7% de lignocelulose (farinha de arroz) à dieta de cães, promoveu diminuição de bactérias *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, e *Clostridium leptum*, quando comparado com dietas acrescidas de polpa de beterraba na mesma proporção (KRÖGER et al., 2017).

2.3.2 Fibras solúveis

É a fração da fibra capaz de reter água em sua molécula, em maior ou menor proporção dependendo da origem (MCRORIE, 2015). Ao hidratar, a fibra aumenta de tamanho e garante sua característica viscosa (SAULNIER et al., 2007; MCRORIE; FAHEY, 2013; HO Do et al., 2021) . Entretanto, fatores como taxa de cisalhamento, temperatura, umidade, composição química e peso molecular, podem interferir na viscosidade(DIKEMAN; FAHEY, 2006). Quando em alta concentração, o subconjunto de moléculas fibrosas e seus polissacarídeos pode se unir através de ligações cruzadas e resultar na formação de um gel viscoelástico do quimo alimentar (DIKEMAN; FAHEY, 2006; SAULNIER et al., 2007; MCRORIE; FAHEY, 2013;). Este gel é capaz de diminuir a digestão e absorção de nutrientes por restringir o acesso de α -amilases ao alimento (SAULNIER et al., 2007). O alimento viscoelástico mal digerido chega ao intestino grosso e serve de substrato para fermentação microbiana (DIKEMAN; FAHEY, 2006).

De forma geral, as fibras solúveis podem ser classificadas como: 1. não viscosa e fermentável (ex. fibra de soja); 2. viscosa e fermentável (ex. beta glucana - aveia e cevada, goma guar, pectina, polpa de beterraba); 3. viscosa e não fermentável (ex. psyllium) (MCRORIE; FAHEY, 2013; WERNIMONT et al., 2020)

Dentre as fibras instituídas na nutrição animal, a polpa de beterraba é amplamente utilizada devido sua moderada fermentabilidade (MIDDELBOSS et al., 2007; KRÖGER et al., 2017). O estudo realizado por Middelbos *et al.* (2007) concluiu que a digestibilidade de fibras do alimento foi maior em dietas acrescidas de polpa de beterraba em relação à celulose, assim como a população de Bifidobacteria foi maior ($P < 0,05$).

2.4 MICROBIOTA INTESTINAL

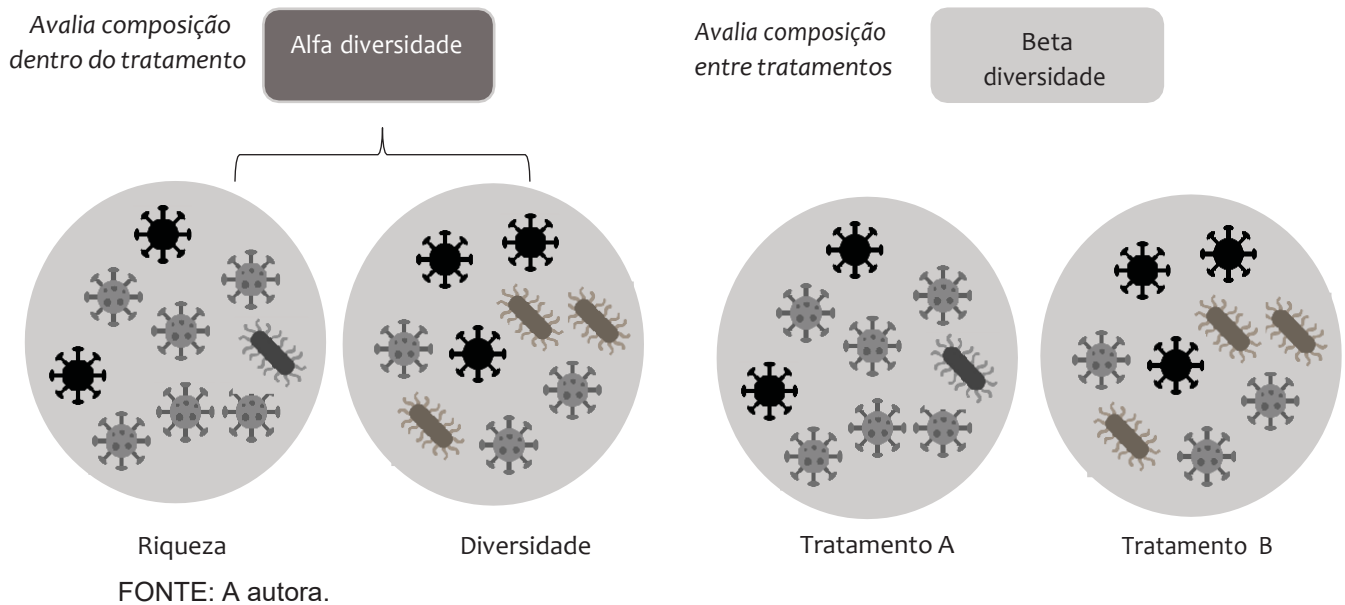
O microbioma intestinal é todo o agregado genético dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal do hospedeiro enquanto o termo microbiota se refere aos microrganismos em si (WERNIMONT et al., 2020).

O estado de eubiose é caracterizado por uma microbiota rica e diversa, em que bactérias potencialmente benéficas pertencentes principalmente aos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Fusobacterium em cães, são predominantes às patogênicas, sejam elas, Proteobacteria e Actinobacteria, as quais encontram-se em minoria no ambiente (IEBBA et al., 2016; RATAJCZAK et al., 2019; PILLA; SUCHODOLSKI, 2021).

A avaliação estatística da microbiota pode ser analisada de duas formas, 1. beta diversidade, a qual avalia a diversidade entre dois tratamentos, 2. alta diversidade. A alfa diversidade avalia tanto a riqueza da microbiota de determinada amostra, ou o número de táxons ali presentes, quanto a diversidade, ou seja, a distribuição e uniformidade em que esses táxons são distribuídos na amostra (Figura 4). A diversidade e riqueza dos microrganismos locais está diretamente relacionada com idade, raça, dieta, pH e doenças crônicas, os quais são capazes de interferir, benéficamente ou não, na comunidade (YANG et al., 2017; CHUNG et al., 2018; SCHMIDT et al., 2018; WERNIMONT et al., 2020;). Contudo, o status de eubiose não é caracterizado apenas pela alta riqueza de táxons. A proporção de microrganismos

no meio, assim denominada diversidade, é mais importante no equilíbrio do bioma local (MAYNARD *et al.*, 2012; STALEY *et al.*, 2018; TIZARD; JONES, 2018).

FIGURA 4. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA MICROBIOTA INTESTINAL.



As populações microbianas estão sujeitas a duas fortes pressões seletivas: a pressão exercida pela própria microbiota, que tende a diversificar a genômica microbiana para diminuir a competição entre eles, e aquela exercida pelo hospedeiro que, ao contrário, tende a homogeneizar os genomas, garantindo que as funções exercidas pela microbiota, importantes para sua saúde, não sejam codificadas por uma única espécie, mas por espécies mais distantes evolutivamente. Assim, a perda de uma espécie bacteriana não corresponde à perda da função alcançada pela espécie perdida. Essas duas pressões seletivas coexistem em um microbioma saudável em perfeito equilíbrio. A superação de uma das duas levaria inevitavelmente a um desequilíbrio, denominado disbiose, favorecendo riqueza genômica individual ou redundância funcional (IEBBA *et al.*, 2016).

Hospedeiro e microbiota possuem uma relação simbiótica na qual, de forma complementar, são capazes de digerir alimentos por meio de sacarólise, proteólise e lipólise, garantindo assim a nutrição de ambos (WERNIMONT *et al.*, 2020). O produto da digestão não passível de ação enzimática do hospedeiro torna-se substrato de

fermentação bacteriana, gerando subprodutos como gás (metano, dióxido de carbono, hidrogênio), amônia, aminoácidos de cadeia ramificada, produto resultante da proteólise bacteriana (*p*-cresol, indol) e, entre os mais importantes, os ácidos graxos de cadeia curta, ex. propionato, butirato e acetato (WERNIMONT et al., 2020). De forma geral, os subprodutos da fermentação são influenciados tanto pela dieta, a qual disponibiliza substratos específicos, quanto pela comunidade bacteriana no local, em que bactérias específicas utilizarão os substratos para fermentação e produzirão metabólitos secundários (PEREIRA; CLEMENTE, 2021). A ação resultante destes produtos é capaz de controlar o crescimento de bactérias patogênicas, manter a integridade da mucosa intestinal e modular a resposta imunológica (TIZARD; JONES, 2018; PILLA; SUCHODOLSKI, 2021)

Dessa forma, a funcionalidade intestinal não é dependente apenas da composição da microbiota, mas da integridade da mucosa e da resposta imunológica frente aos microrganismos ambientais (TIZARD; JONES, 2018; PILLA; SUCHODOLSKI, 2021).

2.4.1. Microbiota x Dieta

Em cães, foi sugerido que a proporção de macronutrientes é mais importante para manutenção da microbiota intestinal do que a fonte proteica em si (ex. animal vs vegetal) (BRESCIANI *et al.*, 2018).

O guia de recomendação nutricional de cães e gatos FEDIAF (2021), indica 48g/1000kcal EM como nível mínimo de proteína para cães adultos saudáveis. Uma fonte proteica para ser considerada de qualidade deve possuir alta quantidade de proteína proporcionalmente aos outros macronutrientes, perfil de aminoácidos de acordo com as exigências do animal, e bom aproveitamento pelo organismo. A digestibilidade encontrada em diferentes fontes proteicas é capaz de variar a microbiota intestinal, uma vez que os nutrientes não absorvidos pelo hospedeiro estarão disponíveis para bactérias locais (WERNIMONT et al., 2020), fato esse, corroborado pelo estudo de Bresciani et al. (2018) no qual fontes proteicas distintas (vegetal vs animal, mas com perfis de aminoácidos e digestibilidade similares) foram capazes de interferir na comunidade bacteriana de cães da mesma forma.

Estudos observaram que cães alimentados com alta concentração de proteína, 45,77% MS (EPHRAIM; COCHRANE et al., 2020; EPHRAIM; I JACKSON et al., 2022) e 52,9% kcal/total (JACKSON, 2022) aumentaram produção de toxina urêmica produzidas pela microbiota, além de diminuir geração de ácidos graxos de cadeia curta, e aumentar a população de bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridium spp.* e *Streptococcus spp.* (EPHRAIM; COCHRANE et al., 2020. EPHRAIM; I JACKSON et al., 2020).

O estudo de Tramontano et al. (2018) avaliou *in vitro* a resposta de bactérias intestinais comuns em seres humanos, frente a diversas preferências dietéticas e observaram o efeito de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano) no crescimento de algumas espécies bacterianas. Foi observada diminuição do crescimento de bactérias *Blautia clarus*, *B. xylanisolvens* and *P. merdae*, e *B. obeum*. Outras (*C. perfringens* e algumas espécies de *Lactobacillus spp.*) dependeram de alta concentração destes aminoácidos para promover sua colonização local.

A ingestão de lipídeos para cães recomendada pelo FEDIAF (2021) é de no mínimo 13,75g/1000kcal ME. O fato de carnívoros possuírem alta capacidade de digestão de dietas com elevada concentração de gordura, torna este macronutriente uma fonte essencial de energia (XENOULIS; STEINER, 2010). A fonte de lipídeo, assim como sua proporção nas rações, mostrou-se capaz de influenciar o metabolismo animal (BRESCIANI et al., 2018). Vastolo et al. (2022) testaram a influência de fonte de gordura animal (65g/1000kcal ME) e vegetal (55g/1000kcal ME) na microbiota de cães, e evidenciaram incremento de bactérias do gênero *Lactobacillus spp* em cães que consumiram óleo vegetal. Além disso, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacteroides*, *Clostridium spp.* parecem estar envolvidos na digestão e absorção de lipídeos (VASTOLO et al., 2022).

Dentre os macronutrientes capazes de influenciar o microbioma, os carboidratos complexos caracterizados como fibras, estão entre os nutrientes com maior resposta fermentativa (BUENO et al., 2000; KRÖGER et al., 2017; QI; TESTER, 2019). O tipo de fibra utilizado na dieta, grau de solubilidade e fermentação, além de sua concentração, também se mostraram capazes de influenciar a microbiota. Middelbos et al. (2010) observaram que animais que consumiram polpa de beterraba apresentaram maior concentração de microrganismos intestinais pertencentes ao filo Firmicutes em comparação à Fusobacteria, predominante no grupo controle.

Enquanto Simpson et al. (2002) observaram decréscimo de pH fecal (pH 5.75 vs 6.09) em cães alimentados com dietas com diferente teor de polpa de beterraba (13.9% vs 6.9%).

2.4.2 Microbiota x imunidade

A homeostase imunológica intestinal é dependente tanto da microbiota e seus produtos fermentativos, quanto da saúde sistêmica do hospedeiro e seu potencial redox. Estes, influenciam na renovação e integridade da barreira epitelial (OHIRA *et al.*, 2012; TIZARD; JONES, 2018).

A microbiota por si só, com seus padrões moleculares associados aos patógenos (MAMPs) localizados na parede bacteriana estimulam secreção de citocinas envolvidas na diferenciação de macrófagos e células dendríticas, resultando na ativação de células Treg (MASLANIK *et al.*, 2012). Estas células T liberam citocina IL-10, reconhecida por sua função anti-inflamatória e imunossupressora (RATAJCZAK *et al.*, 2019). Enquanto os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), resultantes da fermentação exercida por elas, são absorvidos tanto por difusão simples quanto transporte ativo nas células epiteliais intestinais, porém cada um possui uma função e sítio de ação específico (RATAJCZAK *et al.*, 2019). Enquanto os colonócitos utilizam butirato como fonte de energia e estímulo para produção de mucina, o propionato mostrou-se capaz de modular o sistema nervoso simpático e a secreção de leptinas em camundongos, enquanto o acetato aumentou a diferenciação de células T em inflamações agudas (DEN BESTEN *et al.*, 2013; MILLIGAN *et al.*, 2017; RATAJCZAK *et al.*, 2019; HO DO *et al.*, 2021). De forma geral, os AGCC são considerados hábeis em promover efeito antioxidante (OHIRA *et al.*, 2012) e imunomodulatório na funcionalidade gastrointestinal (MAYNARD *et al.*, 2012; RATAJCZAK *et al.*, 2019). Roe *et al.* (2002) observaram maior crescimento bacteriano em culturas *in vitro* sem inoculação de AGCC, corroborando com estudos posteriores que relataram inibição de crescimento bacteriano na presença destes ácidos (TRAMONTANO *et al.*, 2018). Este mecanismo de inibição ainda não está totalmente elucidado, porém há hipótese de acúmulo de toxinas intracelulares bacterianas (ROE *et al.*, 2002) ou desequilíbrio de pH gerado por estes substratos, modulando crescimento de bactérias patogênicas (TRAMONTANO *et al.*, 2018; HO DO *et al.*, 2020).

Do ponto de vista do hospedeiro, o TGI é considerado uma porta de entrada de patógenos. As células de defesa (macrófagos, neutrófilos, células *natural killers*) presentes na lâmina própria do tecido intestinal e em seu tecido linfóide associado (GALT), agem como uma barreira funcional capaz de modular a invasão de patógenos (RATAJCZAK *et al.*, 2019; PEREIRA; CLEMENTE, 2021). A barreira epitelial da mucosa desempenha um papel central na defesa intestinal, servindo não apenas como uma barreira física e passiva à translocação microbiana, mas como um sensor e um canal de comunicação entre hospedeiro e microbiota (MAYNARD *et al.*, 2012; RATAJCZAK *et al.*, 2019). Este contato torna o epitélio local susceptível a danos oxidativos induzidos por oxidantes luminiais provenientes da peroxidação lipídica das células e produtos do metabolismo bacteriano (H_2S) (CIRCU; AW, 2012).

Dentre os principais sistemas redox envolvidos estão os pares de glutathiona (GSH/GSSG) e cisteína/cistina (Cys/CySS). Estes sistemas controlam a proliferação, diferenciação e apoptose celular através da sinalização da via AMPK (5'-monofosfato-adenosina proteína quinase), uma proteína capaz de agir como reguladora da energia celular (CIRCU; AW, 2012). A capacidade dessas duplas, em oxidar ou reduzir suas moléculas, as torna capazes de diminuir ou aumentar a resposta oxidativa dependendo da exigência do metabolismo (CIRCU; AW, 2012). Inflamações intestinais são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) através da peroxidação lipídica das células epiteliais, resultante das lesões celulares ocasionadas por citocinas inflamatórias ou agentes infecciosos (CHONG *et al.*, 2017; CANDELLONE *et al.*, 2022;). Este desbalanço no sistema antioxidante, assim como a interrupção no controle da sinalização redox é denominado estresse oxidativo (JONES, 2006; CIRCU; AW, 2012; CANDELLONE *et al.*, 2022); Animais que se encontram em estresse oxidativo exacerbado podem ter suas funções metabólicas prejudicadas (CIRCU; AW, 2012).

2.5. ADITIVOS ENZIMÁTICOS

2.5.1 Xilanase

A adição de enzimas na alimentação animal é amplamente estudada, seja em animais de produção ou pets (SILVA et al., 2016; GONZÁLEZ-ORTIZ et al., 2019; RISOLIA et al., 2019; VAN HOECK et al., 2021). Sua utilização tem potencial de melhorar a absorção do alimento através da sua capacidade em promover lise de polissacarídeos não amiláceos, especialmente xilanas, e assim aumentar a disponibilidade dos nutrientes pelos animais (RISOLIA et al., 2019; VAN HOECK et al., 2021).

Carboidrases como as xilanases, são capazes de quebrar cadeias de xilose, unidas por ligações xilosídicas do tipo β 1-4, presentes na parede celular de alimentos vegetais (CHEN et al., 2021; VAN HOECK et al., 2021). Esta lise permite que nutrientes intracelulares e componentes de membrana sejam liberados e submetidos a processos de digestão endógenos e/ou fermentativos pelas bactérias intestinais. Os oligossacarídeos produzidos através da hidrólise dos polissacarídeos não amiláceos possuem propriedades prebióticas (MIDDELBOSS *et al.*, 2007).

Prebióticos são moléculas passíveis de fermentação bacteriana, os quais estimulam o crescimento de organismos potencialmente benéficos, enquanto reprimem a colonização dos patógenos (CRAIG et al., 2020). Os xilo-oligossacarídeos resultantes da hidrólise realizada pelas xilanases estão correlacionados com melhor desempenho em aves por meio da modulação do sistema imune (AL-SULTAN *et al.*, 2016), por meio da microbiota e aumento da produção de AGCC (YOU; KIM, 2021; YANG *et al.*, 2017).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O equilíbrio da microbiota intestinal é variável em função da espécie, idade, dieta e saúde sistêmica do animal. Dentre estes, o alimento é um dos principais responsáveis pela manutenção da eubiose em cães. Estudos buscam maneiras de

promover incremento de digestibilidade em ingredientes com menor valor biológico, a fim de aumentar seu aproveitamento pelo organismo do animal. A utilização de aditivos enzimáticos na dieta possibilita que alimentos com maior concentração de fatores antinutricionais sejam adequadamente aproveitados e absorvidos. A enzima xilanase possui potencial de quebrar moléculas de PNAs e, assim, aumentar a utilização de oligossacarídeos seja via absorção intestinal ou fermentação bacteriana. Independente da via, o melhor aproveitamento do alimento é capaz de promover modulação da microbiota e da imunidade, e contribuir para longevidade dos cães.

REFERÊNCIAS

- ABAZARI, A.; NAVIDSHAD, B.; AGHJEHGESHLAGH, M. **The effect of rice husk as an insoluble dietary fiber source on intestinal morphology and Lactobacilli and Escherichia coli populations in broilers.** v.10, n.3, p.217-224, 2016.
- ABINPET, **Manual PetFood Brasil** – Referência em qualidade e segurança dos alimentos. 10º Edição, 2019
- AI, Y.; JANE, J. L. Macronutrients in Corn and Human Nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 581–598, 2016
- AL-SULTAN, S; ABDEL-RAHEEM, S.M; GHAREEB, W.R. Comparative effects of using prebiotic, probiotic, synbiotic and acidifier on growth performance, intestinal microbiology and histomorphology of broiler chicks. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 2, p. 187-195, 2016.
- ALVARENGA, I.; DANTON, A. N.; ALDRICH, C. G. A review: nutrition and process attributes of corn in pet foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.
- BRESCIANI, F.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOLSKI, J. S.; *et al.* Effect of an extruded animal protein-free diet on fecal microbiota of dogs with food-responsive enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1903–1910, 2018.
- BUENO, A. R.; CAPPEL, T. G.; SUMOLD, G. D.; *et al.* Feline colonic microbes and fatty acid transport: effects of feeding cellulose, beet pulp and pectin/gum arabic fibers. **Nutrition Research**, v.20, n.9, p 1319-1328, 2000.
- CANDELLONE, A.; GIROLAMI, F.; BADINO, P.; JARRIYAWATTANACHAIKUL, W.; ODORE, R. Changes in the Oxidative Stress Status of Dogs Affected by Acute Enteropathies. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 6, 2022.
- CHEN, Y.; XIE, Y.; AJUWON, K. M.; *et al.* Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: A Review. **Frontiers in Nutrition**, v.8, 1-10, 2021.
- CHOCT, M.; DERSJANT-LI, Y.; MCLEISH, J.; PEISKER, M. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: A review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1386–1398, 2010.
- CHONG, W. C.; SHASTRI, M. D.; ERI, R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 777, p. 1-19, 2017.
- CHUNG, W. S. F.; WALKER, A. W.; VERMEIREN, J.; *et al.* Impact of carbohydrate substrate complexity on the diversity of the human colonic microbiota. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 1, 2018.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2012.
- CRAIG, A. D.; KHATTAK, F.; HASTIE, P.; BEDFORD, M. R.; OLUKOSI, O. A. Xylanase and xylo- oligosaccharide prebiotic improve the growth performance and

concentration of potentially prebiotic oligosaccharides in the ileum of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 61, n. 1, p. 70–78, 2020.

DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A. K.; *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v.54, não paginado, 2013.

DIKEMAN, C. L.; FAHEY, G. C. Viscosity as related to dietary fiber: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, p.649-663, 2006.

EPHRAIM, E.; COCHRANE, C. Y.; JEWELL, D. E. Varying protein levels influence metabolomics and the gut microbiome in healthy adult dogs. **Toxins**, v. 12, n. 8, p. 1–16, 2020.

EPHRAIM, E.; I JACKSON, M.; YERRAMILI, M.; E JEWELL, D. Soluble Fiber and Omega-3 Fatty Acids Reduce Levels of Advanced Glycation End Products and Uremic Toxins in Senior Dogs by Modulating the Gut Microbiome. **Journal of Food Science and Nutrition Research**, v. 03, n. 01, p. 18–33, 2020.

FEDIAF Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, 2021.

GEORGE, J.; SABAPATHI, S. N. Cellulose nanocrystals: Synthesis, functional properties, and applications. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 45–54, 2015.

GODOY, M. R. C.; KERR, K. R.; FAHEY, G. C. Alternative dietary fiber sources in companion animal nutrition. **Nutrients**, v.5, p.3099-3117, 2013.

GONZÁLEZ-ORTIZ, G.; DOS SANTOS, T. T.; VIENOLA, K.; *et al.* Response of broiler chickens to xylanase and butyrate supplementation. **Poultry Science**, v. 98, n. 9, p. 3914–3925, 2019.

GUEVARA, M. A.; BAUER, L. L.; ABBAS, C. A.; *et al.* Chemical composition, in vitro fermentation characteristics, and in vivo digestibility responses by dogs to select corn fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1619–1626, 2008.

IEBBA, V.; TOTINO, V.; MANCINI, C.; CORAZZIARI, E. S. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New microbiologica**, v.39,p.1-12, 2016.

HO DO, M.; SEO, Y. S.; PARK, H. Y. Polysaccharides: bowel health and gut microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.

JACKSON, M. I. Macronutrient Proportions and Fat Type Impact Ketogenicity and Shape the Circulating Lipidome in Dogs. **Metabolites**, v. 12, n. 7, 2022.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **ANTIOXIDANTE & REDOX SIGNALING**, v. 8, n. 9 & 10, 2006.

KRÖGER, S.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. Influence of lignocellulose and low or high levels of sugar beet pulp on nutrient digestibility and the fecal microbiota in dogs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 4, p. 1598–1605, 2017.

LEWIS, S. J.; HEATON, K. W. **Roughage Revisited The Effect on Intestinal Function of Inert Plastic Particles of Different Sizes and Shape**, v.44, n.4, p.744-748, 1999.

LI, Q.; LAUBER, C. L.; CZARNECKI-MAULDEN, G.; PAN, Y.; HANNAH, S. S. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. **mBio**, v. 8, n. 1, 2017.

MASLANIK, T.; TANNURA, K.; MAHAFFEY, L.; *et al.* Commensal Bacteria and MAMPs Are Necessary for Stress-Induced Increases in IL-1 β and IL-18 but Not IL-6, IL-10 or MCP-1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v.489, 2012.

MCRORIE, J. W. Evidence-based approach to fiber supplements and clinically meaningful health benefits, part 1. **Nutrition Today**, v. 50, n. 2, p. 82–89, 2015.

MCRORIE, J. W.; FAHEY, G. C. A review of gastrointestinal physiology and the mechanisms underlying the health benefits of dietary fiber: Matching an effective fiber with specific patient needs. **Clinical Nursing Studies**, v. 1, n. 4, 2013.

MIDDELBOS, I. S.; BOLER, B. M. V.; QU, A.; *et al.* Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

MIDDELBOS, I. S.; FASTINGER, N. D.; FAHEY, G. C. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 11, p. 3033–3044, 2007.

MILLIGAN, G; SHIMPUKADE, B; ULVEN, T; HUDSON, B. Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors. **Chemical reviews**, v. 117, p. 67-110, 2017.

MURRAY, S. M.; FAHEY, G. C.; MERCHEN, N. R.; SUNVOLD, G. D.; REINHART, G. A. Evaluation of Selected High-Starch Flours as Ingredients in Canine Diets. **American Society of Animal Science**, v.77, p.2180-2186,1998.

OHIRA, H.; FUJIOKA, Y.; KATAGIRI, C.; *et al.* Butyrate enhancement of interleukin1 β production via activation of oxidative stress pathways in lipopolysaccharide-stimulated THPP1 cells. **J. Clin. Biochem. Nutr**, v. 50, n. 1, p. 59–66, 2012.

PEREIRA, A. M.; CLEMENTE, A. Dogs' Microbiome From Tip to Toe. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.45,p.1-13, 2021.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet, **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.51, n.3, p. 605-621,2021.

PROLA, L.; DOBENECKER, B.; MUSSA, P. P.; KIENZLE, E. Influence of cellulose fibre length on faecal quality, mineral excretion and nutrient digestibility in cat. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 3, p. 362–367, 2010.

QI, X.; TESTER, R. F. Utilisation of dietary fibre (non-starch polysaccharide and resistant starch) molecules for diarrhoea therapy: A mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.122, p.572-577, 2019

RATAJCZAK, W.; RYŁ, A.; MIZERSKI, A.; *et al.* Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived shortchain fatty acids (SCFAs). **Acta Biochimica Polonica**, v.66, n.1, p.1-12, 2019.

RAVEN, P. H; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan. 8ª Edição, 2007.

RISOLIA, L. W.; SABCHUK, T. T.; MURAKAMI, F. Y.; *et al.* Effects of adding dried distillers grains with solubles (DDGS) to dog diets supplemented with xylanase and protease. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, 2019

ROE, A. J.; O'BYRNE, C.; MCLAGGAN, D.; BOOTH, I. R. **Inhibition of Escherichia coli growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity**. v. 148, p.2215-2222, 2002.

SAULNIER, L.; GUILLON, F.; SADO, P. Plant Cell Wall Polysaccharides in Storage Organs: Xylans (Food Applications). *In*: SAULNIER, L.; GUILLON, F.; SADO, P. **Comprehensive Glycoscience**, v.2. Editora Elsevier, Amsterdã/Holanda, p. 653-689, 2007.

SCHMIDT, M.; UNTERER, S.; SUCHODOLSKI, J. S.; *et al.* The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 2018.

SILVA, J. R. DA. Uso De Resíduo Seco De Destilaria Contendo Solúveis (Ddgs), Com E Sem Xilanase, Na Alimentação De Cães. **Animal feed Science and Technology**, v.220,p. 136-142, 2016.

SOUZA NOGUEIRA, J. P.; HE, F.; MANGIAN, H. F.; OBA, P. M.; DE GODOY, M. R. C. Dietary supplementation of a fiber-prebiotic and saccharin-eugenol blend in extruded diets fed to dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 11, p. 4519–4531, 2019.

STALEY, C.; KAISER, T.; KHORUTS, A. Clinician Guide to Microbiome Testing. **Digestive Diseases and Sciences**, v.63, p.3167-3177, 2018

TIZARD, I. R.; JONES, S. W. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 307–322, 2018.

TRAMONTANO, M.; ANDREJEV, S.; PRUTEANU, M.; *et al.* Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 514–522, 2018.

VAN HOECK, V.; SOMERS, I.; ABDELQADER, A.; *et al.* Xylanase impact beyond performance: A microbiome approach in laying hens. **PLoS ONE**, v. 16, n. 9, p. 1–18, 2021.

VASTOLO, A.; RIEDMÜLLER, J.; CUTRIGNELLI, M. I.; ZENTEK, J. Evaluation of the Effect of Different Dietary Lipid Sources on Dogs' Faecal Microbial Population and Activities. **Animals**, v. 12, n. 11, 2022.

WERNIMONT, S. M.; RADOSEVICH, J.; JACKSON, M. I.; *et al.* The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–24, 2020.

YANG, X.; DARKO, K. O.; HUANG, Y.; *et al.* Resistant starch regulates gut microbiota: Structure, biochemistry and cell signalling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.42, p.306-318, 2017.

YOU, I. W.; KIM, M. J. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: Breed, age, and body condition score. **Animals**, v. 11, n. 8, 2021. MDPI.

CAPÍTULO II – EFEITO DA ADIÇÃO DA XILANASE SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL E PARÂMETROS DA IMUNIDADE EM CÃES

RESUMO

Promover longevidade e saúde são os objetivos da nutrição pet. Rações que possuem menor digestibilidade, podem ser acrescidas de enzimas que facilitem sua digestão e favoreçam a ação de bactérias intestinais em metabolizar os substratos provenientes da dieta. Neste estudo, 12 cães da raça Bagle foram alimentados com dietas de alta e baixa densidade nutricional, adicionadas ou não com a enzima xilanase. O experimento foi delineado em forma de bloco casualizado, sendo 60 dias no total. A interferência da dieta no equilíbrio da microbiota foi observada através de números de OTUs bacterianos e parâmetros de imunidade e potencial redox, com o intuito de avaliar a capacidade da enzima em promover modulação da microbiota intestinal e do sistema imune. A adição de xilanase aumentou a diversidade bacteriana, independente da dieta fornecida ($P < 0,05$). Não houve diferença na concentração de filos entre os tratamentos, porém dentre os gêneros encontrados, *Faecalibaculum spp.*, *Holdemonella spp.*, *Blautia spp.*, *Peptoclostridium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Ruminococcaceae* foram predominantes, sendo todas exceto *Faecalibaculum spp.*, encontradas em maior concentração na dieta LD+X. Os resultados indicam que a concentração de substrato dietético resultante da hidrólise da enzima foi capaz de estimular a liberação de PNAs no ambiente e aumentar a fermentação bacteriana. Assim, a adição da enzima interferiu positivamente na diversidade bacteriana, sendo capaz de contribuir para eubiose intestinal de cães, entretanto, não houve resultado estatístico ($P > 0,05$) entre os tratamentos na avaliação do estímulo imune e potencial redox provocado pelas dietas, provavelmente devido a boa condição de saúde dos animais e ausência de estresse oxidativo.

PALAVRAS-CHAVE: enzima; bactérias; intestino; regulação.

XYLANASE EFFECT ON INTESTINAL MICROBIOTA AND IMMUNE PARAMETERS IN DOGS

ABSTRACT

Longevity and health are the goals of pet nutrition. Extruded diet with lower digestibility can be added with enzymes that facilitate digestion and increase the action of intestinal bacteria to metabolize the substrates from the diet. In this study, diets with high and low nutrient density, with or without xylanase, were tested. The interference of the diet on the microbiota balance was observed through immunity and redox potential parameters, in order to evaluate the capacity of the enzyme to promote modulation of the intestinal microbiota and immune system. The addition of xylanase increased bacterial diversity, regardless of the diet ($P < 0.05$). There was no difference in the concentration of phyla among treatments, but among the genera *Faecalibaculum*, *Holdemonella*, *Blautia*, *Peptoclostridium*, *Peptococcus*, and *Ruminococcaceae* were predominant. Except for *Faecalibaculum*, all were found in higher concentration in the LD+X diet. The results indicate that the concentration of dietary substrate resulting from enzyme hydrolysis was able to stimulate the release of PNAs into the environment and increase bacterial fermentation. However, there was no statistical result ($P > 0.05$) about immune stimulation and redox potential induced by treatments, probably due to the good health of the animals and the absence of oxidative stress.

KEY WORDS: enzyme, bacteria, gut, regulation.

1. INTRODUÇÃO

O investimento no estudo da nutrição de animais cresce exponencialmente. Uma vez que os pets são hoje considerados membros da família, prover saúde e, consequentemente, longevidade são os principais objetivos dos trabalhos atuais. A dieta equilibrada de acordo com recomendações nutricionais (NRC, 2006; FEDIAF 2021) é uma das principais responsáveis pela modulação do sistema imune, seja diretamente através de estímulo de células de defesa ou, indiretamente através do equilíbrio da microbiota intestinal. Independente do sentido do estímulo, o alimento deve ser capaz de suprir todos os requerimentos nutricionais, além de modular respostas metabólicas e imunológicas que propiciem saúde a longo prazo aos cães.

Os ingredientes da dieta e sua proporção, são capazes de interferir na digestibilidade do alimento e na microbiota intestinal. Esta, já mostrou ser capaz de estimular o sistema imune dependendo de sua composição. A condição de disbiose intestinal é capaz de ocasionar inflamação e estresse oxidativo no organismo o qual interfere negativamente na resposta imunológica (MINAMOTO et al., 2015; CANDELLONE et al., 2022;).

Ração com alta densidade nutricional pode ser categorizada comercialmente como *premium*, enquanto rações *standart* comumente apresentam baixa densidade nutricional, além de ser composta por ingredientes de menor custo e, muitas vezes, menor digestibilidade. A alta quantidade de polissacarídeos não amiláceos (PNA) originados de parede celular de cereais (CHOCT et al., 2010), ingrediente comum nestes alimentos, possuem o potencial de aumentar a viscosidade do alimento, e diminuir a digestibilidade e absorção de nutrientes (BRITO et al., 2008). Nestes casos, enzimas exógenas podem ser acrescidas ao alimento com a intenção de degradar estes complexos e promover incremento de digestibilidade (BEDFORD; COWIESON, 2012) em rações de menor valor agregado.

Um exemplo de enzima comumente utilizada em nutrição de monogástricos é a xilanase (BEDFORD; COWIESON, 2012; CRAIG et al., 2020). Através da quebra da fração xilana da hemicelulose (MENG et al., 2005; RISOLIA et al., 2019), a enzima é capaz de diminuir a viscosidade do conteúdo intestinal favorecendo a ação de amilases endógenas (MENG et al., 2005). Alguns oligossacarídeos não passíveis de digestão, são fermentados pela microbiota intestinal, possuindo potencial ação prebiótica. Tal ação advém do resultado da fermentação bacteriana desses

substratos, a qual é capaz de produzir ácidos graxos de cadeia curta como acético, propiônico e butírico. Estes, são capazes de influenciar o pH intestinal e interferir na colonização da microbiota local, seja estimulando bactérias potencialmente benéficas ou diminuindo crescimento das potencialmente patogênicas (CRAIG et al., 2020; CHEN et al., 2021)

Dentre os prebióticos comumente utilizados, os fruto-oligossacarídeos (FOS) e mono-oligossacarídeos (MOS) tiveram sua eficácia comprovada em cães (BRADY et al., 2004; BEDFORD, 2018; BAUTIL et al., 2019) . Os xilo-oligossacarídeos (XOS) resultantes da degradação das xilanas, são compostos de xilose unidos por ligações xilosídicas β 1-4 com grau de polimerização de 2 a 7 monômeros (CHEN et al. 2021). Os XOS foram eficientes em modular a microbiota de suínos (CHEN et al., 2021) e em humanos (CHUNG et al., 2007) enquanto em frangos de corte foi capaz de influenciar na imunomodulação (YIN *et al.*, 2019).

Uma vez que a enzima xilanase possui potencial ação de modular o sistema imune e a microbiota intestinal em outras espécies, no presente estudo foi avaliada a composição e diversidade da microbiota em cães que consumiram dietas com alta e baixa densidade nutricional, acrescidas ou não de xilanase, assim como a interação das dietas com a resposta imune, avaliada por meio da mensuração de células fagocíticas, porcentagem de linfócitos TCD4 circulantes e potencial redox.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.

2.1. ANIMAIS, INSTALAÇÕES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o experimento foram utilizados 12 cães adultos da raça Beagle (sendo seis machos e seis fêmeas), castrados, com idade de $3,5 \pm 0,1$ anos e peso médio de $11,3 \pm 1,07$ kg. Os animais passaram por exame clínico e físico antes e após o período experimental. Os cães apresentaram escore médio de condição corporal de $4,5 \pm 0,1$ em uma escala de um a nove (um, magro e nove, obeso; sendo pontuações quatro

ou cinco consideradas ideais), segundo Laflamme (1997). Os animais foram alojados individualmente em baias de alvenaria cobertas (5 metros de comprimento x 2 metros de largura) contendo uma cama e livre acesso à água. As grades laterais permitem contato visual e limitada interação com cães vizinhos. A temperatura ambiente variou de 16°C a 28°C com um ciclo claro-escuro de 12 h (luz das 6 h às 18 h). Os animais permaneciam em uma área gramada de 1.137,84 m² para o desenvolvimento de exercícios voluntários e enriquecimento ambiental por aproximadamente 4h/dia. Os cães também eram visitados pelos pesquisadores duas vezes ao dia, criando a socialização.

Os animais foram distribuídos em um delineamento em blocos casualizados (períodos), totalizando 6 repetições/tratamento. O experimento foi composto por quatro tratamentos, em esquema fatorial 2 x 2, repetidos em dois períodos com 12 cães em cada período (3 cães por tratamento). Todos os tratamentos foram distribuídos em cada período. O período experimental foi composto por 2 períodos de 30 dias, sendo 25 dias de adaptação e 5 dias destinados à coleta de fezes frescas e sangue.

2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (08h e 17h) em quantidade suficiente para atender a necessidade energética diária recomendada para adultos em manutenção, segundo equação proposta pelo NRC (2006):

$$\text{NEM (kcal/dia)} = 130 \times \text{Peso corporal (kg)}^{0,75}$$

Foram avaliadas duas dietas com diferentes níveis nutricionais, alta e baixa densidade nutricional. com e sem adição da enzima xilanase, ambas formuladas de acordo com as exigências nutricionais do NRC (2006). A dieta caracterizada como alta densidade possuía em média 5146,55 kcal/kg, 30,57% proteína bruta (PB) e 15,33% extrato etéreo (EE), enquanto a com baixa densidade nutricional apresentava em média 4646,77 kcal/kg, 22,71% PB e 8,67% de EE (Tabela 1).

Os tratamentos experimentais foram compostos pelas dietas: alta densidade nutricional sem adição de xilanase (High density = HD); alta densidade nutricional com

adição de xilanase (HD+X); baixa densidade nutricional sem adição de xilanas (Low density = LD); baixa densidade nutricional com adição de xilanase (LD+X).

A enzima xilanase adicionada à dieta foi a Econase - XT25 (AB Vista, Wiltshire, UK) (I.V.B. 3.2.1.8) produzida a partir de cepas de *Trichoderma reesei*, contendo 160.000 BXU/g. As unidades xilanas (BXU) foram determinadas em substrato de xilano (extraído de *Betula alba*) a 50°C e pH 5,3.

Após a mistura, os ingredientes das dietas foram moídos em peneiras de malha 1,0 mm e posteriormente extrusados. As enzimas foram incluídas por revestimento, em uma quantidade de 0,5 g/kg de dieta, adicionadas no misturador após a inclusão da gordura de frango. A gordura de frango foi aplicada em temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) sobre o alimento resfriado e promoveu uma adesão completa do pó da enzima aos croquetes, conforme descrito por Tortola et al. (2013). Em seguida, as dietas foram aspergidas com o palatilizante (hidrolisado de fígado de ave na forma líquida), e aplicados por cobertura. Os ingredientes e a composição química analisada das dietas estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS INGREDIENTES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA ANALISADA (% DE MATÉRIA SECA) DAS DIETAS COM ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM E SEM XILANASE.

Item	Densidade nutricional			
	Alta (HD)	Baixa (LD)		
Ingredientes (g/kg)				
Milho moído	445,77	557,49		
Farelo de glúten de milho 21	-	200		
Farinha de vísceras de aves	245	170		
Protenose	150	-		
Polpa de beterraba	20	-		
Palatabilizante	20	20		
Casca de arroz	-	20		
Gordura de aves	100	15		
Sal branco comum	5	5		
Premix†	4	4		
Cloreto de potássio	5,66	3,33		
Cloreto de colina	2	2		
Propionato de cálcio	2	2		
DL-metionina	-	0,61		
Xilanase§	0,5	0,5		
Ácido cítrico	0,35	0,35		
BHT	0,15	0,15		
BHA	0,08	0,08		
Composição química analisada (% de matéria seca)				
	HD	HD+X	LD	LD+X
Matéria seca	94,59	95,08	95,24	94,71
Proteína bruta	30,95	30,19	22,62	22,80
Extrato etéreo em hidrólise ácida	15,31	15,36	8,67	8,67
Fibra bruta	1,57	1,63	3,67	3,59
Fibra em detergente neutro	18,44	18,00	20,48	20,31
Fibra em detergente ácido	2,62	2,58	4,37	4,46
Matéria mineral	8,03	8,33	7,5	7,70
Cálcio	1,77	1,96	1,59	1,48
Fósforo	1,01	1,07	0,98	0,935
Energia bruta (Kcal/kg)	5146,42	5146,68	4646,72	4646,82

†Enriquecimento por kg de produto: vitamina A (retinol) = 20.000 UI; vitamina D3 = 2000 UI; vitamina E (alfa-tocoferol α) = 48 mg; vitamina K3 = 48 mg; vitamina B1 = 4 mg; vitamina B2 = 32 mg; ácido pantotênico = 16 mg; niacina = 56 mg; colina = 800 mg; Como óxido de zinco Zn = 150 mg; Fe como sulfato ferroso = 100 mg; Cu como sulfato de cobre = 15 mg; I, tal como iodeto de potássio = 1,5 mg; Mn como óxido de manganês = 30 mg; Se como selenito de sódio = 0,2 mg; antioxidante = 240 mg.

§Em dietas com adição da enzima.

HD, alta densidade nutricional; HD+X, alta densidade nutricional com adição de xilanase; LD, baixa densidade nutricional; LD+X, baixa densidade nutricional com adição de xilanase; BHA, hidroxianisol butilado; BHT, hidroxitolueno butilado.

Antes do início do experimento as dietas foram analisadas para determinar as concentrações proteína bruta (PB, método 954.01) cinzas (método 942.05), fibra bruta (FB, método 962.10) e extrato etéreo em hidrólise ácida (EEA, método 954.02) de

acordo com Association of the Official Analytical Chemists (1995). A energia bruta (EB) foi estimada em bomba calorimétrica (Parr Instrument Co., Model 1261, Moline, IL, USA). A matéria seca original das fezes foi obtida por: $(MS55 \times MS105) / 100$.

Análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram feitas de acordo com Van Soest et al. (1991). Foram analisadas ainda as frações dos PNA solúveis e insolúveis presentes nas dietas (Tabela 2), de acordo com metodologia descrita por Englyst *et al.* (1982).

TABELA 2 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS (PNA) PRESENTES NAS DIETAS.

Item (%)	HD		HD+X		LD		LD+X	
	S	I	S	I	S	I	S	I
Ramnose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fucose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arabinose	0.2	0.9	0.3	0.9	0.2	2.1	0.2	2.0
Xilose	0.0	1.0	0.1	1.0	0.0	3.3	0.2	3.2
Manose	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
Galactose	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.5	0.2	0.5
Glucose	0.3	1.4	0.3	1.4	0.3	3.2	0.2	3.2
Ácido glicurônico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
Ácido galacturônico	0.4	0.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0
Total (g/100g)	1.1	3.8	1.4	3.6	0.8	9.3	1.3	9.1
SD	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1

S: solúvel; I: insolúvel; SD: desvio padrão; HD: alta densidade sem xilanase; HD+X: alta densidade com xilanase; LD: baixa densidade sem xilanase; LD+X: baixa densidade com xilanase

2.3 MICROBIOTA FECAL

As dietas foram ofertadas por 25 dias, seguindo o tempo de adaptação recomendado pela Association of American Feed Control Officials AAFCO (2006), e cinco dias de colheita total de fezes.

A preparação das amostras para avaliação da microbiota fecal foi realizada ao final de cada período experimental. A coleta foi realizada com fezes frescas, utilizando luva estéril e, posteriormente, 1 g de sub amostra por animal foi removida do interior do bolo fecal, 15 minutos após defecação, as quais foram armazenadas em ependorff estéril e armazenadas em um freezer a -80 °C até o momento da análise.

Foi empregado o kit comercial “ZR Fecal DNA MiniPrep®” da Zymo Research para extrair o DNA das amostras seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm. Para avaliar a integridade do DNA extraído, todas as amostras foram corridas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Foi amplificado um segmento de 250 bases da região hipervariável V4 do gene ribossomal 16S rRNA utilizando-se os primers universais 515F e 806R e as seguintes condições de PCR: 94°C por 3 min; 18 ciclos de 94°C por 45 seg, 50°C por 30 seg e 68°C por 60 seg; seguido de 72°C por 10 min. A partir destes amplificados foi construída a biblioteca metagenômica utilizando-se o kit comercial “Nextera DNA Library Preparation Kit” da Illumina®. Os amplificados foram reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador “MiSeq” da Illumina® (Degnan; Ochman, 2012).

As leituras ou “reads” obtidos no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), de acordo com Caporaso et al. (2011) seguindo-se um fluxo de trabalho desde a remoção de sequências de baixa qualidade, filtração, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gênero bacterianos através do reconhecimento de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), neste caso, a homologia entre as sequências quando comparadas contra uma base de dados. Para comparar as sequências foi utilizada a atualização do ano 2017 do banco de dados de sequências ribossomais SILVA database.

Para gerar a classificação das comunidades bacterianas por identificação de OTUs, foram utilizadas 84876 leituras por amostra, com a finalidade de normalizar os dados e não comparar amostras com diferentes números de leituras, evitando assim viés na taxonomia.

2.4. CITOMETRIA DE FLUXO

A coleta de sangue foi realizada ao final de cada período experimental, Anterior ao procedimento, os cães jejuaram de alimento durante 12 horas e por água 8 horas.. Quatro mililitros de sangue foram coletados da veia jugular e transferidos para um tubo contendo anticoagulante (EDTA) para avaliação da citometria de fluxo. As amostras

de sangue total foram tratadas segundo Beirão et al. (2012) Basicamente, 1000 µl de sangue total foi purificado em Histopaque para isolamento dos leucócitos.

As células foram permeabilizadas para permitir a marcação intracelular com FoxP3. Um milhão de células foram incubadas por 30 minutos (37°C) com os anticorpos específicos e fixados com paraformaldeído por 30 minutos a 4°C, posteriormente acondicionados em tubos de citometria em volume final de 2 mL de PBS. Para a análise de fagocitose, após a purificação celular, os leucócitos foram incubados com o reagente pHrodo por 30 minutos a 37°C antes de serem fixados. As amostras foram analisadas em citômetro FACSCalibur equipado com laser de argônio. Os linfócitos supressores foram identificados pela fluorescência em verde (células CD4+) e em amarelo (células FoxP3+). Os fagócitos foram separados quanto à granulosidade celular (SSC) em monócitos ou granulócitos. A porcentagem de células fagocíticas foi avaliada na cor verde; e a intensidade da fagocitose foi medida como a média da intensidade da fluorescência.

2.5. PARÂMETROS REDOX

Durante a coleta do plasma para esta metodologia, existe a necessidade de uma etapa de preservação dos tióis livres (tubo 01), uma etapa de precipitação de proteínas por acidificação (tubo 02) e uma etapa de derivatização da amostra com cloreto de dansila. Foi coletado um volume pouco maior que 1,5 mL de sangue e homogeneizado lentamente, evitando a hemólise

Após a coleta, 1,5 mL de sangue foi transferido para o tubo 01 (contendo 150µL de tampão Borato 0,5 M contendo 10 mM L-Serina, 1,12 mM Ácido bathophenanthroline disulfônico (BPDS) e 3,2 mM Ácido Iodoacético). A transferência do sangue da seringa para o tubo 01 deve ser feita em menos de dois minutos. Após a transferência, o tubo 01 é invertido gentilmente duas vezes para misturar a solução de preservação ao sangue. A amostra foi centrifugada por 60 segundos a 8000 rpm. Do sobrenadante, 200 µL foram transferidos para o tubo 02 (contendo 200 µl de solução de Ácido perclórico 10% + 0,2 M Ácido Bórico) em, no máximo, 2 minutos após a coleta. O tubo foi invertido gentilmente e as amostras foram armazenadas em gelo seco (-80°C).

Um dia antes das análises, as amostras foram descongeladas, foi adicionado o padrão interno γ -glutamil-glutamato ou (γ EE) para concentração final de 8,25 μ M e o pH foi corrigido para 9,0 ($\pm 0,2$) com o KOH/tetrahidroborato saturado. Após a verificação do pH, as amostras ficaram na bancada (TA) por vinte minutos. Foram adicionados 300 μ L da solução de Cloreto de Dansila (20 mg/mL). As amostras foram então incubadas a 25°C por 20h. Após 20h foram adicionados 500 μ L de clorofórmio e as amostras foram mantidas a 4°C até análise por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). Para avaliação do estado redox em cães, foi calculado o potencial de redução do par Cisteína/Cistina (CyS/CySS), através da aplicação da equação de Nernst. Para tanto, se fez necessário determinar as concentrações plasmáticas exatas de CyS e CySS, pela técnica de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC, do Inglês High performance liquid chromatography), utilizando método de derivatização e detector de fluorescência, pelo protocolo adaptado (JONES; LIANG, 2009). Para este método, foi utilizado em gradiente entre dois solventes, A e B. O solvente A consiste em uma solução de 80% Metanol em água ultrapura e o tampão B é uma mistura de 640 mL de metanol com 200 mL do tampão Acetato estoque (272 g de Acetato de sódio triidratado em 378 mL de Ácido acético Glacial), 125 mL de ácido acético glacial e 50 mL de água ultrapura. O equipamento utilizado foi um HPLC da Shimadzu Prominence (Tokyo, Japão) equipado com um injetor automático, uma bomba de dois pistões (LC-20AD) controlada pelo software LC Solution, equipado com detector de fluorescência Shimadzu RF-20A. Foi utilizada excitação em 335 nm e emissão detectada em 518 nm. A separação dos analitos foi realizada em uma coluna 25 cm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m sílica, LC-NH₂ Supelco (Sigma Aldrich).

As amostras derivatizadas foram centrifugadas e 50 μ L foram injetados para a quantificação de CyS e CySS, e μ EE no plasma. O fluxo do sistema de cromatografia se manteve fixo em 01 mL/min. A quantificação dos analitos foi realizada através de uma curva padrão, com 70,30,10 e 5 μ M de cada analito, processada pelo mesmo protocolo descrito acima.

2.6. CÁLCULOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise dos dados de microbiota, a tabela de gêneros bacterianos obtida no QIIME foi transferida ao programa estatístico de metagenômica STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles (Parks et al., 2014). As médias referentes à biodiversidade foram comparadas através do número de unidades taxonômicas operacionais observadas (OTUs), ao índice de Chao1 e índice de Shannon pelo teste de Kruskal Wallis ($P < 0.05$), pois apresentou distribuição não paramétrica pelo teste de Shapiro Wilk.

Os parâmetros de alfa diversidade foram avaliados pelo teste de Chao1 e Shannon, utilizando QIIME2 v.2021.2, enquanto a beta diversidade (PcOA), utilizando distância de Bray-Curtis, foi analisada pelo software Past 4.03. A análise de similaridade (ANOSIM) foi utilizada com o intuito de avaliar a similaridade entre as comunidades bacterianas encontradas nos diferentes tratamentos.

Para determinar a diferença estatística dos filos e gêneros bacterianos encontrados entre os tratamentos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) e posteriormente o teste Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. para análise de médias.

O potencial de redução do par cisteína/cistina de cada indivíduo foi calculado através da equação de Nernst, utilizando um potencial padrão de redução (E_0) de -250 mV, para pH 7,4 (Blanco *et al.*, 2007) e as concentrações plasmáticas de cisteína e cistina, em mols por litro, obtidas de cada animal:

$$E_h = E_0 + (RT/nF) \ln [cistina]/[cisteína]^2$$

Onde: $E_0 = -250$ mV; $R = 8,314$ J/mol. K; $T = 309$ K; $n = 2$ e $F = 96,406$ J/V

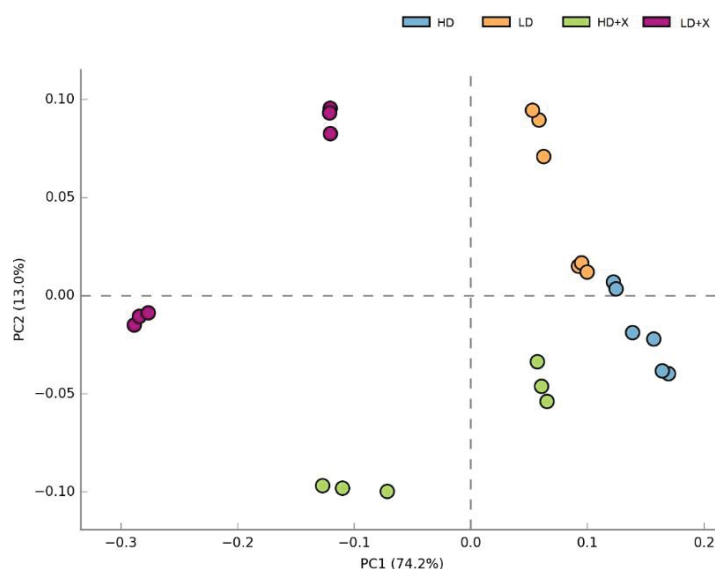
Os dados de citometria de fluxo (Tabela 4) foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS (versão 8, SAS Institute Inc., Cary, NC, United States of America), incluindo os efeitos das densidades das dietas e o uso das enzimas. A interação foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para comparar os pares de grupos entre si, foi realizado teste t de Student (Figura 6) Para o teste estatístico e formulação das figuras foi utilizado o software GraphPad Prism 6.

3. RESULTADOS

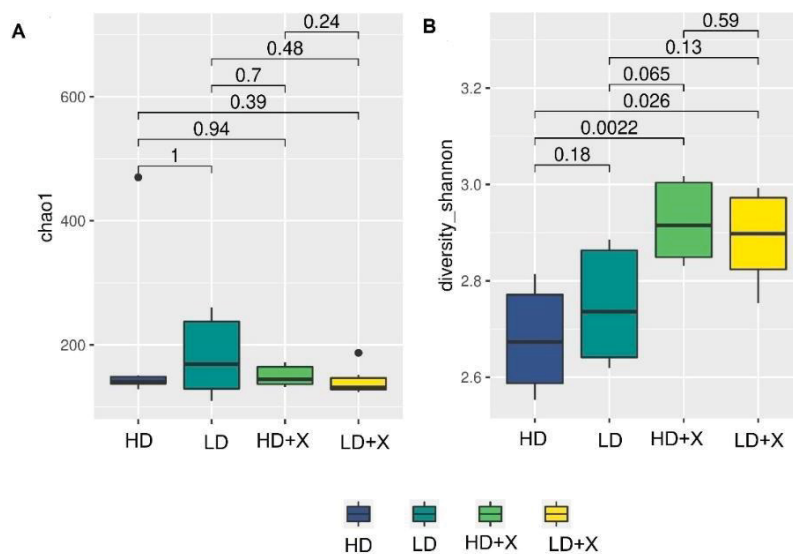
À avaliação da beta diversidade via análise de componentes principais (PcA), foram encontradas diferente composição das comunidades bacterianas em cada tratamento ($P < 0,05$) (Figura 5).

FIGURA 5 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCOA) DA COMUNIDADE BACTERIANA EM FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL, COM OU SEM XILANASE.



Ao índice de Shannon, a enzima xilanase mostrou-se capaz de promover aumento da diversidade da microbiota na dieta HD ($P=0,002$) ao contrário do ocorrido na ração de baixa densidade. Entretanto, a microbiota encontrada em cães alimentados com dieta LD + X foi superior à encontrada no tratamento HD (Figura 5).

FIGURA 5 - INDICADORES DE BIODIVERSIDADE DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM CADA TRATAMENTO.



FONTE: A autora (2022)

A. Índice Chao1 (riqueza). B. Índice de Shannon (diversidade). Relações significativas são apresentadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

As dietas experimentais encontraram os filos Bacteroides e Firmicutes em maior concentração nas fezes dos cães avaliados, independente do tratamento. Entretanto, nenhum dos encontrados foram significativamente abundantes e relevantes nos tratamentos ($P>0,05$; Tabela 4).

TABELA 3 - FREQUÊNCIA DOS FILOS BACTERIANOS ENCONTRADOS NAS FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL COM OU SEM XILANASE.

Filos (%)	Dietas experimentais				P-valor
	HD	HD+X	LD	LD+X	
Actinobacteria	2.0 (1.3-2.5)	2.0 (1.4-3.7)	2.16 (1.4-3.7)	1.74 (1.2-3.8)	0,918
Bacteroides	15.9 (8.8-24.5)	13.7 (9.2-18.8)	9.5 (7.9-11.9)	16.0 (8.1-23.1)	0,425
Firmicutes	77.6 (64.9-79.6)	76.2 (69.1-80.7)	78.7 (67.9-83.3)	74.7 (65.9-81.5)	0,817
Fusobacteria	2.9 (2.4-8.0)	5.5 (2.8-8.1)	7.5 (5.3-10.2)	6.7 (5.9-8.2)	0,091
Proteobacteria	1.8 (1.1-2.3)	1.8 (0.8-2.6)	1.1 (0.6-2.4)	1.5 (0.9-2.6)	0,439

FONTE: A autora (2022).

Dados analisados pelo teste de Kruskal Wallis considerando $P < 0,05$

LD, alta densidade nutricional; HD+X, alta densidade nutricional com adição de xilanase; LD, baixa densidade nutricional; LD+X, baixa densidade nutricional com adição de xilanase;

Em contrapartida, 133 gêneros bacterianos foram identificados no total. Destes, os mais relevantes foram agrupados na Tabela 5. Com destaque aos gêneros *Faecalibaculum spp.*, *Holdemonella spp.*, *Blautia spp.*, *Peptoclostridium spp.*, *Peptococcus spp.* e *Ruminococcaceae spp.*, que apresentaram $P < 0,05$. Os gêneros *Clostridium*, *Escherichia* e *Streptococcus* não foram encontrados em concentração significativa ($P > 0,05$) em nenhum tratamento.

A comunidade bacteriana pertencente ao gênero *Blautia spp.*, foi responsiva ao acréscimo da enzima no tratamento LD+X, sendo sua concentração superior à HD e HD+X. O gênero *Faecalibaculum spp.* apresentou decréscimo de OTUs no tratamento LD+X (0%), diferindo ($P < 0,05$) dos outros, HD (22.4%), HD+X (15.9%) e LD (9.7%). A população pertencente ao gênero *Peptoclostridium spp.* foi encontrada em maior concentração nas dietas de baixa densidade nutricional, superior às amostras dos tratamentos HD e HD+X ($P < 0,05$). As populações de *Peptococcus spp.* e *Ruminococcaceae spp.* foram equivalentes entre as dietas HD e LD+X, demonstrando o potencial da enzima nestes gêneros em dietas com baixa densidade nutricional.

TABELA 4 - MEDIANAS DA ABUNDÂNCIA RELATIVA (%) DOS PRINCIPAIS GÊNEROS BACTERIANOS ENCONTRADOS NAS FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL, COM OU SEM XILANASE.

Gêneros (%)	Dietas experimentais				P-valor
	HD	HD+X	LD	LD+X	
<i>Allobaculum</i>	0.8 (0.8-2.8)	1.4 (0.9-1.8)	1.5 (1.3-1.7)	1.5 (1.1-2.2)	0.100
<i>Bacteroides</i>	3.9 (2.9-11.5)	4.2 (3.6-4.9)	4.2 (3.2-4.9)	5.0 (3.2-4.9)	0.252
<i>Blautia</i>	5.8 ^b (5.1-12.2)	6.6 ^b (5.0-10.5)	9.0 ^{ab} (6.7-12.5)	12.7 ^a (10.9-14.2)	0.011
<i>Clostridium</i>	1.8 (0.5-4.7)	2.7 (0.9-3.5)	2.9 (1.6-3.9)	3.5 (0.4-4.4)	0.771
<i>Faecalibacterium</i>	2.6 (1.5-6.4)	2.8 (1.5-4.6)	2.8 (1.9-4.7)	3.2 (1.7-6.2)	0.892
<i>Faecalibaculum</i>	22.4 ^a (0-38.2)	15.9 ^a (5.3-37.2)	9.7 ^a (5.5-25.2)	0.0 ^b (0-5.8)	0.040
<i>Fusobacterium</i>	5.8 (2.4-6.9)	5.5 (2.8-9.6)	6.8 (5.3-10.2)	5.6 (5.9-8.2)	0.091
<i>Holdemanella</i>	1.3 ^b (0.9-2.3)	1.3 ^b (0.4-1.6)	1.1 ^b (0.3-1.6)	2.0 ^a (1.9-2.3)	0.013
<i>Peptoclostridium</i>	16.5 ^b (11.2-28.8)	21.0 ^{ab} (12.2-30.4)	25.7 ^a (20.8-31.2)	25.0 ^a (19.5-32.2)	0.013
<i>Peptococcus</i>	0.6 ^{ab} (0.5-1.3)	0.6 ^b (0.4-0.8)	0.5 ^b (0.3-0.8)	1.0 ^a (0.7-1.2)	0.037
<i>Prevotellaceae</i>	1.0 (0.8-1.7)	1.2 (0.6-2.1)	1.4 (0.7-2.9)	1.6 (0.7-2)	0.931
<i>Ruminococcaceae</i>	0.7 ^a (0.4-1.2)	0.3 ^{ab} (0.1-0.8)	0.1 ^b (0.1-0.2)	0.5 ^a (0.1-1.2)	0.014
<i>Ruminococcus</i>	1.8 (1.5-4.4)	2.9 (1.3-3.6)	4.0 (2.5-4.5)	3.8 (2.7-4.9)	0.071
<i>Turicibacter</i>	5.2 (2.3-15.8)	8.1 (2.0-15.1)	5.5 (2.1-11.6)	5.4 (2.2-12.2)	0.898

FONTE: A autora (2022)

Dados analisados pelo teste de Kruskal Wallis e teste de Dunn considerando $P < 0,05$.

HD, alta densidade nutricional; HD+X, alta densidade nutricional com adição de xilanase; LD, baixa densidade nutricional; LD+X, baixa densidade nutricional com adição de xilanase;

Não houve diferenças em relação à quantidade de células fagocíticas circulantes ($P > 0,05$) dos animais alimentados com as diferentes dietas experimentais, com ou sem enzima. Em adição, a atividade fagocítica não foi alterada ($P > 0,05$; Tabela 6). Resultado semelhante foi observado quando avaliada a porcentagem de linfócitos T CD4 circulantes e supressores ($P > 0,05$).

TABELA 5 - MÉDIAS DE PORCENTAGEM DA AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL, COM OU SEM XILANASE.

Item (%)	Dieta	Com	Sem	Média	EPM	P-valor		
						Dieta (A)	Enzima (B)	A*B
Monócitos fagocíticos	HD	23,84	19,81	21,82	2,916	0,898	0,919	0,217
	LD	19,74	23,16	21,45				
	Média	21,79	21,49					
Intensidade de fagocitose	HD	13,33	13,18	13,26	0,253	0,945	0,328	0,625
	LD	13,46	13,56	13,51				
	Média	13,37	13,39					
Neutrófilos fagocíticos	HD	14,57	17,50	16,03	2,458	0,264	0,519	0,600
	LD	18,71	19,02	18,86				
	Média	16,64	18,26					
Intensidade de fagocitose	HD	11,57	11,45	11,51	0,277	0,570	0,844	0,807
	LD	11,34	11,36	11,53				
	Média	11,40	11,46					
Linfócitos T auxiliares CD4+	HD	21,30	23,56	22,43	0,610	0,948	0,577	0,231
	LD	22,93	22,10	22,51				
	Média	22,12	22,83					
Linfócitos T auxiliares supressores (CD4+FoxP3+)	HD	1,52	1,62	1,57	0,134	0,227	0,564	0,802
	LD	1,34	1,11	1,23				
	Média	1,48	1,32					

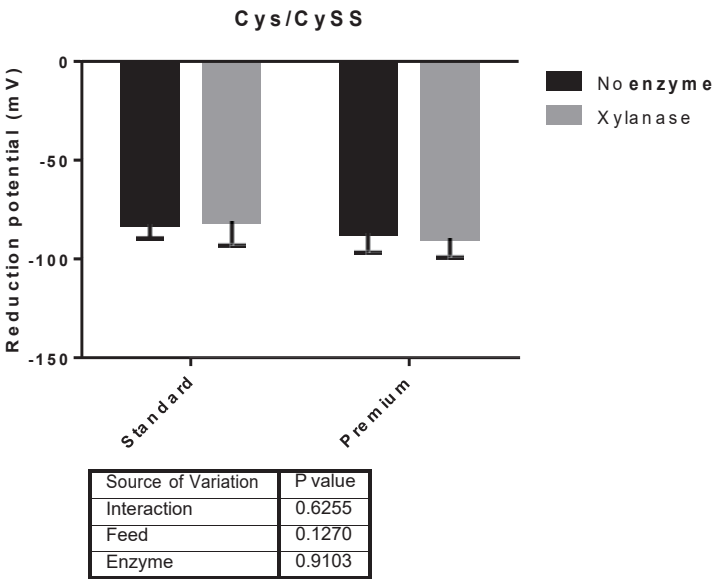
FONTE: A autora (2022).

Médias avaliadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

HD, alta densidade nutricional; HD+X, alta densidade nutricional com adição de xilanase; LD, baixa densidade nutricional; LD+X, baixa densidade nutricional com adição de xilanase; EPM: Erro padrão da média.

Adicionalmente, não houve evidência de diferença significativa entre as dietas quanto ao potencial de redução (EhCySS) (Figura 6)

FIGURA 6. POTENCIAL DE REDUÇÃO DO PAR CYS/CYSS EM AMOSTRAS DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS DE ALTA E BAIXA DENSIDADE NUTRICIONAL, COM OU SEM XILANASE.



FONTE: A autora (2022).

4. DISCUSSÃO

A enzima xilanase mostrou-se capaz de influenciar positivamente na modulação da microbiota e do sistema imune de frangos de corte (CRAIG *et al.*, 2020; VAN HOECK *et al.*, 2021), entretanto, até o conhecimento da autora, não há estudos prévios que avaliem a interferência da enzima na microbiota e imunidade na espécie canina, sendo este o primeiro trabalho a descrever os efeitos.

À análise dos resultados de beta diversidade (PcA) se encontrou expressiva dissimilaridade ($P > 0,05$) na composição bacteriana de cada tratamento. À análise da alfa diversidade pelo índice de Chao1, o qual avalia o número de táxons ou, riqueza da microbiota dentro de uma amostra, não houve diferença entre os tratamentos. Entretanto, pelo índice de Shannon, o acréscimo da enzima xilanase foi capaz de promover aumento da diversidade da microbiota fecal independente da dieta, HD (*premium*) ou LD (*standart*) ($P < 0,05$). Resultado este, contrário ao encontrado no trabalho de Singh *et al.* (2022) o qual avaliou o efeito da enzima (Econase-XT 0,1g/kg) em frangos que consumiram dieta a base de milho e soja, com três proporções de farelo de trigo. Os autores observaram que a microbiota cecal de animais que consumiram dietas mais fibrosas, tiveram resultados significativos na beta diversidade, em comparação aos animais que não consumiram farelo de trigo.

O mesmo resultado de Singh *et al.* (2022) era esperado. Dado que a dieta mais fibrosa (LD) possuía maior quantidade de substrato passível de ação da enzima, suficiente para promover a fermentação bacteriana, estímulo de crescimento e colonização de diferentes microorganismos locais através da produção de AGCC (MARKOWIAK *et al.*, 2018; CRAIG *et al.*, 2020). Contudo, à análise da fração de PNA's presente nas dietas, foi observado que a fração de fibras solúvel foi semelhante em ambas as dietas ofertadas, alta e baixa densidade nutricional, enquanto as fibras insolúveis foram preponderantes na dieta de baixa densidade, independente do acréscimo da xilanase. Assim, é possível concluir que, uma vez que a fração de fibra insolúvel era maior na dieta LD e estas são amplamente conhecidas pela sua baixa capacidade fermentativa (REF), elas não foram capazes de estimular maior proliferação e diversidade de bactérias em comparação à dieta de alta densidade.

Entretanto, a adição de xilanase foi capaz de melhorar a disponibilidade de xilo-oligossacarídeos (XOS) em ambas as dietas, através da ação da enzima sobre as

arabinosilanas. Os XOS já tiveram eficácia comprovada como prebióticos em humanos (SINGH *et al.*, 2015) e frangos de corte (CRAIG *et al.*, 2020) através de seu potencial fermentativo, além de agirem como moduladores da funcionalidade intestinal através da regulação de mediadores inflamatórios (CHEN *et al.*, 2021). Assim, pode-se concluir que a xilanase foi eficiente em promover a diversidade bacteriana, mesmo em dietas com alta concentração de fatores antiqualitativos como neste caso o alimento LD. Este resultado é importante para o segmento *standart* do mercado *pet food*, pois evidencia que com o acréscimo da enzima este alimento pode influenciar positivamente na diversidade da microbiota intestinal de cães, tanto quanto um alimento de alta densidade nutricional como o segmento *premium*, e com menor valor agregado.

De forma geral, o aumento da diversidade das bactérias não interferiu nos filos. Os filos encontrados no presente estudo: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria são previamente conhecidos como integrantes da microbiota intestinal de cães (SCHMIDT *et al.*, 2018; KUBINYI *et al.*, 2020; PEREIRA; CLEMENTE, 2021), entretanto, nenhum foi significativamente ($P > 0,05$) abundante dentre os tratamentos deste estudo. Estudos prévios em frangos de corte observaram maior concentração do gênero Firmicutes e Bacteroidetes em animais que consumiram dietas acrescidas de xilanase (0,1g/kg Econase-XT), ao contrário do aqui encontrado, entretanto, diferenças dietéticas e fisiológicas devem ser consideradas nesta comparação (SINGH *et al.*, 2021).

À avaliação da frequência dos principais gêneros bacterianos, encontramos *Holdemanella*, *Faecalibaculum*, *Blautia*, *Peptococcus*, *Ruminococcaceae* e *Peptoclostridium* com população significativa ($P < 0,05$), corroborando com resultados previamente publicados a respeito de microbiota intestinal canina (SCHMIDT *et al.*, 2018; KUBINYI *et al.*, 2020; PEREIRA; CLEMENTE, 2021; YOU; KIM, 2021).

Dentre todos os gêneros citados, apenas *Faecalibaculum* é considerado incomum no TGI de cães (LIM *et al.*, 2016; PILLA; SUCHODOLSKI, 2021) e foi o único que teve sua população drasticamente reduzida no tratamento LD+X não condizendo com estudos prévios (LIM *et al.*, 2016).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Holdemanella* spp. foram encontradas em maior concentração na dieta LD+X. Em cães, o aumento da proliferação de *Holdmanella* spp. mostrou ser inversamente proporcional à concentração de

isobutirato (CHING YEN *et al.*,2022), corroborando aos achados no estudo paralelo à este (CARNEIRO, 2018) em que o AGCC isobutirato foi menos predominante nas dietas LD+X. Em ratos e humanos, esta bactéria já foi associada a produção de ácido graxos de cadeia longa (AGCL), o qual provou ter efeito anti-inflamatório no TGI nestas espécies (PUJO *et al.*,2020). Ao correlacionar os achados, podemos pressupor que a adição da enzima em dietas fibrosas foi favorável à multiplicação de *Holdemanella spp.* e sua alta concentração é propícia a modulação da funcionalidade intestinal em cães.

Já o gênero *Peptococcus* apresentou maiores concentrações nos tratamentos LD+X em comparação à LD. Em cães não há estudos comparando a concentração de bactérias desse gênero com xilanase e concentração de fibras no alimento. Em gatos, foram comparadas duas dietas, uma com 1,6g/100g de fibra dietética total, sendo 0,7g de fibra solúvel e 0,9g de fibra insolúvel, enquanto a dieta teste apresentava 3,2g/100g de fibra dietética total (0,3g de fibra solúvel / 2,9g de fibra insolúvel) (WERNIMONT *et al.*,2020). Neste estudo, a concentração de *Peptococcus spp.* foi maior na dieta com menor concentração de fibra total, ao contrário do encontrado neste trabalho. Os resultados discrepantes podem ser decorrente da diferença de concentração de fibra solúvel : insolúvel entre as dietas dos estudos.

Em estudos prévios, os microorganismos do gênero *Blautia spp.* e *Peptoclostridium spp.* já provaram ser positivamente correlacionados com butirato e inversamente ao acetato (SANDRI *et al.*,2017; NYBROE *et al.*,2023), assim como a presença destes gêneros está relacionada à menor inflamação do trato gastrointestinal em cães (BRITO *et al.*, 2021; MINAMOTO *et al.*, 2015). Neste estudo, a maior concentração de *Blautia spp.* foi encontrada em dietas LD, especialmente em LD+X. No estudo paralelo a este (CARNEIRO, 2018), não houve diferença na concentração de butirato e acetato entre os tratamentos. Entretanto, em trabalho realizado em gatos (WERNIMONT *et al.*,2019) a *Blautia spp.* e *Peptoclostridium spp.* foram prevalentes em fezes de animais que consumiram dietas mais fibrosas, condizendo com os resultados aqui achados.

Os gêneros *Blautia spp.*, *Peptococcus spp.*, e *Holdemanella spp.* foram mais prevalentes em dietas LD acrescidas de xilanase. Resultado este possivelmente pelo fato destas dietas possuírem maior porcentagem de fibras e PNAs em relação à dieta HD, os quais são substratos para ação da enzima. O efeito da xilanase em promover

lise dos PNAs disponibilizou maior concentração de xilo-oligossacarídeos no ambiente TGI, os quais já foram comprovadamente benéficos para modulação da funcionalidade intestinal (CRAIG *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021), através de sua potencial ação prebiótica, favorecendo a multiplicação destas bactérias e, assim, a eubiose intestinal.

Em contrapartida, o gênero *Ruminococacceae*, o qual também é capaz de produzir butirato como produto fermentativo (PILLA *et al.*, 2020) teve sua concentração superior nos tratamentos HD e LD+X, ao contrário do resultado da dieta LD, acredita-se que esta, sem o efeito da enzima, não foi capaz de disponibilizar adequada quantidade de xilose para desencadear a fermentação.

A alta concentração de bactérias produtoras de AGCC neste estudo, é condizente com a falta de amostragem de bactérias potencialmente patogênicas, como *Escheria coli*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus spp.* e *Costridium spp.* Foi sugerido que a diminuição no pH intestinal ocasionado por AGCC é capaz de controlar o crescimento destes gêneros e modular a microbiota local a uma condição de eubiose (GIBSON *et al.*, 2010; TRAMONTANO *et al.*, 2018).

A eubiose intestinal dos cães avaliados, foi capaz de manter a homeostase imunológica local. Fato este comprovado pelos níveis dos parâmetros de imunidade e potencial redução (EhCySS) analisados, os quais não obtiveram valores significativos. Levando em consideração que doenças crônicas gastrointestinais (TIAN *et al.*, 2017; CANDELLONE *et al.*, 2022) e, disbiose (TOMASELLO *et al.*, 2016) geram tanto radicais livres quanto citocinas inflamatórias, e ambos são capazes de estimular o sistema imune, é possível afirmar que os animais testados não se encontravam em situação de estresse oxidativo. Uma vez que os animais não possuíam comorbidades e não enfrentavam desafio biológico ambiental significativo, a resposta imune e potencial redox não foram estimulados.

5. CONCLUSÃO

A adição de xilanase foi capaz estimular a diversidade de bactérias intestinais, independente da composição dietética, sendo assim comprovado que sua adição ao alimento é capaz de melhorar o equilíbrio intestinal e favorecer dietas com baixa densidade nutricional. O baixo estímulo da resposta imune e potencial redox pode ter sido resultado de um ambiente com menores desafios biológicos e da modulação gerada pelas bactérias encontradas em maior preponderância.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC. Official and tentative methods of analysis, 16.ed., Washington, DC, USA, 1995.
- BAUTIL, A.; VERSPREET, J.; BUYSE, J.; *et al.* Age-related arabinoxylan hydrolysis and fermentation in the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4606–4621, 2019.
- BEDFORD, M. R. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. **British Poultry Science**, v. 59, n. 5, p. 486–493, 2018.
- BEDFORD, M. R.; COWIESON, A. J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 76–85, 2012.
- BEIRÃO, B. C. B., C. FÁVARO JR, L. S. NAKAO, L. F. CARON, S. M. ZANATA, AND A. F. MERCADANTE. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v. 145, p. 32–41, 2012
- BRADY, C. A.; HUGHES, D.; DROBATZ, K. J. Association of hyponatremia and hyperglycemia with outcome in dogs with congestive heart failure. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 14, n. 3, p. 177–182, 2004.
- BRITO, M.S., *et al.* Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de Monogástricos – revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.4, p.111-117, 2008.
- BRITO, C., *et al.* Effect of dietary inclusion of dried apple pomace on faecal butyrate concentration and modulation of gut microbiota in dogs. **Archives of animal nutrition**, v. 75, n.1, p. 48-63, 2021
- CANDELLONE, A.; GIROLAMI, F.; BADINO, P.; JARRIYAWATTANACHAIKUL, W.; ODORE, R. Changes in the Oxidative Stress Status of Dogs Affected by Acute Enteropathies. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 6, 2022.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4516–4522, 2011.
- CARNEIRO, N. O. Efeito da adição de xilanase em dietas com diferentes densidades nutricionais em cães, Universidade Federal do Paraná, 2018.
- CHEN, Y.; XIE, Y.; AJUWON, K. M.; *et al.* Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: A Review. **Frontiers in Nutrition**, 8. set. 2021.
- CHOCT, M.; DERSJANT-LI, Y.; MCLEISH, J.; PEISKER, M. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: A review of digestion, nutritive and anti-nutritive

effects in pigs and poultry. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1386–1398, 2010.

CHUNG, Y. C.; HSU, C. K.; KO, C. Y.; CHAN, Y. C. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. **Nutrition Research**, v. 27, n. 12, p. 756–761, 2007.

CHING-YEN, L., et al. Longitudinal fecal microbiome and metabolite data demonstrate rapid shifts and subsequent stabilization after an abrupt dietary change in healthy adult dogs. **Animal microbiome**, v.4, n. 46, p. 1-21, 2022.

CRAIG, A. D.; KHATTAK, F.; HASTIE, P.; BEDFORD, M. R.; OLUKOSI, O. A. Xylanase and xylo- oligosaccharide prebiotic improve the growth performance and concentration of potentially prebiotic oligosaccharides in the ileum of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 61, n. 1, p. 70–78, 2020.

DEGNAN, P. H., and H. Ochman. Illumina-based analysis of microbial community diversity, **ISME J**, v. 6, p. 183–194, 2012.

ENGLYST, H.; WIGGINS, H.S.; CUMMINGS, J.H. Determination of the nonstarch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v. 107, p. 307-318, 1982.

FEDIAF, Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, 2021

GIBSON, G. R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; *et al.* Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

JONES, D.; LIANG, Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1329–1338, 2009

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **ANTIOXIDANTE & REDOX SIGNALING**, v. 8, n. 9 & 10, 2006.

KUBINYI, E.; RHALI S.F., SANDOR, S. *et al.* Gut Microbiome Composition is Associated with Age and Memory Performance in Pet Dogs, **Animals**, n.10, p.1-10, 2020.

LAFLAMME D.P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Pract**, v. 22, p.10–15, 1997.

LIM, S.; CHANG, D. H.; AHN, S.; KIM, B. C. Whole genome sequencing of “*Faecalibaculum rodentium*” ALO17, isolated from C57BL/6J laboratory mouse feces. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 3–9, 2016.

MARKOWIAK, P., SLIZEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. **Gut pathogens**, v. 10, p. 10-21, 2018.

MENG, X. and B.A. SLOMINSKI. Nutritive Values of Corn, Soybean Meal, Canola Meal and Peas for Broiler Chickens as Affected by a Multicarbohydrase Preparation of Cell Wall Degrading Enzymes”. **Poultry Science**, v. 84, p.1242-1251, 2005

MINAMOTO, Y.; OTONI, C. C.; STEELMAN, S. M.; *et al.* Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 6, n. 1, p. 33–47, 2015.

NRC - National Research Council. 2006. In: **Nutrient Requirements of Dogs**. National Academy Press. Washington, p.428.

NYBROE, S., *et al.* Alterations in Healthy Adult Canine Faecal Microbiome and Selected Metabolites as a Result of Feeding a Commercial Complete Synbiotic Diet with *Enterococcus faecium* NCIMB 10415. **Animals**, v. 13, n. 144, p.1-22, 2023.

PARKS, D.; TYSON, G. W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v.30, n.21, p.3123-3124, 2014.

PEREIRA, A. M.; CLEMENTE, A. Dogs' Microbiome From Tip to Toe. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.45, p.1-13, 2021.

PILLA, R.; GASCHEN, F. P.; BARR, J. W.; *et al.* Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 5, p. 1853–1866, 2020.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet, **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.51, n.3, p. 605-621, 2021.

PUJO, J., *et al.* Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits antiinflammatory properties in colitis. **Neurogastroenterology**, v.0, p. 1-10, 2020

RATAJCZAK, W.; RYŁ, A.; MIZERSKI, A.; *et al.* Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived shortchain fatty acids (SCFAs). **Acta Biochimica Polonica**, v.66, n.1, p.1-12, 2019.

RISOLIA, L. W.; SABCHUK, T. T.; MURAKAMI, F. Y.; *et al.* Effects of adding dried distillers grains with solubles (DDGS) to dog diets supplemented with xylanase and protease. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, 2019.

SANDRI, M.; DAL MONEGO, S.; CONTE, G.; SGORLON, S.; STEFANON, B. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, 2017.

SCHMIDT, M.; UNTERER, S.; SUCHODOLSKI, J. S.; *et al.* The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 2018.

SINGH, R. P. *et al.* Biochemical Basis of Xylooligosaccharide Utilisation by Gut Bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.6, p.2-21, 2022.

VAN HOECK, V.; SOMERS, I.; ABDELQADER, A.; *et al.* Xylanase impact beyond performance: A microbiome approach in laying hens. **PLoS ONE**, v. 16, n. 9, p. 1–18, 2021.

VAN SOEST, P.J. ; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **J Dairy Sci**, v.74, p.3583-3597, 1991.

TIAN, T., WANG, Z., ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, sem numeração, 2017.

TORTOLA, L.; SOUZA, N. G.; ZAINÉ, L.; *et al.* Enzyme effects on extruded diets for dogs with soybean meal as a substitute for poultry by-product meal. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. SUPPL.1, p. 39–50, 2013.

TOMASELLO, G.*et al.* Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 160, n.4, p. 461-466, 2016

TRAMONTANO, M.; ANDREJEV, S.; PRUTEANU, M.; *et al.* Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 514–522, 2018.

WERNIMONT, S., *et al.* Specialized Dietary Fibers Alter Microbiome Composition & Promote Fermentative Metabolism in the Lower Gastrointestinal Tract of Healthy Adult Cats (P20-045-19). **Curvv Dev Nut**,v. 3, n.1, s/paginação, 2019.

YIN, J., *et al.* Dietary xylo-oligosaccharide improves intestinal function in weaned piglets. **Food & function**, 2019.

YOU, I. W.; KIM, M. J. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: Breed, age, and body condition score. **Animals**, v. 11, n. 8, 2021.

REFERÊNCIAS

- ABAZARI, A.; NAVIDSHAD, B.; AGHJEHGESHLAGH, M. **The effect of rice husk as an insoluble dietary fiber source on intestinal morphology and Lactobacilli and Escherichia coli populations in broilers.** v.10, n.3, p.217-224, 2016.
- ABINPET, **Manual PetFood Brasil** – Referência em qualidade e segurança dos alimentos. 10º Edição, 2019.
- AI, Y.; JANE, J. L. Macronutrients in Corn and Human Nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 581–598, 2016.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC. Official and tentative methods of analysis, 16.ed., Washington, DC, USA, 1995.
- AL-SULTAN, S; ABDEL-RAHEEM, S.M; GHAREEB, W.R. Comparative effects of using prebiotic, probiotic, synbiotic and acidifier on growth performance, intestinal microbiology and histomorphology of broiler chicks. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 2, p. 187-195, 2016.
- ALVARENGA, I.; DANTON, A. N.; ALDRICH, C. G. A review: nutrition and process attributes of corn in pet foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.
- BAUTIL, A.; VERSPREET, J.; BUYSE, J.; *et al.* Age-related arabinoxylan hydrolysis and fermentation in the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4606–4621, 2019.
- BEDFORD, M. R. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. **British Poultry Science**, v. 59, n. 5, p. 486–493, 2018.
- BEDFORD, M. R.; COWIESON, A. J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 76–85, 2012.
- BEIRÃO, B. C. B., C. FÁVARO JR, L. S. NAKAO, L. F. CARON, S. M. ZANATA, AND A. F. MERCADANTE. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v. 145, p. 32–41, 2012.
- BRADY, C. A.; HUGHES, D.; DROBATZ, K. J. Association of hyponatremia and hyperglycemia with outcome in dogs with congestive heart failure. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 14, n. 3, p. 177–182, 2004.
- BRESCIANI, F.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOLSKI, J. S.; *et al.* Effect of an extruded animal protein-free diet on fecal microbiota of dogs with food-responsive enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1903–1910, 2018.
- BRITO, M.S., *et al.* Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de Monogástricos – revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.4, p.111-117, 2008.

BRITO, C., et al. Effect of dietary inclusion of dried apple pomace on faecal butyrate concentration and modulation of gut microbiota in dogs. **Archives of animal nutrition**, v. 75, n.1, p. 48-63, 2021

BUENO, A. R.; CAPPEL, T. G.; SUMOLD, G. D.; *et al.* Feline colonic microbes and fatty acid transport: effects of feeding cellulose, beet pulp and pectin/gum arabic fibers. **Nutrition Research**, v.20, n.9, p 1319-1328, 2000.

CANDELLONE, A.; GIROLAMI, F.; BADINO, P.; JARRIYAWATTANACHAIKUL, W.; ODORE, R. Changes in the Oxidative Stress Status of Dogs Affected by Acute Enteropathies. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 6, 2022.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4516–4522, 2011.

CARNEIRO, N. O. Efeito da adição de xilanase em dietas com diferentes densidades nutricionais em cães, Universidade Federal do Paraná, 2018.

CHEN, Y.; XIE, Y.; AJUWON, K. M.; *et al.* Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: A Review. **Frontiers in Nutrition**, 8. set. 2021.

CHOCT, M.; DERSJANT-LI, Y.; MCLEISH, J.; PEISKER, M. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: A review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1386–1398, 2010.

CHONG, W. C.; SHASTRI, M. D.; ERI, R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 777, p. 1-19, 2017.

CHUNG, Y. C.; HSU, C. K.; KO, C. Y.; CHAN, Y. C. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. **Nutrition Research**, v. 27, n. 12, p. 756–761, 2007.

CHING-YEN, L., et al. Longitudinal fecal microbiome and metabolite data demonstrate rapid shifts and subsequent stabilization after an abrupt dietary change in healthy adult dogs. **Animal microbiome**, v.4, n. 46, p. 1-21, 2022.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2012.

CRAIG, A. D.; KHATTAK, F.; HASTIE, P.; BEDFORD, M. R.; OLUKOSI, O. A. Xylanase and xylo- oligosaccharide prebiotic improve the growth performance and concentration of potentially prebiotic oligosaccharides in the ileum of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 61, n. 1, p. 70–78, 2020.

DEGNAN, P. H., and H. Ochman. Illumina-based analysis of microbial community diversity, **ISME J**, v. 6, p. 183–194, 2012.

DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A. K.; *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v.54, não paginado, 2013.

DIKEMAN, C. L.; FAHEY, G. C. Viscosity as related to dietary fiber: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, p.649-663, 2006.

ENGLYST, H.; WIGGINS, H.S.; CUMMINGS, J.H. Determination of the nonstarch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v. 107, p. 307-318, 1982.

EPHRAIM, E.; COCHRANE, C. Y.; JEWELL, D. E. Varying protein levels influence metabolomics and the gut microbiome in healthy adult dogs. **Toxins**, v. 12, n. 8, p. 1–16, 2020.

EPHRAIM, E.; I JACKSON, M.; YERRAMILI, M.; E JEWELL, D. Soluble Fiber and Omega-3 Fatty Acids Reduce Levels of Advanced Glycation End Products and Uremic Toxins in Senior Dogs by Modulating the Gut Microbiome. **Journal of Food Science and Nutrition Research**, v. 03, n. 01, p. 18–33, 2020.

FEDIAF, Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, 2021.

GEORGE, J.; SABAPATHI, S. N. Cellulose nanocrystals: Synthesis, functional properties, and applications. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 45–54, 2015.

GIBSON, G. R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; *et al.* Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

GODOY, M. R. C.; KERR, K. R.; FAHEY, G. C. Alternative dietary fiber sources in companion animal nutrition. **Nutrients**, v.5, p.3099-3117, 2013.

GONZÁLEZ-ORTIZ, G.; DOS SANTOS, T. T.; VIENOLA, K.; *et al.* Response of broiler chickens to xylanase and butyrate supplementation. **Poultry Science**, v. 98, n. 9, p. 3914–3925, 2019.

GUEVARA, M. A.; BAUER, L. L.; ABBAS, C. A.; *et al.* Chemical composition, in vitro fermentation characteristics, and in vivo digestibility responses by dogs to select corn fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1619–1626, 2008.

IEBBA, V.; TOTINO, V.; MANCINI, C.; CORAZZIARI, E. S. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New microbiologica**, v.39,p.1-12, 2016.

HO DO, M.; SEO, Y. S.; PARK, H. Y. Polysaccharides: bowel health and gut microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.

JACKSON, M. I. Macronutrient Proportions and Fat Type Impact Ketogenicity and Shape the Circulating Lipidome in Dogs. **Metabolites**, v. 12, n. 7, 2022.

JONES, D.; LIANG, Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1329–1338, 2009.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **ANTIOXIDANTE & REDOX SIGNALING**, v. 8, n. 9 & 10, 2006.

KRÖGER, S.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. Influence of lignocellulose and low or high levels of sugar beet pulp on nutrient digestibility and the fecal microbiota in dogs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 4, p. 1598–1605, 2017.

KUBINYI, E.; RHALI S.F., SANDOR, S. *et al.* Gut Microbiome Composition is Associated with Age and Memory Performance in Pet Dogs, **Animals**, n.10, p.1-10, 2020.

LAFLAMME D.P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Pract**, v. 22, p.10–15, 1997.

LEWIS, S. J.; HEATON, K. W. **Roughage Revisited The Effect on Intestinal Function of Inert Plastic Particles of Different Sizes and Shape**, v.44, n.4, p.744-748, 1999.

LI, Q.; LAUBER, C. L.; CZARNECKI-MAULDEN, G.; PAN, Y.; HANNAH, S. S. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. **mBio**, v. 8, n. 1, 2017.

LIM, S.; CHANG, D. H.; AHN, S.; KIM, B. C. Whole genome sequencing of “Faecalibaculum rodentium” ALO17, isolated from C57BL/6J laboratory mouse feces. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 3–9, 2016.

MARKOWIAK, P., SLIZEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. **Gut pathogens**, v. 10, p. 10-21, 2018.

MASLANIK, T.; TANNURA, K.; MAHAFFEY, L.; *et al.* Commensal Bacteria and MAMPs Are Necessary for Stress-Induced Increases in IL-1 β and IL-18 but Not IL-6, IL-10 or MCP-1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v.489, 2012.

MCRORIE, J. W. Evidence-based approach to fiber supplements and clinically meaningful health benefits, part 1. **Nutrition Today**, v. 50, n. 2, p. 82–89, 2015.

MCRORIE, J. W.; FAHEY, G. C. A review of gastrointestinal physiology and the mechanisms underlying the health benefits of dietary fiber: Matching an effective fiber with specific patient needs. **Clinical Nursing Studies**, v. 1, n. 4, 2013.

MENG, X. and B.A. SLOMINSKI. Nutritive Values of Corn, Soybean Meal, Canola Meal and Peas for Broiler Chickens as Affected by a Multicarbohydrase Preparation of Cell Wall Degrading Enzymes”. **Poultry Science**, v. 84, p.1242-1251, 2005.

MIDDELBOS, I. S.; BOLER, B. M. V.; QU, A.; *et al.* Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary

Fiber Using 454 Pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

MIDDELBOS, I. S.; FASTINGER, N. D.; FAHEY, G. C. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 11, p. 3033–3044, 2007. 56.

MILLIGAN, G; SHIMPUKADE, B; ULVEN, T; HUDSON, B. Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors. **Chemical reviews**, v. 117, p. 67-110, 2017.

MINAMOTO, Y.; OTONI, C. C.; STEELMAN, S. M.; *et al.* Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 6, n. 1, p. 33–47, 2015.

MURRAY, S. M.; FAHEY, G. C.; MERCHEN, N. R.; SUNVOLD, G. D.; REINHART, G. A. Evaluation of Selected High-Starch Flours as Ingredients in Canine Diets. **American Society of Animal Science**, v.77, p.2180-2186,1998.

NRC - National Research Council. 2006. In: **Nutrient Requirements of Dogs**. National Academy Press. Washington, p.428.

NYBROE, S., *et al.* Alterations in Healthy Adult Canine Faecal Microbiome and Selected Metabolites as a Result of Feeding a Commercial Complete Synbiotic Diet with *Enterococcus faecium* NCIMB 10415. **Animals**, v. 13, n. 144, p.1-22, 2023.

OHIRA, H.; FUJIOKA, Y.; KATAGIRI, C.; *et al.* Butyrate enhancement of interleukin1 β production via activation of oxidative stress pathways in lipopolysaccharide-stimulated THPP1 cells. **J. Clin. Biochem. Nutr**, v. 50, n. 1, p. 59–66, 2012. PARKS, D.; TYSON, G; W; HUGENHOLTZ, P; BEIKO, R. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v.30, n.21, p.3123-3124, 2014. PEREIRA, A. M.; CLEMENTE, A. Dogs' Microbiome From Tip to Toe. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.45, p.1-13, 2021.

PILLA, R.; GASCHEN, F. P.; BARR, J. W.; *et al.* Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 5, p. 1853–1866, 2020.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet, **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.51, n.3, p. 605-621,2021.

PROLA, L.; DOBENECKER, B.; MUSSA, P. P.; KIENZLE, E. Influence of cellulose fibre length on faecal quality, mineral excretion and nutrient digestibility in cat. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 3, p. 362–367, 2010. PUJO, J., *et al.* Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits antiinflammatory properties in colitis. **Neurogastroenterology**, v.0, p. 1-10, 2020,

QI, X.; TESTER, R. F. Utilisation of dietary fibre (non-starch polysaccharide and resistant starch) molecules for diarrhoea therapy: A mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.122, p.572-577, 2019

RATAJCZAK, W.; RYŁ, A.; MIZERSKI, A.; *et al.* Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived shortchain fatty acids (SCFAs). **Acta Biochimica Polonica**, v.66, n.1, p.1-12,2019.

RAVEN, P. H; EVERT, R.F.; EICHHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan. 8ª Edição, 2007. 57.

RISOLIA, L. W.; SABCHUK, T. T.; MURAKAMI, F. Y.; *et al.* Effects of adding dried distillers grains with solubles (DDGS) to dog diets supplemented with xylanase and protease. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, 2019.

ROE, A. J.; O'BYRNE, C.; MCLAGGAN, D.; BOOTH, I. R. **Inhibition of Escherichia coli growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity**. v. 148, p.2215-2222, 2002.

SANDRI, M.; DAL MONEGO, S.; CONTE, G.; SGORLON, S.; STEFANON, B. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, 2017.

SAULNIER, L.; GUILLON, F.; SADO, P. Plant Cell Wall Polysaccharides in Storage Organs: Xylans (Food Applications). *In*: SAULNIER, L.; GUILLON, F.; SADO, P. **Comprehensive Glycoscience**, v.2. Editora Elsevier, Amsterdã/Holanda, p. 653-689, 2007.

SCHMIDT, M.; UNTERER, S.; SUCHODOLSKI, J. S.; *et al.* The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 2018.

SINGH, R. P. *et al.* Biochemical Basis of Xylooligosaccharide Utilisation by Gut Bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.6,p.2-21, 2022.

SILVA, J. R. DA. Uso De Resíduo Seco De Destilaria Contendo Solúveis (Ddgs), Com E Sem Xilanase, Na Alimentação De Cães. **Animal feed Science and Technology**, v.220,p. 136-142, 2016.

SOUZA NOGUEIRA, J. P.; HE, F.; MANGIAN, H. F.; OBA, P. M.; DE GODOY, M. R. C. Dietary supplementation of a fiber-prebiotic and saccharin-eugenol blend in extruded diets fed to dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 11, p. 4519–4531, 2019.

STALEY, C.; KAISER, T.; KHORUTS, A. Clinician Guide to Microbiome Testing. **Digestive Diseases and Sciences**, v.63, p.3167-3177, 2018.

TIZARD, I. R.; JONES, S. W. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 307–322, 2018.

TIAN, T., WANG, Z., ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, sem numeração, 2017.

TORTOLA, L.; SOUZA, N. G.; ZAINE, L.; *et al.* Enzyme effects on extruded diets for dogs with soybean meal as a substitute for poultry by-product meal. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. SUPPL.1, p. 39–50, 2013.

TOMASELLO, G.*et al.* Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 160, n.4, p. 461-466, 2016
58

TRAMONTANO, M.; ANDREJEV, S.; PRUTEANU, M.; *et al.* Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 514–522, 2018.

VAN HOECK, V.; SOMERS, I.; ABDELQADER, A.; *et al.* Xylanase impact beyond performance: A microbiome approach in laying hens. **PLoS ONE**, v. 16, n. 9, p. 1–18, 2021.

VAN SOEST, P.J. ; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **J Dairy Sci**, v.74, p.3583-3597, 1991.

VASTOLO, A.; RIEDMÜLLER, J.; CUTRIGNELLI, M. I.; ZENTEK, J. Evaluation of the Effect of Different Dietary Lipid Sources on Dogs' Faecal Microbial Population and Activities. **Animals**, v. 12, n. 11, 2022.

WERNIMONT, S., *et al.* Specialized Dietary Fibers Alter Microbiome Composition & Promote Fermentative Metabolism in the Lower Gastrointestinal Tract of Healthy Adult Cats (P20-045-19). *Curvv Dev Nut*, v. 3, n.1, s/paginação, 2019.

WERNIMONT, S. M.; RADOSEVICH, J.; JACKSON, M. I.; *et al.* The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–24, 2020.

YANG, X.; DARKO, K. O.; HUANG, Y.; *et al.* Resistant starch regulates gut microbiota: Structure, biochemistry and cell signalling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.42, p.306-318, 2017.

YIN, J., *et al.* Dietary xylo-oligosaccharide improves intestinal function in weaned piglets. **Food & function**, 2019.

YOU, I. W.; KIM, M. J. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: Breed, age, and body condition score. **Animals**, v. 11, n. 8, 2021.