

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDA LORENA FERNANDES

ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS ALTERAÇÕES NA DIGESTIBILIDADE DA  
DIETA *IN VIVO* E *IN VITRO* E NO MICROBIOMA E METABÓLITOS DE  
FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES EM CRESCIMENTO

CURITIBA  
2024

EDUARDA LORENA FERNANDES

ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS ALTERAÇÕES NA DIGESTIBILIDADE DA  
DIETA *IN VIVO* E *IN VITRO* E NO MICROBIOMA E METABÓLITOS DE  
FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES EM CRESCIMENTO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ananda Portella Félix.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.

CURITIBA  
2024

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

Fernandes, Eduarda Lorena

Estudo longitudinal sobre as alterações na digestibilidade da dieta *in vivo* e *in vitro* e no microbioma e metabólitos de fermentação intestinal em cães em crescimento / Eduarda Lorena Fernandes. – Curitiba, 2024.

1 recurso online: PDF.

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

Orientadora: Profª Drª Ananda Portella Félix

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

1. Cães - Filhotes. 2. Cães - Nutrição. 3. Sistema gastrointestinal. 4. Nutrição animal. I. Félix, Ananda Portella. II. Vasconcellos, Ricardo Souza. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EDUARDA LORENA FERNANDES** intitulada: **Estudo longitudinal sobre as alterações na digestibilidade da dieta *in vivo* e *in vitro* e no microbioma e metabólitos de fermentação intestinal em cães em crescimento**, sob orientação da Profa. Dra. ANANDA PORTELLA FÉLIX, 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, 01 de Agosto de 2024.

Assinatura Eletrônica

01/08/2024 15:54:16.0

ANANDA PORTELLA FÉLIX

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/08/2024 21:26:19.0

CAMILLA MARIANE MENEZES SOUZA

Avaliador Externo (SPECIAL DOG COMPANY)

Assinatura Eletrônica

01/08/2024 16:01:18.0

SIMONE GISELE DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 386001

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 386001**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Celso e Scheila, que nunca mediram esforços para minha formação profissional e crescimento pessoal. Agradeço profundamente pelo apoio, conselhos, incentivos e pelo imenso orgulho que sempre demonstraram.

À minha madrinha, Luciane, pelo apoio, incentivo, conselhos e imenso orgulho que sempre demonstrou por mim.

Sou imensamente grata à minha orientadora Ananda, por todo o conhecimento compartilhado, pelas oportunidades, conselhos, incentivos e pela empatia ao longo dessa jornada. Minha eterna gratidão.

Aos professores Alex e Simone, pelo apoio e orientações, que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Ao professor Ricardo Souza Vasconcellos pela co-orientação e pelas valiosas contribuições durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Às amigas que tive a oportunidade de conhecer durante essa caminhada, que tornaram o percurso mais leve e divertido, em especial Renata, Karina, Lorena e Laiane.

A todos os membros do Laboratório de Estudos em Nutrição Canina (LENUCAN), incluindo alunos de pós-graduação e estagiários, agradeço pelo conhecimento compartilhado e pelo auxílio nos projetos.

À CAPES pela concessão da bolsa, bem como à Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV-UFPR) pela oportunidade de ser estudante e por todo o suporte durante essa etapa.

À Dalpet, pelo fornecimento das dietas, ao Instituto Premier Pet, pelo financiamento do projeto, e à VB, pelo apoio ao laboratório.

Por fim, aos cães da LENUCAN, que são responsáveis pela viabilidade do experimento e são nossa alegria diária.

## RESUMO

O estabelecimento do microbioma intestinal começa no nascimento e tende a se tornar estável a medida que o animal atinge a maturidade, uma vez que a maioria dos fatores que induzem essas mudanças já ocorreram. A fase de crescimento é uma janela crítica para o estabelecimento da microbiota comensal, visto que é o período mais sensível a potenciais desafios. Além disso, os filhotes apresentam necessidades nutricionais e calóricas diferentes dos cães adultos. Essas diferenças na composição nutricional da dieta, associadas ao sistema gastrointestinal em desenvolvimento, podem influenciar na eficiência da digestão, estabelecimento da microbiota, e produção de metabólitos fermentativos no intestino. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da idade e do consumo alimentar nos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da dieta (*in vivo* e *in vitro*), microbioma e metabólitos de fermentação intestinal e características fecais ao longo do crescimento de cães. Para isso, foram realizados os experimentos 1 e 2. Os cães foram alimentados com a mesma dieta seca extrusada durante todo o estudo. No experimento 1 foram utilizados 8 cães da raça Beagle aos 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade. Houve redução do CDA da matéria seca (MS), extrato etéreo (EEA) e EM dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ ). Houve aumento no CDA da proteína bruta (PB) dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ ). Os valores estimados *in vitro* se aproximaram dos observados *in vivo*, exceto para matéria orgânica (MO). A matéria seca fecal (MSf) e o escore fecal foram menores e a produção fecal foi maior nos cães mais jovens, em relação aos mais velhos ( $P < 0,05$ ). Houve aumento na concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e indóis e redução nos ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ ). Os cães com 2 a 5 meses de idade apresentaram maior abundância relativa fecal dos gêneros *Streptococcus* e *Escherichia coli* e menor abundância de *Turicibacter* e *Peptacetobacter* ( $P < 0,05$ ). No experimento 2, foram utilizados 12 cães da raça Beagle e avaliados dois grupos experimentais: cães adultos com o consumo (g/dia) de adulto (CA =  $130 \times \text{peso}^{0,75}$ ) e cães adultos com o consumo de filhote (CF =  $210 \times \text{peso}^{0,75}$ ). Houve redução do CDA da MS, MO, PB e EM em cães CF quando comparado aos cães CA ( $P < 0,05$ ). A MSf e o escore fecal foram maiores e a produção fecal foi menor nos cães CA, em relação aos cães CF ( $P < 0,05$ ). Observou-se maior concentração fecal de amônia, AGCR totais e putrescina nos cães CF em comparação aos cães CA ( $P < 0,05$ ). Os cães do grupo CF apresentaram maior abundância fecal de *Streptococcus* e menor de *Blautia*, em relação ao grupo CA ( $P < 0,05$ ). Portanto, os CDA da dieta, o microbioma e metabólitos de fermentação intestinal são alterados tanto pela idade quanto pelo consumo alimentar, sugerindo que a microbiota se estabiliza a partir dos 8 meses de idade. Esses resultados permitem estabelecer estratégias de manejo nutricional para otimizar a digestibilidade e a funcionalidade intestinal em cães ao longo de seu desenvolvimento.

Palavras-chave: consumo; filhotes; funcionalidade intestinal; idade.

## ABSTRACT

The establishment of the gut microbiome begins at birth and gradually becomes stable as the animal reaches maturity, since most of the factors that induce these changes have already occurred. The growth phase is a critical period for establishing the commensal microbiota, as it is the phase most susceptible to potential challenges. In addition, puppies have different nutritional and caloric requirements to adult dogs. These differences in the nutritional composition of the diet, combined with the developing gastrointestinal tract, can influence the efficiency of digestion, the establishment of the microbiota and the production of fermentative metabolites in the intestine. The aim of the study was to evaluate the effect of age and food consumption on the apparent digestibility coefficients (ADC) of the diet (*in vivo* and *in vitro*), microbiome and intestinal fermentation metabolites and fecal characteristics throughout the growth of dogs. For this purpose, experiments 1 and 2 were conducted. The dogs were fed the same dry extruded diet throughout the study. In experiment 1, 8 Beagle dogs were used at 2, 5, 8, 11 and 14 months of age. There was a reduction in the ADC of dry matter (DM), ether extract (EEA) and metabolizable energy (ME) from 2 to 14 months of age ( $P < 0.05$ ). There was an increase in the ADC of crude protein (CP) from 2 to 14 months of age ( $P < 0.05$ ). The values estimated *in vitro* were similar to those observed *in vivo*, except for organic matter (OM). Fecal dry matter (FDM) and fecal score were lower and fecal production was higher in younger dogs compared to older ones ( $P < 0.05$ ). There was an increase in the fecal concentration of short-chain fatty acids (SCFA) and indoles and a reduction in branched-chain fatty acids (BCFA) from 2 to 14 months of age ( $P < 0.05$ ). Dogs aged between 2 and 5 months had a higher relative fecal abundance of the genera *Streptococcus* and *Escherichia coli* and a lower abundance of *Turicibacter* and *Peptacetobacter* ( $P < 0.05$ ). In experiment 2, 12 Beagle dogs were used and two experimental groups were evaluated: adult dogs with adult consumption (g/day) ( $CA = 130 \times \text{weight}^{0.75}$ ) and adult dogs with puppy consumption ( $CF = 210 \times \text{weight}^{0.75}$ ). There was a reduction in the ADC of DM, OM, CP and ME in CF dogs when compared to CA dogs ( $P < 0.05$ ). FDM and fecal score were higher and fecal production was lower in CA dogs compared to CF dogs ( $P < 0.05$ ). There was a higher fecal concentration of ammonia, total BCFA and putrescine in the CF dogs compared to the CA dogs ( $P < 0.05$ ). Dogs in the CF group had a higher fecal abundance of *Streptococcus* and a lower abundance of *Blautia* compared to the CA group ( $P < 0.05$ ). Therefore, dietary CDA, the microbiome and intestinal fermentation metabolites are influenced by both age and food consumption, suggesting that the microbiota stabilizes from 8 months of age. These results provide evidence to establish nutritional management strategies to optimize digestibility and intestinal functionality in dogs throughout their growth.

Keywords: age; consumption; intestinal functionality; puppies.

## Lista de tabelas

### CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

**Tabela 1:** Níveis recomendados de nutrientes para alimento completo para cães em crescimento inicial e tardio. Unidade por 100 g de matéria seca (MS).....13

**Tabela 2:** Estudos sobre o efeito da idade na digestibilidade da dieta e características fecais de cães.....16

### CAPÍTULO 2 - ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS ALTERAÇÕES NA DIGESTIBILIDADE DA DIETA *IN VIVO* E *IN VITRO* E NO MICROBIOMA E METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES EM CRESCIMENTO

**Tabela 1:** Média da composição química analisada da dieta na matéria seca (%).....34

**Tabela 2:** Médias de ingestão ( $\text{g/kg}^{0,75}/\text{dia}$ ), coeficientes de digestibilidade aparente (CDA, %), energia metabolizável (EM, kcal/kg) e características fecais de cães aos 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.....40

**Tabela 3:** Médias dos valores dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) *in vitro* e estimados *in vivo*.....41

**Tabela 4:** Médias de pH, amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), fenóis, indóis e p-cresóis nas fezes de cães com 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.....41

**Tabela 5:** Médias dos índices de alfa-diversidade (ASV's, Chao1 e Shannon) de cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.....43

**Tabela 6:** Médias de ingestão ( $\text{g/kg}^{0,75}/\text{dia}$ ), coeficientes de digestibilidade aparente (%), energia metabolizável (kcal/kg) e características fecais de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF).....46

**Tabela 7:** Médias de pH, amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR) das fezes de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF).....47

**Tabela 8:** Médias dos índices de alfa-diversidade (ASV's, Chao1 e Shannon) de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF).....48

## Lista de figuras

### **CAPÍTULO 2 - ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS ALTERAÇÕES NA DIGESTIBILIDADE DA DIETA *IN VIVO* E *IN VITRO* E NO MICROBIOMA E METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES EM CRESCIMENTO**

**Figura 1:** Beta-diversidade por dissimilaridade de Bray-Curtis ilustrando a diferenciação das comunidades bacterianas dos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade (P<0,05 por PERMANOVA).....43

**Figura 2:** Filos bacterianos fecais enriquecidos nos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade. P ajustado <0,05 pelo teste LEfSe.....44

**Figura 3:** Principais gêneros bacterianos fecais enriquecidos nos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade. P ajustado <0,05 pelo teste LEfSe.....45

**Figura 4:** Abundância (log DNA) do gênero *Fusobacterium*, *Turicibacter*, *Escherichia*, *Blautia* e *Petacetobacter* nas fezes dos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.....45

**Figura 5:** Beta-diversidade por dissimilaridade de Bray-Curtis ilustrando a diferenciação das comunidades bacterianas dos cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF) (P<0,05 por PERMANOVA).....48

**Figura 6:** LDA score dos principais gêneros bacterianos que diferiram nas fezes de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF). P ajustado <0,05 pelo teste LEfSe.....49

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

<b>1. Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. Objetivos</b> .....	<b>10</b>
1.1.1 Objetivos gerais.....	10
1.1.2 Objetivos específicos .....	11
<b>2. Revisão de literatura</b> .....	<b>11</b>
2.1 Particularidades nutricionais de cães em crescimento.....	11
2.2 Digestibilidade dos nutrientes da dieta.....	14
2.2.1 Efeito da idade e do consumo alimentar .....	14
2.2.2 Digestibilidade medida <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	16
<b>2.3 Microbioma e metabólitos de fermentação intestinal</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Desenvolvimento do microbioma intestinal .....	18
2.3.2 Efeito da idade e do consumo alimentar .....	21
<b>3. Considerações finais</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Referências</b> .....	<b>23</b>

### CAPÍTULO II - ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS ALTERAÇÕES NA DIGESTIBILIDADE DA DIETA IN VIVO E IN VITRO E NO MICROBIOMA E METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES EM CRESCIMENTO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>31</b>
<b>2. Material e métodos</b> .....	<b>32</b>
2.1 Experimento 1 .....	32
<b>2.1.1 Animais e instalações</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1.2 Manejo alimentar</b> .....	<b>33</b>
2.1.3 Digestibilidade <i>in vivo</i> e características fecais .....	34
2.1.4 Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	35
2.1.5 Metabólitos de fermentação e microbiota fecal .....	36
2.1.6 Cálculos e análise estatística .....	38
2.2 Experimento 2 .....	39
2.2.1 Animais e instalações.....	39
2.2.2 Grupos experimentais e avaliações .....	39
2.2.3 Cálculos e análise estatística .....	39
<b>3. Resultados</b> .....	<b>40</b>
3.1 Experimento 1 .....	40
3.1.1 Digestibilidade e características fecais.....	40
3.1.2 Metabólitos de fermentação e microbiota fecal .....	41
3.2 Experimento 2 .....	46
3.2.1 Digestibilidade e características fecais.....	46
3.2.2 Metabólitos de fermentação e microbiota fecal .....	46
<b>4. Discussão</b> .....	<b>49</b>
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>54</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>55</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>62</b>

## CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. Introdução

Durante o período de crescimento dos cães, o microbioma gastrointestinal é mais sensível a potenciais perturbações, do que na idade adulta. Este período também é uma janela crítica para a colonização e estabilização da microbiota. O microbioma intestinal contribui para o metabolismo do hospedeiro, protege contra patógenos e estimula o sistema imunológico, afetando a maioria das funções fisiológicas do seu hospedeiro (Pilla et al., 2020). Desse modo, a correta formação e manutenção do microbioma intestinal durante essa fase são essenciais para o crescimento saudável e longevidade dos cães (Schwarzer et al., 2017).

Além do estabelecimento do microbioma intestinal e maturação do sistema gastrointestinal (SGI), os filhotes apresentam necessidades nutricionais e calóricas diferentes dos cães adultos (NRC, 2006). Essas diferenças na composição nutricional da dieta, associadas ao SGI em maturação do filhote, podem influenciar na eficiência da digestão e na eubiose e produção de metabólitos fermentativos no intestino (Garrigues et al., 2022).

Desse modo, é importante conhecer as possíveis alterações na digestibilidade da dieta ao longo do crescimento dos cães. Entretanto, devido aos cães filhotes serem mais sensíveis ao isolamento do que cães adultos (Majecka et al., 2020), métodos de digestibilidade *in vitro* da dieta têm sido desenvolvidos, sendo uma alternativa aos métodos *in vivo* (Hervera et al., 2007). As condições de incubação *in vitro* das amostras são ajustadas às características da fisiologia digestiva canina, como concentrações de enzimas, temperatura, pH e tempos de incubação para obter resultados mais próximos aos *in vivo*.

Portanto, essa revisão de literatura tem como objetivo compreender as alterações na digestibilidade da dieta *in vivo* e *in vitro*, bem como no microbioma e nos metabólitos de fermentação intestinal em cães em crescimento.

#### 1.1. Objetivos

##### 1.1.1 Objetivos gerais

A revisão de literatura apresentada no Capítulo 1 tem como objetivo geral compreender as alterações na digestibilidade da dieta, microbioma e metabólitos de fermentação intestinal durante a fase de crescimento em cães. No Capítulo 2, o foco

é um estudo empírico que visa avaliar as alterações na digestibilidade da dieta, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, assim como no microbioma e nos metabólitos de fermentação intestinal em cães em crescimento. Esse estudo específico procura aplicar os conceitos discutidos na revisão de literatura para investigar essas mudanças de forma prática e detalhada.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito da idade e do consumo alimentar na digestibilidade, medida *in vivo* e *in vitro*, ao longo do crescimento de cães. Além disso, investigar como esses fatores influenciam as características fecais, o microbioma e metabólitos de fermentação intestinal de cães ao longo do seu crescimento.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Particularidades nutricionais de cães em crescimento**

O período neonatal em cães abrange em torno das três primeiras semanas de vida do animal, durante a qual eles são totalmente dependentes dos cuidados e da nutrição maternos (Case et al., 2011; Chastant-Maillard et al., 2016). Nos primeiros dias de vida, os filhotes necessitam da ingestão do colostro, com o intuito de adquirir os nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento. O colostro é rico em lipídios e açúcares, que fornecem a principal fonte de energia para os filhotes. No colostro, a fração proteica é constituída principalmente por caseína e imunoglobulinas, cujo papel é fundamental para a transferência imune passiva (Chastant & Mila, 2019). Posteriormente, ocorrem mudanças no perfil nutricional associadas aos níveis de proteínas, lipídios, minerais e açúcares do leite materno. Essas mudanças estão associadas à modulação do sistema imune e no desenvolvimento do microbioma gastrointestinal (Kirk, 2001).

Por volta das quatro semanas de vida, é necessária a adaptação gradual do filhote à nova rotina alimentar, com a introdução de alimentos sólidos a partir de alimentos completos comerciais específicos para a faixa etária (Case et al., 2011). As demandas nutricionais diárias dos animais são atendidas através de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, inseridos nas dietas, com características específicas e variações conforme sua fase de vida para que haja desempenho corporal correto e manutenção diária (Loureiro et al., 2017). Com isso, o fornecimento é feito de acordo

com as necessidades de energia metabolizável para crescimento, segundo o NRC (2006), considerando o peso a maturidade.

A necessidade energética diária dos filhotes é maior em relação os cães adultos (NRC, 2006). Quando um cão filhote atinge até 50% de seu peso corporal adulto, sua exigência calórica é aproximadamente 1,62 vezes superior àquela observada em cães adultos. Similarmente, se o cão se encontra na faixa entre 50% a 80% do seu peso corporal adulto, suas necessidades energéticas se elevam em cerca de 1,35 vezes em comparação com os cães adultos. À medida que o cão alcança a faixa de 80% a 100% do peso adulto, suas demandas energéticas convergem para valores próximos aos verificados em cães adultos (FEDIAF, 2021). Além de usar as equações como base, as quantidades de alimento são ajustadas para manter a taxa de crescimento esperada, segundo a curva de crescimento proposta para cães filhotes saudáveis (Salt et al., 2017).

Com isso, a dieta para filhotes deve apresentar alta digestibilidade para prevenir transtornos digestivos, especialmente devido à imaturidade do SGI, garantindo que o alto consumo de alimentos não sobrecarregue o SGI (Debraekeleer et al., 2010). Além disso, é necessário fornecer uma quantidade adequada de lipídios, pois esses nutrientes são compostos por ácidos graxos essenciais para o desenvolvimento saudável dos filhotes. (Case et al., 2011). O ácido graxo ômega 3 poli-insaturado, ácido docosahexaenóico (DHA), é necessário ao desenvolvimento cognitivo e da função da retina dos filhotes (Kelley et al., 2004; Heinemann et al., 2005; Zicker et al., 2012). Ainda, existe necessidade de maior aporte proteico para cães filhotes, uma vez que, proteínas fornecem aminoácidos, que são os elementos básicos para o crescimento do cão, pois este necessita assegurar o desenvolvimento de novos tecidos, especialmente o muscular (Case et al., 2011). Portanto, devem receber níveis corretos dos aminoácidos essenciais e também aporte eficaz de nitrogênio para a produção dos aminoácidos não essenciais (NRC, 2006).

Ainda, os cães filhotes necessitam de quantidades adequadas dos minerais, sendo que em excesso pode causar complicações (Case et al., 2011). O cálcio e fósforo em níveis ótimos e em uma proporção de aproximadamente 1:1, é fundamental para o eficaz desenvolvimento ósseo e formação do esqueleto (Lazzarotto, 2000; FEDIAF, 2021). O cobre e o zinco, dois minerais que trabalham em sinergia, também são importantes a serem considerados durante a fase de crescimento, considerando que o cobre é vital para a atividade dos osteoblastos durante o crescimento do

esqueleto e para absorver e transportar ferro (Case et al, 2011), e o zinco é importante para a síntese de proteínas.

A FEDIAF divide os estágios de crescimento dos filhotes em períodos iniciais e finais devido às distintas necessidades nutricionais em diferentes fases do crescimento, como apresentado na tabela 1. O crescimento inicial, ou período de desmame, concentra-se no rápido desenvolvimento dos tecidos, sistemas de órgãos e sistema imunológico. Dietas ricas em nutrientes com quantidades adequadas de proteínas, gorduras, vitaminas e minerais são cruciais durante esse período para dar suporte a esse rápido crescimento e desenvolvimento. À medida que os filhotes fazem a transição para o estágio de crescimento tardio, sua taxa de crescimento diminui, mas eles ainda precisam de uma dieta balanceada para garantir o desenvolvimento esquelético adequado e a saúde geral.

**Tabela 1:** Níveis recomendados de nutrientes para alimento completo para cães em crescimento inicial e tardio. Unidade por 100 g de matéria seca (MS).

Nutriente	Unidade	Nível mínimo recomendado	
		Crescimento inicial (<14 semanas)	Crescimento tardio (≥14 semanas)
<b>Proteína</b>	g	25,00	20,00
Arginina	g	0,82	0,74
Histidina	g	0,39	0,25
Isoleucina	g	0,65	0,50
Leucina	g	1,29	0,80
Lisina	g	0,88	0,70
Metionina	g	0,35	0,26
Metionina + cistina	g	0,70	0,53
Fenilalanina	g	0,65	0,50
Fenilalanina + tirosina	g	1,30	1,00
Treonina	g	0,81	0,64
Triptofano	g	0,23	0,21
Valina	g	0,68	0,56
<b>Gordura</b>	g	8,50	8,50
Ácido linoleico ( $\omega$ -6)	g	1,30	1,30
Ácido araquidônico ( $\omega$ -6)	mg	30,00	30,00
Ácido alfa-linolênico ( $\omega$ -3)	g	0,08	0,08
EPA + DHA ( $\omega$ -3)	g	0,05	0,05
<b>Minerais</b>	g		
Cálcio	g	1,00	0,80-1,00
Fósforo	g	0,90	0,70
Relação Ca/P	g	1/1	1/1
Potássio	g	0,44	0,44
Sódio	g	0,22	0,22
Cloro	g	0,33	0,33

Magnésio	g	0,04	0,04
<b>Oligoelementos</b>			
Cobre	mg	1,10	1,10
Iodo	mg	0,15	0,15
Ferro	mg	8,80	8,80
Manganês	mg	0,56	0,56
Selênio (dieta úmida)	µg	40,00	40,00
Selênio (dieta seca)	µg	40,00	40,00
Zinco	mg	10,00	10,00
<b>Vitaminas</b>			
Vitamina A	IU	500,00	500,00
Vitamina D	IU	55,20	50,00
Vitamina E	IU	5,00	5,00
Vitamina B1 (tiamina)	mg	0,18	0,18
Vitamina B2 (riboflavina)	mg	0,42	0,42
Vitamina B5 (ácido pantotênico)	mg	1,20	1,20
Vitamina B6 (piridoxina)	mg	0,12	0,12
Vitamina B12 (cobalamina)	µg	2,80	2,80
Vitamina B3 (niacina)	mg	1,36	1,36
Vitamina B9 (ácido fólico)	µg	21,60	21,60
Vitamina B7 (biotina)	µg		
Colina	mg	170,00	170,00
Vitamina K	µg		

g: gramas; mg: miligramas; µg: microgramas; ω: ômega.

## 2.2 Digestibilidade dos nutrientes da dieta

### 2.2.1 Efeito da idade e do consumo alimentar

O conhecimento sobre a utilização dos nutrientes na fase de crescimento é essencial para garantir a saúde, o desenvolvimento adequado e a longevidade dos cães (Sabchuk et al., 2019). Além dos cães filhotes logo após o desmame ainda estarem desenvolvendo seu SGI e não estarem com o microbioma intestinal maduro (Garrigues et al., 2022), eles possuem maior demanda energética para atender suas necessidades de crescimento (NRC, 2006; FEDIAF, 2021) e sustentar a curva de crescimento saudável (Salt et al., 2017). Isso resulta em um consumo alimentar proporcionalmente maior por quilograma de peso corporal em comparação aos cães adultos, principalmente quando alimentados com uma dieta de moderada densidade calórica (FEDIAF, 2021).

Muitos tutores de cães permitem acesso livre ao alimento e acabam fornecendo quantidade excessiva de ração, contribuindo para a superalimentação (Downes et al.,

2017). Além disso, a supernutrição durante a fase de crescimento pode estar associada a distúrbios musculoesqueléticos do desenvolvimento (Kealy et al., 1992; LaFond et al., 2002). Também pode levar ao ganho de peso indesejado e, isso predispõe os cães à obesidade mais tarde na vida (Glickman et al., 1995). Esse maior consumo, tanto por cães filhotes quanto por cães adultos, pode sobrecarregar o SGI e aumentar a taxa de passagem da digesta para o intestino grosso, impactando negativamente na digestibilidade da dieta (Hussein et al., 2000; Sabchuk et al., 2019; Ephraim et al., 2020).

A maioria dos autores que conduziram trabalhos avaliando o efeito da idade na digestibilidade dos nutrientes da dieta encontraram resultados divergentes, relatando falta de diferença entre as idades ou maior digestibilidade em cães adultos, devido a maturidade do SGI (Lloid e Mccay, 1955; Taylor et al., 1995; Weber et al., 2002; Swanson et al., 2004). Já em relação ao efeito do consumo, estudos comparando o efeito do consumo na digestibilidade das dietas em cães adultos, relataram menor digestibilidade da proteína bruta quanto maior o consumo (Nery et al., 2012; Hang et al., 2013; Herstad et al., 2017; Pinna et al., 2018; Jackson et al., 2018; Ephraim et al., 2020). Isso pode ser explicado, devido a ingestão de maiores quantidades de proteínas ultrapassar a capacidade de absorção do SGI dos cães (Hussein et al., 2000).

Além disso, cães filhotes podem apresentar maior digestibilidade do EEA quando comparados aos adultos. A maior digestibilidade aparente de lipídios observada em cães mais jovens pode ser atribuída à maior ingestão diária de EEA por  $\text{kg}^{0,75}/\text{dia}$ , que a de cães adultos (Sabchuk et al., 2019). Desse modo, ocorre menor participação relativa das perdas endógenas de lipídios, em relação ao consumido, no cálculo da digestibilidade aparente do EEA (Sabchuk et al., 2019). Esse fato também foi observado em outros estudos comparando a digestibilidade do EEA entre cães adultos e filhotes (Zanatta et al., 2011; Félix et al., 2013; Marx et al. 2017; Sabchuk., 2019). Além disso, o maior consumo alimentar por quilo de peso metabólito ( $\text{kg}^{0,75}$ ) pode influenciar negativamente características como maior produção fecal e menor matéria seca e consistência fecal nos cães (Weber et al., 2003; Félix et al., 2013). Estudos encontrados avaliando o CDA da dieta e características fecais estão citados na tabela 2.

**Tabela 2:** Estudos sobre o efeito da idade na digestibilidade da dieta e características fecais de cães.

Referência	Idade	Principais resultados
Sabchuk et al (2019)	5 meses vs. 6 anos	O CDA do EE e a EM foi maior em cães filhotes. O CDA dos demais nutrientes foi superior em adultos. Filhotes apresentaram menor MSf, pior escore fecal, maior produção de fezes e maior concentração de amônia fecal.
Félix et al (2013)	5,1 meses vs. 5,8 anos	O CDA do EE e MS foi maior em cães filhotes. Não houve diferença no CDA dos demais nutrientes. Filhotes apresentaram menor MSf, pior escore fecal, maior produção de fezes, menor pH e maior concentração de amônia fecal.
Zanatta et al (2011)	5-6 meses vs. 5 anos	O CDA do EE foi maior em cães filhotes. Não houve diferença no CDA dos demais nutrientes. Filhotes apresentaram menor MSf, pior escore fecal, menor pH fecal e maior concentração de amônia fecal.
Swanson et al (2004)	2 meses vs. 11 anos	O CDA de todos os nutrientes da dieta foi maior em adultos do que em filhotes.
Weber et al (2003)	11 vs. 21 vs. 35 vs. 60 semanas	O CDA da MS, PB e MO aumentou conforme os cães ficaram mais velhos.
Lloyd & Mccay (1995)	3 meses vs. 2 anos	O CDA dos nutrientes da dieta não diferiu entre as idades estudadas.

CDA: coeficiente de digestibilidade aparente; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; MSf: matéria seca fecal.

## 2.2.2 Digestibilidade medida *in vivo* e *in vitro*

A análise da composição química e da digestibilidade dos nutrientes são fatores essenciais para a avaliação qualitativa dos alimentos. Esses aspectos permitem determinar a disponibilidade dos diferentes nutrientes que compõem uma dieta, o que tem impactos consideráveis para a saúde dos animais (NRC, 2006). A indústria de pet food utiliza uma variedade de fontes de nutrientes, tanto de origem animal quanto vegetal. No entanto, variações na qualidade dos ingredientes e nos métodos de processamento dos alimentos podem afetar diretamente a disponibilidade de nutrientes, de maneira positiva ou negativa (Case et al., 2011).

As análises nutricionais para a avaliação da digestibilidade dos nutrientes da dieta em cães são geralmente realizadas com animais de laboratório, seguindo protocolos específicos estabelecidos pela Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2016). Para determinar a digestibilidade dos nutrientes *in vivo*, um

dos métodos mais utilizados é a coleta total de fezes. Esse método envolve alimentar os cães com uma dieta teste e coletar todas as fezes produzidas durante um período determinado. A AAFCO recomenda um período de adaptação à nova dieta de cinco dias, seguido por um período de coleta de fezes de cinco dias, para assegurar medições precisas da digestibilidade. A diferença entre a quantidade de nutrientes ingeridos e a quantidade de nutrientes excretados nas fezes é usada para calcular a digestibilidade aparente (AAFCO, 2016). Com isso, não é feita distinção entre nutrientes dietéticos não digeridos e nutrientes endógenos secretados no SGI que não são reabsorvidos. Os valores de digestibilidade calculados, então, devem ser referidos como “aparentes” (Godoy et al., 2016).

No entanto, apesar de ser um procedimento não invasivo, pode induzir estresse nos animais em função do confinamento (Ramos et al., 2020) e potencialmente levar a alterações no microbioma intestinal (Yang et al., 2022). Esse estresse pode ser mais expressivo em cães filhotes, visto que são animais mais sensíveis ao isolamento que os cães adultos (Majecka et al., 2020). Diante da preocupação com o bem-estar de cães utilizados em experimentação científica, surgem métodos alternativos aos ensaios de digestibilidade *in vivo* (Biagi et al., 2016). Foi desenvolvido um método *in vitro* para prever a digestibilidade aparente de alimentos extrusados secos para cães (Hervera et al., 2007), baseado no ensaio de incubação multienzimática (Boisen et al., 1991). Algumas modificações foram feitas para adaptar as condições de incubação às características da fisiologia digestiva canina, ajustando concentrações de enzimas e tempos de incubação para obter resultados mais precisos (Hervera et al., 2007). O método consiste em duas fases de incubação: a primeira simula a digestão gástrica, na qual a amostra do alimento é incubada por 2 horas com pepsina em pH 2,0; e a segunda simula a digestão no intestino delgado, adicionando pancreatina e incubando por 4 horas em pH 6,8 (Hervera et al., 2007). Além disso, com os dados obtidos *in vitro*, é possível utilizar equações para estimar a digestibilidade *in vivo* das frações de matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta (Hervera et al., 2007; Biagi et al., 2016).

## 2.3 Microbioma e metabólitos de fermentação intestinal

### 2.3.1 Desenvolvimento do microbioma intestinal

A microbiota intestinal desempenha diversas funções importantes na saúde do hospedeiro, incluindo a promoção da maturação do sistema imunológico através da estimulação de respostas imunes inatas e adaptativas, a manutenção da integridade da mucosa, a produção de metabólitos importantes para a funcionalidade intestinal e a utilização de nutrientes (Suchodolski et al., 2011; Blake e Suchodolski., 2016). A composição da microbiota do SGI pode ser influenciada por fatores intrínsecos, como raça, idade, peso ao nascer, fisiologia e patologias, e fatores extrínsecos, como nutrição, ambiente e uso de medicamentos (Hasan et al., 2019; Blake et al., 2020). Entre esses fatores, a idade é um dos que mais impacta a composição microbiana (You et al., 2021).

O desenvolvimento do microbioma intestinal começa logo no nascimento e continua a evoluir ao longo das diferentes fases da vida do cão (Garrigues et al., 2022). O período de crescimento é uma janela crítica para a colonização da microbiota, devido ao desenvolvimento do SGI (Han et al., 2018). Mudanças na composição da microbiota durante esse período podem proporcionar benefícios à funcionalidade intestinal ou induzir distúrbios gastrointestinais, doenças sistêmicas metabólicas e autoimunes na vida adulta (Tilocca et al., 2017; Moffa et al., 2019). Portanto, o desenvolvimento adequado da microbiota intestinal em cães filhotes é fundamental para promover saúde e longevidade (Schwarzer et al., 2018).

Após o nascimento, o sistema gastrointestinal do recém-nascido é rapidamente colonizado por microrganismos e é altamente instável. Nos primeiros dois dias de vida, *Firmicutes* representam cerca de 60% das comunidades bacterianas (Guard et al., 2017). No entanto, a baixa abundância e diversidade microbiana facilitam a colonização por bactérias externas, especialmente anaeróbias facultativas e obrigatórias, devido à presença de oxigênio no SGI (Sanidad et al., 2020). Os filos *Proteobacteria* e *Bacteroidota* são os primeiros colonizadores significativos, consumindo oxigênio e preparando o intestino para a colonização subsequente de anaeróbios estritos (Shin et al., 2015; Moon et al., 2018; Pereira et al., 2020). O filo *Bacteroidota* aumenta de menos de 1% de abundância no dia 2 para 39% no dia 56 e continua a crescer até a idade adulta (Guard et al., 2017; Omatsu et al., 2018; Pereira et al., 2020; You et al., 2021). Em geral, o filo *Firmicutes*, inicialmente dominante,

diminui em abundância relativa ao longo das primeiras semanas de vida, entretanto a família *Lactobacillaceae* aumenta, possivelmente influenciada pela ingestão de leite (Buddington et al., 2003; Guard et al., 2017). Essas mudanças no microbioma ocorrem antes da introdução de alimentos sólidos, impulsionadas por eventos metabólicos neonatais (Buddington et al., 2003).

O desmame marca um passo importante no estabelecimento da população bacteriana intestinal dos filhotes, pois a introdução de novos alimentos ao SGI promove a abundância e atividades de certos grupos bacterianos (Buddington et al., 2003; Guard et al., 2017). A crescente abundância de Bacteroidota durante o crescimento dos cães pode ser atribuída ao consumo de alimentos secos extrusados, ricos em carboidratos complexos (Garrigues et al., 2022). O filo *Fusobacteriota* também aumenta em abundância após o desmame, o qual é correlacionado positivamente com a idade dos cães, possivelmente devido ao consumo de produtos de origem animal contidos no alimento seco (You et al., 2020; Pilla et al., 2020). Ainda, *Firmicutes* permanece abundante após o desmame, mas com variações internas significativas (Guard et al., 2017; You et al., 2021).

As comunidades bacterianas continuam a diversificar-se após o desmame, substituindo bactérias essenciais para a digestão do leite por outras que desempenham papéis mais essenciais na digestão de dietas complexas (Garrigues et al., 2022). Uma vez estabilizadas as mudanças microbianas induzidas pela nova dieta e ambiente, a composição da microbiota torna-se mais estável à medida que o cão envelhece, uma vez que a maioria dos fatores que induzem mudanças microbianas já ocorreram (Garrigues et al., 2022). Apesar disso, é descrita alta variabilidade individual na abundância e composição da microbiota intestinal em cães saudáveis (Suchodolski et al., 2005; Handl et al., 2011; Scarsella et al., 2020).

O perfil bacteriano central dos cães é composto por cinco filos principais: *Firmicutes*, *Fusobacteriota*, *Bacteroidotas*, *Proteobacteria* e *Actinobacteriota* (Middelbos et al., 2010; Hand et al., 2013; Guard et al., 2017; Blake et al., 2020). Dentro da comunidade bacteriana intestinal dos cães, muitos dos táxons principais pertencem ao filo *Firmicutes*. A classe *Clostridia* é uma das mais abundantes, incluindo os grupos Clostridium IV (família *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*), XI (família *Peptostreptococcaceae*) e XIVa (família *Lachnospiraceae*, *Blautia spp.*) (Handl et al., 2011; Garcia-Mazcorro et al., 2012; Vazquez-Baeza et al., 2016). Além dos *Clostridia*, as classes *Bacilli* (principalmente ordem *Lactobacillales*,

gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*) e *Erysipelotrichi* (gêneros *Turicibacter*, *Catenibacterium* e *Coprobacillus*) também são prevalentes (Garcia-Mazcorro et al., 2011; Garcia-Mazcorro et al., 2012). O filo *Bacteroidota* é outro grupo abundante nas amostras fecais de cães adultos, abrangendo os gêneros *Prevotella*, *Bacteroides* e *Megamonas* (Garcia-Mazcorro et al., 2012; Hand et al., 2013). A abundância de *Bacteroides* e *Prevotella* varia bastante entre os cães. Curiosamente, suas abundâncias combinadas parecem estar inversamente relacionadas com a do filo *Fusobacteriota*, sugerindo que ocupam o mesmo nicho ecológico (Vazquez-Baeza et al., 2016). No filo *Fusobacteriota*, o gênero *Fusobacterium* é mais comum em cães saudáveis (Vazquez-Baeza et al., 2016).

Uma microbiota saudável é descrita como em homeostase no intestino do hospedeiro (eubiose), contendo equilíbrio entre bactérias sentinelas e potencialmente patogênicas. Alterações súbitas na composição da microbiota intestinal podem quebrar esse equilíbrio, levando a mudanças nas atividades metabólicas e tornando o intestino mais vulnerável a patógenos oportunistas. Esse desequilíbrio, denominado disbiose, está implicado em muitas doenças gastrointestinais, como doença inflamatória intestinal ou diarreia aguda (Guard et al., 2015; DeGruttola et al., 2016).

Um índice de disbiose da microbiota canina foi criado com base na abundância de sete táxons bacterianos com maior poder discriminatório entre cães saudáveis e doentes, sendo eles: *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Blautia*, *Fusobacterium* e *C. hiranonis* (AlShawaqfeh et al., 2017). Em cães adultos, um valor abaixo de 0 indica eubiose intestinal, enquanto um ID de 2 ou superior indica disbiose (Minamoto et al., 2015; Guard et al., 2015; Vázquez-Baeza et al., 2016). Evidências crescentes têm associado desequilíbrios no ecossistema microbiano intestinal à várias doenças, incluindo enteropatia inflamatória crônica, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, obesidade e diabetes em animais (Kelsen e Wu, 2012; Handl et al., 2013; Gevers et al., 2014; Cox e Blaser, 2015). Foi observado que *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Blautia*, *Fusobacterium* e *Clostridium hiranonis* são significativamente menos abundantes nas fezes de cães doentes, enquanto *Escherichia coli* e *Streptococcus* são mais abundantes (AlShawaqfeh et al., 2017).

O índice de disbiose em cães filhotes saudáveis de 1 a 6 semanas é significativamente maior do que em adultos, com um índice médio de 6 vs. -4 (Blake et al., 2020). As sete espécies bacterianas envolvidas no cálculo do índice de disbiose têm abundâncias significativamente diferentes em cães jovens comparados aos

adultos, principalmente *Escherichia coli*, *Faecalibacterium* e *Clostridium hiranonis* (Hand et al., 2013; Guard et al., 2017; Blake et al., 2020). Por volta das nove semanas de idade, o índice de disbiose dos filhotes começa a obter valores mais próximos do valor de referência de cães adultos, com índice abaixo de zero. Isso implica que o cálculo do índice de disbiose, definido para cães adultos, pode não ser adequado para avaliar distúrbios de saúde em filhotes. Devido à evolução dinâmica da microbiota dos cães com a idade, a definição do índice de disbiose de um filhote provavelmente exigiria um cálculo por semana e redefinições de limiares (Garrigues et al., 2022).

### **2.3.2 Efeito da idade e do consumo alimentar**

Os metabólitos de fermentação encontrados nas fezes são moléculas sintetizadas pela microbiota do intestino grosso após a digestão bacteriana de nutrientes, principalmente carboidratos e proteínas (Louis et al., 2017). A proporção desses compostos depende do equilíbrio de bactérias e dos substratos disponíveis no cólon para fermentação.

Os carboidratos não digeridos da dieta são fermentados pelas bactérias em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que, quando presentes em quantidades adequadas, possuem efeitos benéficos para a funcionalidade intestinal e a saúde geral dos cães. Os AGCC mais comuns são o acetato, propionato e butirato, representando proporções intraluminais de aproximadamente 60%, 20% e 20%, respectivamente (Den Besten et al., 2013; Louis et al., 2017). O acetato é usado na síntese de colesterol e ácidos graxos no fígado, aumenta o fluxo sanguíneo colônico e a captação de oxigênio, além de melhorar a motilidade ileal (Nishina et al., 1990; Scheppach, 1994; Lin et al., 1995). O propionato fornece energia constante para as células e tecidos, regula os níveis de insulina, melhora a sensibilidade à insulina e contribui para o controle da glicose no sangue, além de inibir a síntese de colesterol no fígado, promovendo a saúde cardiovascular (Hosseini et al., 2011). O butirato é a principal fonte de energia para os colonócitos, mantém a integridade da barreira intestinal, possui propriedades anti-inflamatórias e modula a resposta imunológica (Canani et al., 2011; Rivière et al., 2016).

Por outro lado, a fermentação de proteínas pela microbiota intestinal produz diversos metabólitos, incluindo ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) como isobutirato, valerato e isovalerato, além de amônia, fenóis, indóis e cresóis (Hendriks et al., 2012). Esses compostos são influenciados pela concentração e digestibilidade

das proteínas na dieta e pelos aminoácidos endógenos do hospedeiro (Swanson et al., 2002). A fermentação proteica pode resultar em compostos potencialmente tóxicos para a mucosa intestinal, associados a inflamações e doenças sistêmicas (Windey et al., 2012).

A idade é um dos fatores que mais impactam a diversidade da microbiota, sua composição e metabólitos (You et al., 2021). Nos primeiros meses de vida, os filhotes apresentam uma microbiota em desenvolvimento, caracterizada pela menor abundância de gêneros bacterianos e metabólitos relacionados à eubiose gastrointestinal, como os AGCC. Em contraste, a microbiota dos cães filhotes, quando comparada à dos adultos, tende a apresentar maiores quantidades de gêneros potencialmente patogênicos, além dos seus metabólitos (Blake et al., 2020; Garrigues et al., 2022). Apesar do SGI imaturo, a dieta desempenha um papel importante no desenvolvimento da microbiota saudável e longevidade dos cães (Sandri et al., 2016; Hasan et al., 2019; Sandri et al., 2019; Scarsella et al., 2020). Além disso, a necessidade de maior consumo alimentar por  $\text{kg}^{0,75}$  pelos cães filhotes ou a superalimentação em cães adultos pode impactar negativamente na microbiota e seus metabólitos (Opetz et al., 2023).

A maior ingestão de proteína por  $\text{kg}^{0,75}$  pelos cães pode aumentar a disponibilidade de proteína fermentável no cólon, principalmente quando alimentados com uma dieta de moderada densidade calórica e digestibilidade. Isso favorece o crescimento de bactérias consideradas potencialmente patogênicas, como *Streptococcus spp*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, além de diminuir a abundância de bactérias consideradas sentinelas da funcionalidade intestinal. Isso pode favorecer a produção de diversos metabólitos putrefativos (Sandri et al., 2016; Herstad et al., 2017; Pinna et al., 2018; Jackson et al., 2019). Esses compostos, quando em altas concentrações, são associados com disbiose e aumentarem o odor das fezes (Windey et al., 2012).

### **3. Considerações finais**

Com base na revisão de literatura, pode-se concluir que os cães filhotes possuem um microbioma intestinal imaturo e em desenvolvimento, que se torna mais estável e equilibrado ao longo do crescimento. Esse processo aumenta a abundância das bactérias sentinelas e seus metabólitos associados à eubiose intestinal. Em contraste, o maior consumo alimentar por  $\text{kg}^{0,75}$  dos cães pode sobrecarregar o

sistema digestório, influenciando negativamente a digestibilidade dos nutrientes da dieta, o microbioma e seus metabólitos de fermentação intestinal e as características fecais dos cães. Além disso, o método de digestibilidade *in vitro* pode ser uma alternativa para prever a digestibilidade *in vivo* e reduzir o estresse dos animais utilizados em experimentação.

#### 4. Referências

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. Dog and cat nutrient profiles: Official Publication of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. 2016.

ALSHAWAQFEH, M. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 11 out. 2017.

BIAGI, G. et al. A new *in vitro* method to evaluate digestibility of commercial diets for dogs. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 617–625, 26 ago. 2016.

BLAKE, A. B.; SUCHODOLSKI, J. S. Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 37–42, 1 jul. 2016.

BLAKE, A. B. et al. Developmental stages in microbiota, bile acids, and clostridial species in healthy puppies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 6, p. 2345–2356, 2020.

BUDDINGTON, R. K. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 5, p. 646–651, 1 maio 2003.

CANANI, R. B. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1519, 2011.

CASE, L. P. **Canine and Feline Nutrition: A Resource for Companion Animal Professionals**. [s.l.] Mosby, 2011.

CHASTANT-MAILLARD, S. et al. Canine and feline colostrum. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 148–152, 30 nov. 2016.

CHASTANT, S.; MILA, H. Passive Immune Transfer in Puppies. **Animal Reproduction Science**, v. 207, p. 162–170, 1 ago. 2019.

COX, L. M.; BLASER, M. J. Antibiotics in early life and obesity. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 11, n. 3, p. 182–190, 1 mar. 2015.

DEBRAEKELEER, J.; GROSS, K. L.; ZICKER, S. C. Feeding growing puppies: postweaning to adulthood. *Small Animal Clinical Nutrition*, 5th ed. Topeka, KS: Mark Morris Institute, p. 311-319, 2010.

DEGRUTTOLA, A. K. et al. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 5, p. 1137–1150, maio 2016.

DEN BESTEN, G. 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, n. 9, p. 2325–2340, 2 jul. 2013.

DOWNES, M. J. et al. Understanding the context for pet cat and dog feeding and exercising behaviour among pet owners in Ireland: a qualitative study. **Irish Veterinary Journal**, v. 70, n. 1, 20 set. 2017.

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. 517, 12 ago. 2020.

FAHEY, G. C.; BARRY, K. A.; SWANSON, K. S. Age-Related Changes in Nutrient Utilization by Companion Animals. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 425–445, ago. 2008.

FEDIAF. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. **European Pet Food Industry**, 2021.

FÉLIX, A. P. et al. Digestibility and metabolizable energy of raw soybeans manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2794–2801, 1 jun. 2013.

GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **MicrobiologyOpen**, v. 1, n. 3, p. 340–347, set. 2012.

GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 3, p. 542–554, 8 set. 2011.

GARRIGUES, Q. et al. Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2 set. 2022.

GEVERS, D. et al. The Treatment-Naive Microbiome in New-Onset Crohn's Disease. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 3, p. 382–392, mar. 2014.

GLICKMAN, L. T. et al. Pattern of diet and obesity in female adult pet dogs. v. 2, n. 1, p. 6–13, 1 jan. 1995.

GUARD, B. C. et al. Characterization of Microbial Dysbiosis and Metabolomic Changes in Dogs with Acute Diarrhea. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127259, 22 maio 2015.

GUARD, B. C. et al. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175718, 27 abr. 2017.

HAN et al. Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 16 abr. 2018.

HAND, D. et al. Pyrosequencing the Canine Faecal Microbiota: Breadth and Depth of Biodiversity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53115, 31 jan. 2013.

HASAN, N.; YANG, H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. **PeerJ**, v. 7, p. e7502, 16 ago. 2019.

HANDL, S. et al. Faecal microbiota in lean and obese dogs. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, n. 2, p. 332–343, 24 jan. 2013.

HANDL, S. et al. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 301–310, 14 fev. 2011.

HANG, I. et al. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 201, 9 out. 2013.

HEINEMANN, Kimberly M. et al. Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more efficient than  $\alpha$ -linolenic acid in improving electroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 8, p. 1960-1966, 2005.

HERSTAD, K. M. V. et al. A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, 30 maio 2017.

HERVERA, M. et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 5-6, p. 205–209, jun. 2007.

HENDRIKS, W. H.; VAN BAAL, J.; BOSCH, G. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants – a comparative species view. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. S247–S257, ago. 2012.

HOSSEINI, E. et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 5, p. 245–258, 26 abr. 2011.

HUSSEIN, H. S.; SUNVOLD, G. D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: **Recent advances in canine and feline nutrition: 2000 Iams Nutrition Symposium Proceedings**. Wilmington, Ohio: Orange Frazer Press, 2000. p. 153-168.

JACKSON, M. I.; JEWELL, D. E. Balance of saccharolysis and proteolysis underpins improvements in stool quality induced by adding a fiber bundle containing bound polyphenols to either hydrolyzed meat or grain-rich foods. **Gut Microbes**, v. 10, n. 3, p. 298–320, 30 out. 2018.

KEALY, R. D. et al. Effects of limited food consumption on the incidence of hip dysplasia in growing dogs. **Javma-journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 6, p. 857–863, 15 set. 1992.

KELLEY, R. L. et al. Effect of dietary fish oil on puppy trainability. **Proc International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids**, p. 1-5, 2004.

KELSEN, J. R.; WU, G. D. The gut microbiota, environment and diseases of modern society. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 374–382, 14 jul. 2012.

KIRK, Claudia A. New concepts in pediatric nutrition. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 31, n. 2, p. 369-392, 2001.

LAFOND, E.; BREUR, G. J.; AUSTIN, C. C. Breed Susceptibility for Developmental Orthopedic Diseases in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 5, p. 467–477, 1 set. 2002.

LAZZAROTTO, Joelsio José. Nutrição e alimentação de filhotes de cães. **Revista da FZVA**, v. 7, n. 1, p. 157-162, 2000.

LIN, Yuguang et al. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. **British Journal of Nutrition**, v. 74, n. 2, p. 197-207, 1995.

LOUIS, Petra; FLINT, Harry J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29-41, 2017.

LLOYD, L. E.; MCCAY, C. M. The Utilization of Nutrients by Dogs of Different Ages. **Journal of Gerontology**, v. 10, n. 2, p. 182–187, 1 abr. 1955.

LOUREIRO, Karina De Carli et al. Ingredientes provenientes do abate de bovinos em alimento para cães. **Ciência Rural**, v. 47, p. e20150778, 2017.

MAJECKA, Katarzyna et al. Behavioural outcomes of housing for domestic dog puppies (*Canis lupus familiaris*). **Applied animal behaviour science**, v. 222, p. 104899, 2020.

MARX, F. R. et al. Endogenous fat loss and true total tract digestibility of poultry fat in adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 7, p. 2928-2935, 2017.

MIDDELBOS, I. S. 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, p. e9768, 22 mar. 2010.

MINAMOTO, Y. 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, 2 jan. 2015.

MOFFA, S. et al. The Interplay between Immune System and Microbiota in Diabetes. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 1–10, 30 dez. 2019.

MOON, C. D. et al. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. **MicrobiologyOpen**, v. 7, n. 5, 17 jun. 2018.

National Research Council, 2006. Nutrient Requirements of Dogs. NRC, National Academy Press, Washington, DC, USA.

NISHINA, P. M.; FREEDLAND, R. A. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. **The Journal of Nutrition**, v. 120, n. 7, p. 668–673, 1 jul. 1990.

OMATSU et al. Molecular diversity of the faecal microbiota of Toy Poodles in Japan. v. 80, n. 5, p. 749–754, 11 abr. 2018.

OPETZ, D. L.; OBA, P. M.; SWANSON, K. S. Effects of Overfeeding on the DIGESTIVE Efficiency, VOLUNTARY Physical Activity Levels, and Fecal Characteristics and Microbiota of Adult Cats. **Journal of Animal Science**, v. 101, 1 jan. 2023.

PEREIRA, A. M. et al. Supplemental selenium source on gut health: insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 11, 12 out. 2020.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 14 jan. 2020.

PINNA, C. et al. Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative end-products, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 20 mar. 2018.

RAMOS, T. A. et al. IMPACTO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÃES E DIGESTIBILIDADE DA DIETA EM CANIL EXPERIMENTAL. **Archives of Veterinary Science**, v. 25, n. 3, 25 set. 2020.

RIVIÈRE, Audrey et al. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 979, 2016.

TAYLOR, E. J.; ADAMS, C.; NEVILLE, R. Some nutritional aspects of ageing in dogs and cats. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, n. 3, p. 645-656, 1995.

TILOCCA, B. et al. Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs' fecal microbiome—from days to weeks. **Microbiome**, v. 5, n. 1, 27 out. 2017.

SABCHUK, T. T. et al. Endogenous fat losses and true and apparent fat digestibility in adult and growing dogs fed diets containing poultry offal fat. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 1927–1937, 10 dez. 2019.

SALT, Carina et al. Growth standard charts for monitoring bodyweight in dogs of different sizes. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0182064, 2017.

SANDRI, M. et al. Substitution of a commercial diet with raw meat complemented with vegetable foods containing chickpeas or peas affects faecal microbiome in healthy dogs. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 1205–1214, 2 jan. 2019.

SANDRI, M. et al. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, dez. 2016.

SANIDAD, Katherine Z.; ZENG, Melody Y. Neonatal gut microbiome and immunity. **Current opinion in microbiology**, v. 56, p. 30-37, 2020.

SCARSELLA, E. et al. Learning machine approach reveals microbial signatures of diet and sex in dog. **PLOS ONE**, v. 15, n. 8, p. e0237874, 17 ago. 2020.

SCHEPPACH, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**, v. 35, n. 1 Suppl, p. S35–S38, 1 jan. 1994.

SCHWARZER, M.; STRIGINI, M.; LEULIER, F. Gut Microbiota and Host Juvenile Growth. **Calcified Tissue International**, v. 102, n. 4, p. 387–405, 6 dez. 2017.

SE, P.; DAWSON JM; HARPER EJ. The effect of ageing on nutrient digestibility by cats fed beef tallow-, sunflower oil- or olive oil-enriched diets. **PubMed**, v. 63, n. 1-2, p. 61–70, 8 jul. 2000.

SHIN, N.-R.; WHON, T. W.; BAE, J.-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496–503, set. 2015.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: a Bigger World than We Thought. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 261–272, mar. 2011.

SUCHODOLSKI, J. S. et al. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 9, p. 1556–1562, 1 set. 2005.

SWANSON, K. S. et al. Effects of Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides on Colonic Microbial Populations, Immune Function and Fecal Odor Components in the Canine. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1717S1719S, 1 jun. 2002.

SWANSON, K. S. et al. Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs<sup>123</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 6, p. 1713–1724, 1 jun. 2004.

VÁZQUEZ-BAEZA, Y. et al. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 12, 3 out. 2016.

YANG, K. et al. Gallnut Tannic Acid Exerts Anti-stress Effects on Stress-Induced Inflammatory Response, Dysbiotic Gut Microbiota, and Alterations of Serum Metabolic Profile in Beagle Dogs. v. 9, 27 abr. 2022.

YOU, I.; 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, p. 2432, 18 ago. 2021.

WEBER, M. et al. Influence of age and body size on gastrointestinal transit time of radiopaque markers in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 5, p. 677–682, 1 maio 2002.

WINDEY, K.; DE PRETER, V.; VERBEKE, K. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 1, p. 184–196, 25 nov. 2011.

ZANATTA, C. P. et al. Digestibility of dry extruded food in adult dogs and puppies. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 784–787, jun. 2011.

ZICKER, S. C. et al. Evaluation of cognitive learning, memory, psychomotor, immunologic, and retinal functions in healthy puppies fed foods fortified with docosahexaenoic acid-rich fish oil from 8 to 52 weeks of age. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 241, n. 5, p. 583–94, 2012.

## CAPÍTULO II - ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS ALTERAÇÕES NA DIGESTIBILIDADE DA DIETA IN VIVO E IN VITRO E NO MICROBIOMA E METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES EM CRESCIMENTO

### RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da idade e do consumo alimentar nos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da dieta (*in vivo* e *in vitro*), microbioma e metabólitos de fermentação intestinal e características fecais ao longo do crescimento de cães. Para isso, foram realizados os experimentos 1 e 2. Os cães foram alimentados com a mesma dieta seca extrusada durante todo o estudo. No experimento 1 foram utilizados 8 cães da raça Beagle aos 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade. Houve redução do CDA da matéria seca (MS), extrato etéreo (EEA) e energia metabolizável (EM) dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ ). Houve aumento no CDA da proteína bruta (PB) dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ ). Os valores estimados *in vitro* se aproximaram dos observados *in vivo*, exceto para matéria orgânica (MO). A matéria seca fecal (MSf) e o escore fecal foram menores e a produção fecal foi maior nos cães mais jovens, em relação aos mais velhos ( $P < 0,05$ ). Houve aumento na concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e indóis e redução nos ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ ). Os cães com 2 a 5 meses de idade apresentaram maior abundância relativa fecal dos gêneros *Streptococcus* e *Escherichia coli* e menor abundância de *Turicibacter* e *Peptacetobacter* ( $P < 0,05$ ). No experimento 2, foram utilizados 12 cães da raça Beagle e avaliados dois grupos experimentais: cães adultos com o consumo (g/dia) de adulto (CA =  $130 \times \text{peso}^{0,75}$ ) e cães adultos com o consumo de filhote (CF =  $210 \times \text{peso}^{0,75}$ ). Houve redução do CDA da MS, MO, PB e EM em cães CF quando comparado aos cães CA ( $P < 0,05$ ). A MSf e o escore fecal foram maiores e a produção fecal foi menor nos cães CA, em relação aos cães CF ( $P < 0,05$ ). Observou-se maior concentração fecal de amônia, AGCR totais e putrescina nos cães CF em comparação aos cães CA ( $P < 0,05$ ). Os cães do grupo CF apresentaram maior abundância fecal de *Streptococcus* e menor de *Blautia*, em relação ao grupo CA ( $P < 0,05$ ). Portanto, os CDA da dieta, o microbioma e metabólitos de fermentação intestinal são alterados tanto pela idade quanto pelo consumo alimentar, sugerindo que a microbiota se estabiliza a partir dos 8 meses de idade. Esses resultados permitem estabelecer estratégias de manejo nutricional para otimizar a digestibilidade e a funcionalidade intestinal em cães ao longo de seu desenvolvimento.

Palavras-chave: consumo, filhotes, funcionalidade intestinal, idade.

## 1. Introdução

O conhecimento sobre a utilização dos nutrientes na fase de crescimento é essencial para garantir a saúde, o desenvolvimento adequado e a longevidade dos cães. A maior parte dos ensaios de digestibilidade e avaliação da microbiota intestinal e seus metabólitos de fermentação intestinal em cães analisa os efeitos da inclusão de ingredientes ou aditivos na dieta sobre essas variáveis (Domingues et al., 2019; Sabchuk et al., 2019; Li et al., 2024). Contudo, não leva em consideração a influência da idade ou do consumo alimentar. Embora existam estudos publicados sobre o assunto, as informações disponíveis ainda apresentam divergências, especialmente sobre a utilização de nutrientes e a produção de metabólitos de fermentação intestinal em cães, tanto em filhotes quanto em adultos (Zanatta et al., 2011; Félix et al., 2013; Sabchuk et al., 2019).

Cães filhotes apresentam algumas particularidades importantes em relação à sua fisiologia gastrointestinal. Logo após o desmame, o sistema gastrointestinal dos filhotes ainda está em desenvolvimento e a microbiota intestinal é imatura, característica de disbiose (Blake et al., 2020; Garrigues et al., 2022). Isso é caracterizado pela abundância reduzida de gêneros bacterianos relacionados à eubiose, enquanto gêneros potencialmente patogênicos estão aumentados, em comparação com cães adultos saudáveis (Blake et al., 2020).

Além disso, os filhotes têm demanda energética maior para atender às necessidades de crescimento (NRC, 2006; FEDIAF, 2021). Isso resulta em consumo alimentar proporcionalmente maior por quilograma de peso metabólico em comparação aos cães adultos, especialmente quando alimentados com uma dieta de moderada densidade calórica. Esse aumento no consumo pode sobrecarregar o sistema gastrointestinal, acelerando a taxa de passagem da digesta, o que pode impactar negativamente na digestibilidade da dieta e na produção de metabólitos de fermentação intestinal (Hussein et al., 2000; Sabchuk et al., 2019; Ephraim et al., 2020).

A avaliação da digestibilidade da dieta em cães é comumente conduzida mediante protocolos específicos *in vivo* de acordo com a Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2016). No entanto, apesar de ser considerado um procedimento não invasivo, ele pode eventualmente induzir estresse aos animais em função do confinamento individual (Ramos et al., 2020), e potencialmente levar a alterações no microbioma intestinal (Yang et al., 2022). Esse estresse pode ser mais

significativo em cães filhotes, visto que são animais mais sensíveis ao isolamento que os cães adultos (Majecka et al., 2020). Diante da preocupação com o bem-estar de cães utilizados em experimentação científica, surgem métodos alternativos aos ensaios de digestibilidade *in vivo* (Biagi et al., 2016). Nesse cenário, destaca-se a avaliação da digestibilidade *in vitro*, método baseado na incubação multienzimática com concentrações e tempo compatíveis àqueles da fisiologia canina (Hervera et al., 2007). Embora estudos tenham demonstrado resultados de digestibilidade de dietas equiparáveis entre os métodos *in vivo* vs *in vitro* em cães adultos (Penazzi et al., 2021; Kara et al., 2020; Biagi et al., 2016; Hervera et al., 2007), não foram encontrados estudos similares em cães filhotes.

Dessa forma, um estudo abrangendo a fase de crescimento dos cães permite identificar o ponto crítico de transição a partir do qual a digestibilidade da dieta, bem como parâmetros como a composição e diversidade da microbiota e seus metabólitos de fermentação, se estabilizam e se tornam equiparáveis aos observados em cães adultos. Portanto, o objetivo desse estudo foi comparar o efeito da idade e do consumo alimentar na digestibilidade medida *in vivo* e *in vitro* e energia metabolizável (EM) da dieta em cães em crescimento. Além disso, pretendeu-se investigar como a idade e o consumo alimentar influenciam o microbioma e seus metabólitos de fermentação intestinal e as características fecais de cães em diferentes fases do crescimento.

## **2. Material e métodos**

O uso de animais para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, sob o protocolo n. 035/2022. O estudo foi realizado no Laboratório de Estudos em Nutrição Canina - LENUCAN em Curitiba, Paraná, Brasil (25º 25' 40" S, 49º 16' 23" W).

### **2.1 Experimento 1**

#### **2.1.1 Animais e instalações**

Foram utilizados 8 cães da raça Beagle (4 machos e 4 fêmeas) aos 2 meses ( $56 \pm 17,90$  dias), 5 meses ( $147 \pm 17,90$  dias), 8 meses ( $238 \pm 17,90$  dias), 11 meses ( $329 \pm 17,90$  dias) e 6 cães da raça Beagle (3 machos e 3 fêmeas) aos 14 meses ( $424 \pm 17,90$  dias) de idade, com peso corporal médio de  $5,27 \pm 1,48$  kg (2 meses),  $7,83 \pm$

1,47 kg (5 meses),  $9,61 \pm 0,61$  kg (8 meses),  $10,10 \pm 0,61$  kg (11 meses) e  $10,65 \pm 0,90$  kg (14 meses). Foram utilizados os mesmos animais dos 2 aos 14 meses de idade, com exceção de dois cães que foram removidos do grupo 14 meses. Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica prévia e foram considerados saudáveis.

Os cães foram alojados individualmente em canis de alvenaria (5 m de comprimento x 2 m de largura), com uma cama e acesso livre a água fresca. Durante a maior parte do experimento, os cães tiveram livre acesso a uma área externa de 1,137 m<sup>2</sup> por 4 h/dia para exercícios voluntários e socialização. Durante o período de coleta, quando os animais completaram 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade, os cães foram alojados individualmente em canis. As instalações tinham barras nas paredes laterais que permitiam interação visual e limitada com os cães vizinhos, além de receberem atenção redobrada e enriquecimento ambiental dentro do canil durante esse período. A temperatura ambiente variou de 16 °C a 28 °C, com um ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 6:00 às 18:00).

### **2.1.2 Manejo alimentar**

Os cães foram alimentados com o mesmo alimento completo seco extrusado para cães em crescimento ao longo do estudo. Os animais foram pesados semanalmente e alimentados duas vezes ao dia de acordo com as suas necessidades de energia metabolizável (NEM) para crescimento ou manutenção (dependendo da idade), recomendadas pela FEDIAF (2021) e ajustadas segundo a curva de crescimento proposta para cães filhotes saudáveis (Salt et al., 2017). A equação utilizada foi:  $NEM \text{ (kcal/dia)} = 210-135 \text{ (ajustados segundo a curva de crescimento)} \times [\text{peso corporal atual (kg)}/\text{peso esperado à maturidade (kg)}] \times \text{peso atual (kg)}^{0,75}$  (FEDIAF, 2021).

A dieta continha os seguintes ingredientes em sua composição: Farinha de carne e ossos, quirera de arroz, farinha de vísceras de aves, milho, farelo de trigo, glúten de milho, óleo de frango, hidrolisado de fígado de frango e suíno, cloreto de sódio, ácido propiônico, BHT e premix vitamínico mineral. A dieta não continha aditivos funcionais que pudessem interferir com a funcionalidade intestinal dos animais. A composição química analisada da dieta está descrita na tabela 1. A água foi fornecida à vontade.

**Tabela 1: Composição química analisada da dieta experimental com base na matéria seca (%).**

Item	Dieta (%)
Matéria seca	94,34
Proteína bruta	24,16
Extrato etéreo em hidrólise ácida	11,74
Matéria mineral	10,52
Fibra dietética total	6,43
Cálcio	2,44
Fósforo	1,68
Energia Bruta (Kcal/kg)	4601,85

### 2.1.3 Digestibilidade *in vivo* e características fecais

O ensaio de digestibilidade seguiu o método de coleta total de fezes recomendado pela Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2016), com no mínimo 15 dias de adaptação, seguido por 5 dias de coleta total de fezes por período de avaliação.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 16:00 horas) em quantidades suficientes para suprir a necessidade de EM de cães em crescimento ou manutenção, como comentado anteriormente. As fezes foram coletadas pelo menos duas vezes ao dia durante cinco dias correspondentes aos 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade, respectivamente. As fezes foram armazenadas em embalagens plásticas individuais previamente identificadas, tampadas e congeladas em freezer (-14 °C) para serem analisadas posteriormente.

No final do período de coleta, as fezes foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas separadamente, formando uma amostra composta de cada animal. As fezes foram secas em uma estufa de ventilação forçada (320-SE, Fanem, São Paulo, Brasil) a 55 °C por 72 h ou até atingirem um peso constante. Após a secagem, as fezes e a dieta experimental foram moídas usando uma peneira de 1 mm em um moedor (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, EUA) e analisadas quanto à MS a 105 °C por 12 h, proteína bruta (PB, nitrogênio × 6,25, método 954.01), matéria mineral (método 942.05) e extrato etéreo em hidrólise ácida (EEA, método 942.05). Todas as análises seguiram as recomendações da Association of Official

Analytical Chemists (AOAC, 1995). A fibra dietética total da dieta foi analisada de acordo com Prosky et al. (1988). A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica (IKA C2000 Basic, IKA - Werke, Staufen, Germany).

As características fecais foram avaliadas durante o período de coleta pelo conteúdo total de MS (MSf), produção, escore e pH. O escore fecal foi sempre avaliado pelo mesmo pesquisador, atribuindo pontos de 1 a 5, sendo: 1 = fezes macias e sem forma definida; 2 = fezes moles e malformadas; 3 = fezes moles, formadas e úmidas; 4 = fezes bem formadas e consistentes; 5 = fezes bem formadas, duras e secas, de acordo com Carciofi et al (2009). O pH fecal foi aferido com um medidor de pH digital (331, Politeste Instrumentos de Teste Ltda., São Paulo, SP, Brasil), usando 3,0 g de fezes frescas diluídas em 30 mL de água destilada.

#### **2.1.4 Digestibilidade *in vitro***

Os coeficientes de digestibilidade *in vitro* foram determinados de acordo com o método descrito por González et al. (2023), adaptado de Hervera et al. (2007), modificada pela não adição do antibiótico (cloranfenicol). A digestibilidade *in vitro* foi analisada em quadruplicata.

Um grama da dieta seca extrusada moída foi pesada em frascos Erlenmeyer de 125 mL e submetida às seguintes etapas:

1. Primeira etapa: simulação da digestão gástrica.

Foram adicionadas 25 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6) a cada frasco, a amostra e o tampão foram homogeneizados por meio de agitação magnética. A esta solução foi adicionada 10 mL de 0,2 M de HCl e o pH foi ajustado para pH 2 com uma solução de 1M HCl e 1M NaOH. Em seguida, 1 mL de solução de pepsina recentemente preparada foi adicionada, contendo 10 mg de pepsina (3651 U / mg). Os frascos, então foram fechados e as amostras incubadas em um banho-maria a 39°C durante 2 horas sobre agitação constante.

2. Segunda etapa: simulação digestão pós-gástrica

Após 2 horas de incubação, os frascos Erlenmeyer foram resfriados e foi adicionado 10 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,8) e 5 mL de NaOH 0,6 M. O pH foi ajustado a 6,8 com a solução de HCl e NaOH descrita no passo anterior. Em seguida, 1 mL de solução de pancreatina preparada na hora, contendo 100 mg de pancreatina em pó, foi adicionada em cada balão. Posteriormente, os frascos foram incubados novamente em banho-maria a 39°C, durante 4 horas, sobre agitação constante.

Após a segunda fase de incubação, o frasco Erlenmeyer foi resfriado e foi adicionado 5 mL de ácido sulfosalicílico 20%. As proteínas solubilizadas, mas não digeridas foram precipitadas durante 30 min. à temperatura ambiente. O resíduo não digerido foi então recolhido em uma unidade de filtração, utilizando-se cadinhos de filtro de vidro. A mistura foi transferida com água para o cadinho. Após lavagens sucessivas (a cada 3 min.), duas vezes com 10 mL de etanol a 96% e duas vezes com acetona a 99%, o resíduo não digerido foi separado para posterior análises.

As análises para obter os valores de digestibilidade da MO, MS, PB e EB seguiram as recomendações da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

### **2.1.5 Metabólitos de fermentação e microbiota fecal**

Nos dias em que os cães completaram 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade, amostras de fezes frescas foram coletadas individualmente, após no máximo 15 min de defecação, para análise de amônia, fenóis, indóis, cresóis, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de cadeia ramificada (AGCR) e microbiota. Apenas a microbiota fecal também foi avaliada aos 3 meses de idade.

A concentração de amônia fecal foi determinada de acordo com Brito et al. (2010). Para a determinação dos AGCC (acetato, propionato, butirato e valerato) e AGCR (isobutirato e isovalerato) e outros compostos voláteis (ácidos 4-metil valerato, heptanóico e hexanóico), 10 g de amostra de fezes foram pesadas e misturadas com 30 mL de ácido fórmico a 16%. Essa mistura foi homogeneizada e armazenada em uma geladeira a 4 °C por um período de 3 a 5 dias. Após esse período, as soluções foram centrifugadas a 2500 rpm (2K15, Sigma, Osterode am Hans, NI, Alemanha) por 15 min. No final da centrifugação, o sobrenadante foi separado e submetido a nova centrifugação. Cada amostra foi submetida a três centrifugações e, ao final da última, parte do sobrenadante foi transferida para um tubo eppendorf devidamente identificado para congelamento subsequente a -14 °C. Em seguida, as amostras foram descongeladas e submetidas a uma nova centrifugação a 18.000 rpm por 15 min. (Rotanta 460 Robotic, Hettich, Tuttlingen, BW, Alemanha). Ambas as centrifugações foram realizadas sob refrigeração (aproximadamente 5 °C). Os AGCC e AGCR fecais foram analisados por cromatografia gasosa (Shimadzu, modelo GC-2014, Kyoto, Honshu, Japão), usando uma coluna de vidro (Agilent Technologies, HP INNO wax - 19.091 N, Santa Clara, CA, Estados Unidos da América) com 30 m de comprimento e

0,32 mm de largura. O volume injetado do sobrenadante foi definido como 1  $\mu$ L. O nitrogênio foi usado como gás de arraste com uma taxa de fluxo de 3,18 mL/min. As temperaturas de trabalho foram 200 °C no injetor, 240 °C na coluna (a uma velocidade de 20 °C/min) e 250 °C no detector de ionização de chama.

Os fenóis e indóis foram analisados por cromatografia, com um cromatógrafo de gás GCMS2010 Plus (Shimadzu®), acoplado a um espectrômetro de massa TQ8040 com um auto-amplificador AC 5000 e um injetor sem fendas. As separações cromatográficas foram obtidas na coluna SH-Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m - Shimadzu®) com um caudal de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, e hélio como gás de arrastamento a 5,0 velocidade. A linha de transferência e as temperaturas da fonte de ionização foram mantidas a 40°C e 220°C, respectivamente, o volume de injeção de 1 L foi mantido no modo split (taxa 1:10). A temperatura do forno GC foi mantida a 220°C (5 min), com o aumento de 40°C min<sup>-1</sup> para 280°C (5 min). O tempo total de análise foi de 31 min e o espectrômetro de massa funcionou nos modos de varrimento total (m/z = 40 a 400) e monitoramento seletivo de íons (SIM), ionização eletrônica a 70 eV. O software utilizado na análise de dados foi o GCMSsolution®.

Para a avaliação da microbiota fecal, aproximadamente 2 g de amostra foram retiradas do interior das fezes recém-coletadas, colocados em um micro tubo eppendorf estéril e armazenado em um freezer a -80 °C até o momento da análise.

Para a análise de microbiota, o DNA das amostras foi extraído. Para isso, foi empregado o kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep® (Zymo Research, Irvine, CA) seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (ThermoScientific). Para avaliar a integridade do DNA extraído, todas as amostras foram corridas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com uma solução de brometo de etídeo 1% e visualizadas com luz ultravioleta em transiluminador. Foi amplificado um segmento de 460 bases da região hipervariável V3V4 do gene ribossomal 16S rRNA utilizando-se os primers universais 515F e 806R e as seguintes condições de PCR: 95°C por 3 min; 25 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg; seguido de 72°C por 5 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 e Ochman, 2011). As leituras ou "reads" obtidos no sequenciador foram analisadas na

plataforma QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010), seguindo-se um fluxo de trabalho desde a remoção de sequências de baixa qualidade, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros bacterianos através do reconhecimento de variantes de sequenciamento de amplicons (ASVs), nesse caso a homologia das sequências quando comparadas contra uma base de dados. Para comparar as sequências foi utilizada a atualização GTDB 202 do ano de 2021 do banco de dados de sequências ribossomais Genome Taxonomy Database (Parks et al., 2021).

Para gerar a classificação das comunidades bacterianas por identificação de ASVs, foram utilizadas 12.293 leituras por amostra, com a finalidade de normalizar os dados e não comparar amostras com diferente número de leituras.

### 2.1.6 Cálculos e análise estatística

A matéria orgânica (MO%) foi calculada por:  $100 - \text{MM}\%$  e a MSf foi obtida por:  $(\text{MS}_{55} \times \text{MS}_{105}) / 100$ . A EM foi estimada segundo a AAFCO (2016):  $\text{EM} (\text{kcal g}^{-1}) = \{ \text{kcal g}^{-1} \text{EB ingerida} - \text{kcal g}^{-1} \text{EB das fezes} - [(\text{g PB ingerida} - \text{g PB das fezes}) \times 1,25 \text{ kcal g}^{-1}] \} / \text{g ração ingerida}$ . Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram determinados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes, conforme equação:  $\text{CDA}\% = [(\text{nutriente ingerido} - \text{nutriente excretado}) / \text{nutriente ingerido}] \times 100$ .

O estudo foi analisado segundo delineamento inteiramente ao acaso com medidas repetidas no tempo, totalizando 8 repetições dos 2 aos 11 meses e 6 repetições aos 14 meses de idade. Inicialmente, os dados de digestibilidade, características fecais e metabólitos de fermentação foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e quando atendida as premissas iniciais, foram submetidos à análise de regressão, considerando 5% de significância.

Os dados de digestibilidade *in vitro* foram submetidos às equações propostas por Hervera et al (2007), Hervera et al (2009) e Biagi et al (2016) para estimativa dos CDA da MS, MO e PB. Os resultados foram apresentados de modo descritivo.

Para avaliar os gêneros bacterianos com maior poder discriminatório entre as idades, os dados de abundância relativa do microbioma fecal foram avaliados pela Análise Discriminante Linear do Tamanho do Efeito (LEfSe), com valor de probabilidade ajustado para *false discovery rate* < 0,05. Dados de índices de diversidade alfa (Shannon, Chao1 e ASV'S) foram analisados pelo teste de Kruskal-

Wallis ( $P < 0,05$ ). A beta-diversidade foi aferida pela análise das coordenadas principais (PCoA), utilizando o método de dissimilaridade de Bray-curtis. As diferenças entre o perfil geral da microbiota entre os tratamentos foram analisadas pelo teste de PERMANOVA, considerando  $P < 0,05$ .

## **2.2 Experimento 2**

### **2.2.1 Animais e instalações**

Foram utilizados os mesmos 8 cães da raça Beagle do experimento 1, aos 14 meses ( $424 \pm 17,90$  dias) de idade (4 machos e 4 fêmeas). Ainda, foram utilizados outros 4 cães (2 machos e 2 fêmeas) da raça Beagle aos 14 meses ( $424 \pm 17,90$  dias) de idade, com peso corporal médio de  $10,59 \pm 0,98$  kg, para compor o experimento 2, totalizando 12 cães. Os cães apresentaram escore de condição corporal de 4 a 5, em uma escala de 1 a 9 (Laflamme, 1997). Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica prévia e foram considerados saudáveis. Os cães foram alojados nas mesmas instalações descritas no experimento 1.

### **2.2.2 Grupos experimentais e avaliações**

Foram avaliados dois grupos experimentais: cães adultos com o consumo de adulto (CA) e cães adultos com o consumo de filhote (CF). Os cães foram alimentados com o mesmo alimento seco extrusado para cães em crescimento utilizado no experimento 1. Os cães CA receberam quantidade de alimento para suprir as suas necessidades de EM para a manutenção, conforme o NRC (2006) e histórico dos animais, sendo de aproximadamente  $130 \text{ kcal/kg}^{0,75}/\text{dia}$ . Os cães CF foram alimentados com a mesma quantidade em g de MS por  $\text{kg}^{0,75}$  dos cães com 2 meses de idade do experimento 1, sendo aproximadamente  $210 \text{ kcal/kg}^{0,75}/\text{dia}$ . A água foi fornecida à vontade.

Foram avaliados os CDA e EM da dieta, características fecais e metabólitos de fermentação e microbiota fecal dos grupos, conforme descrito para o experimento 1.

### **2.2.3 Cálculos e análise estatística**

Os dados foram analisados segundo delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições por grupo. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk. Os dados com distribuição normal foram submetidos ao

teste t-Student ( $P < 0,05$ ). Os dados de microbiota fecal foram submetidos às mesmas análises descritas no Experimento 1.

### 3. Resultados

#### 3.1 Experimento 1

##### 3.1.1 Digestibilidade e características fecais

Não foram observadas reações adversas às dietas, como episódios de vômito, diarreia ou recusa alimentar ao longo do estudo. Houve comportamento quadrático na ingestão de MS, MO, PB, FDT, EEA e EM por  $\text{kg}^{0,75}/\text{dia}$ , com menores valores a partir dos 8 meses de idade ( $P < 0,05$ , Tabela 2). Os cães ingeriram toda a ração oferecida, sem a presença de sobras. A idade não alterou os CDA da MO e EB ( $P > 0,05$ , Tabela 2). Por outro lado, o CDA da MS e EM diminuiu linearmente dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ , Tabela 2). O CDA da PB aumentou linearmente dos 2 aos 14 meses de idade ( $P < 0,05$ , Tabela 2). Entretanto, houve um comportamento quadrático no CDA do EEA, com maiores valores aos 2 meses de idade ( $P < 0,05$ , Tabela 2). Ainda, a idade aumentou linearmente a MSf e o escore fecal ( $P < 0,05$ , Tabela 2). Além disso, diminuiu linearmente a produção de fezes ( $\text{g}/\text{animal}/\text{dia}$ ) ( $P < 0,05$ , Tabela 2). Ainda, não houve influência da idade no pH fecal ( $P > 0,05$ , Tabela 3).

**Tabela 2:** Médias de ingestão, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), energia metabolizável (kcal/kg) e características fecais de cães aos 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.

Item	Idade (meses)					EPM	P-L	P-Q
	2	5	8	11	14			
<b>Ingestão em g na matéria seca/<math>\text{kg}^{0,75}/\text{dia}</math></b>								
Matéria seca	59,8	59,8	42,1	37,9	37,9	1,65	0,005	<0,001
Matéria orgânica	53,9	53,8	37,9	34,3	34,3	1,49	0,005	<0,001
Proteína bruta	14,4	14,4	10,2	9,1	9,1	0,41	0,005	<0,001
Extrato etéreo	7,0	7,0	4,9	4,5	4,5	0,20	0,005	<0,001
Fibra dietética total	3,8	3,8	2,7	2,4	2,4	0,11	0,004	<0,001
Energia metabolizável	210,1	207,5	144,6	129,9	127,7	6,18	0,143	<0,001
<b>CDA (%)</b>								
Matéria seca	71,9	70,1	68,2	68,5	67,5	0,43	<0,001	0,208
Matéria orgânica	75,4	74,3	74,1	75,0	73,0	0,31	0,103	0,982
Proteína bruta	76,0	75,7	77,3	79,3	77,1	0,31	0,001	0,521
Extrato etéreo	86,0	83,0	81,2	84,0	83,5	0,37	<0,001	<0,001
Energia bruta	76,2	75,3	75,4	75,6	73,7	0,31	0,059	0,616
<b>Energia metabolizável</b>	<b>3512,7</b>	<b>3469,2</b>	<b>3434,3</b>	<b>3427,0</b>	<b>3370,2</b>	<b>15,00</b>	<b>0,002</b>	<b>0,990</b>
<b>Características fecais</b>								
Matéria seca (%)	26,9	28,4	32,0	33,7	35,5	0,58	<0,001	0,921

Produção de fezes (g/dia)	269,2	313,4	231,7	201,2	202,0	7,64	<0,001	0,063
Escore fecal	3,0	3,1	3,6	3,8	3,9	0,09	<0,001	0,888

Extrato etéreo: em hidrólise ácida; EPM: erro padrão da média; P-L: probabilidade para efeito linear (P<0,05); P-Q: probabilidade para efeito quadrático (P<0,05).

Foram observados maiores CDA *in vitro* da MS, MO e PB e EB, em comparação com a análise *in vivo* (Tabela 3). No entanto, ao utilizar as equações para estimar os valores dos CDA *in vivo* a partir dos valores obtidos *in vitro*, os valores estimados se aproximaram mais dos observados *in vivo* (Tabela 3).

**Tabela 3:** Médias dos valores dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) *in vitro* e estimados *in vivo*.

Item	CDA <i>in vitro</i>	CDA estimado <i>in vivo</i>
MS	74,40	73,25
MO	72,16	67,34
PB	84,50	78,69
EB	81,39	-

### 3.1.2 Metabólitos de fermentação e microbiota fecal

Observou-se um comportamento quadrático nas concentrações fecais de acetato, propionato, butirato e AGCC totais, com maiores valores em cães a partir dos 5 meses de idade (P<0,05, Tabela 4). Além disso, houve comportamento quadrático nas concentrações fecais de isovalerato, isobutirato e ácido hexanóico, com menores valores em cães mais velhos (P<0,05, Tabela 4). O valerato, heptanóico e os AGCR totais diminuíram linearmente nas fezes dos 2 aos 14 meses de idade (P<0,05, Tabela 4). Não foi observado efeito da idade sobre as concentrações fecais de amônia e do ácido 4-metilvalerato (P>0,05, Tabela 4).

Não foi observada diferença de idade para as porcentagens de picos de fenóis nas fezes (P>0,05, Tabela 4). Entretanto, observou-se um comportamento quadrático nas porcentagens de picos de indóis, com os maiores valores em cães a partir dos 5 meses de idade (P<0,05, Tabela 4). As porcentagens de picos de p-cresóis aumentaram linearmente nas fezes dos 2 aos 14 meses de idade (P<0,05, Tabela 4).

**Tabela 4:** Médias de pH e metabólitos de fermentação das fezes de cães com 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.

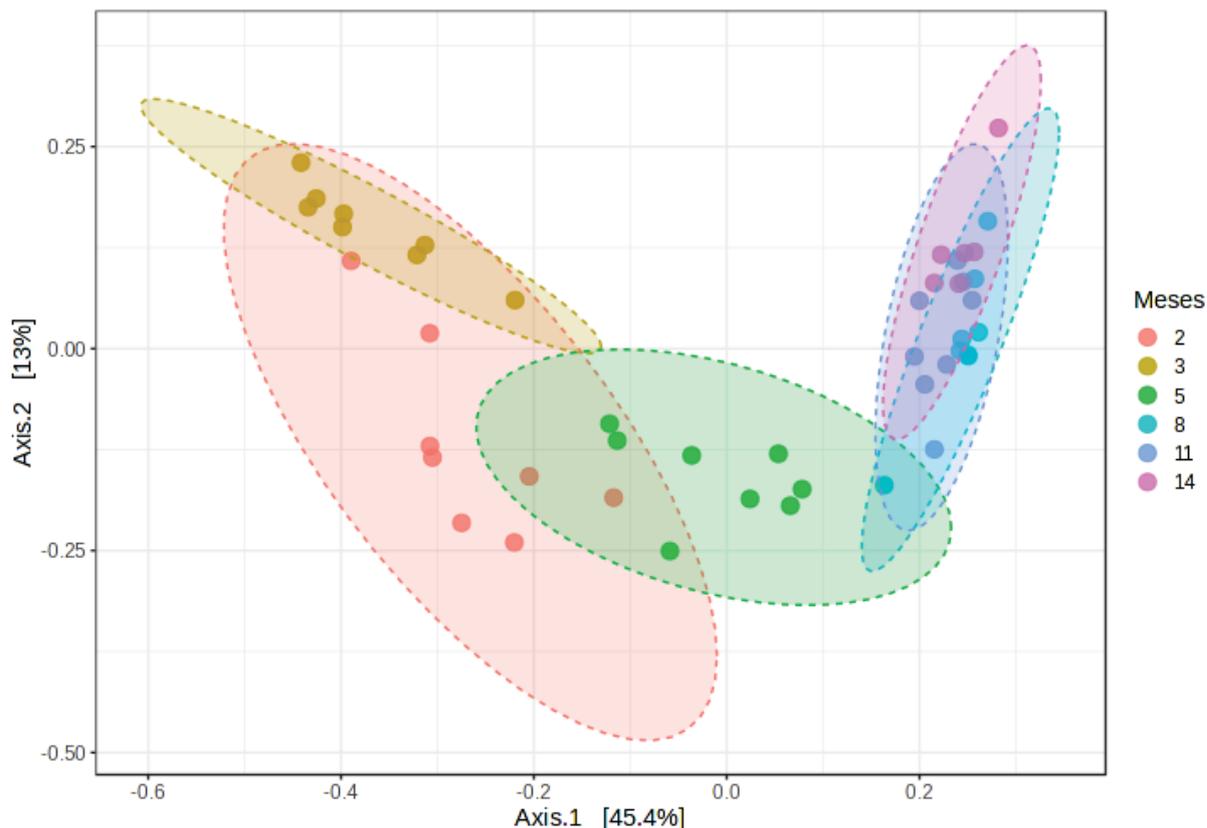
Item	Idade (meses)					EPM	P-L	P-Q
	2	5	8	11	14			
pH	6,5	6,6	6,8	6,7	6,4	0,07	0,993	0,916
<b>AGCC (µmol/g)</b>								
Acetato	63,4	76,4	176,1	142,0	135,0	8,21	<0,001	<0,001

Propionato	26,3	29,9	61,2	56,0	50,5	2,70	<0,001	<0,001
Butirato	7,9	9,1	15,1	12,8	13,0	0,53	<0,001	<0,001
AGCC total	97,6	112,0	242,9	210,8	198,5	10,90	<0,001	<0,001
Valerato	5,5	5,3	4,9	4,6	4,8	0,08	<0,001	0,177
<b>AGCR e voláteis (µmol/g)</b>								
Isovalerato	5,9	5,7	5,3	5,6	5,1	0,09	0,069	0,039
Isobutirato	5,8	5,6	5,9	5,6	5,2	0,07	0,019	0,044
AGCR total	11,7	11,3	11,2	11,4	10,3	0,23	<0,001	0,184
4-metilvalerato	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,01	0,067	0,165
Hexanóico	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,02	0,063	0,006
Heptanóico	5,6	5,3	4,7	4,5	4,2	0,09	<0,001	0,167
<b>Fenóis e indóis (% área de pico)</b>								
Fenol	1,0	3,2	1,0	0,9	2,0	0,28	0,76	0,83
Indol	2,6	11,4	19,1	23,1	15,5	1,56	<0,001	<0,001
P-cresol	1,7	2,3	6,8	4,2	8,9	0,61	<0,001	0,87
Amônia	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,01	0,097	0,413

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; AGCR: ácidos graxos de cadeia ramificada; EPM: erro padrão da média; P-L: probabilidade para efeito linear ( $P < 0,05$ ); P-Q: probabilidade para efeito quadrático ( $P < 0,05$ ).

A análise da beta-diversidade demonstrou diferenças gerais no perfil das comunidades bacterianas intestinais entre os meses 2, 3 e 5 e em comparação com 8, 11 e 14 meses ( $P < 0,05$ ). As comunidades bacterianas dos cães nos meses 8, 11 e 14 não diferiram entre si ( $P > 0,05$ , Figura 1).

Em relação a alfa diversidade, foi observado redução no índice de Chao1 e ASVs nos meses 3, 5, 8, 11 e 14 quando comparado aos 2 meses de idade ( $P < 0,05$ ,



**Figura 1:** Beta-diversidade por dissimilaridade de Bray-curtis ilustrando a diferenciação das comunidades bacterianas dos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade ( $P < 0,05$  por PERMANOVA).

Tabela 5). O índice de Shannon não apresentou diferença significativa entre as idades estudadas ( $P > 0,05$ , Tabela 5).

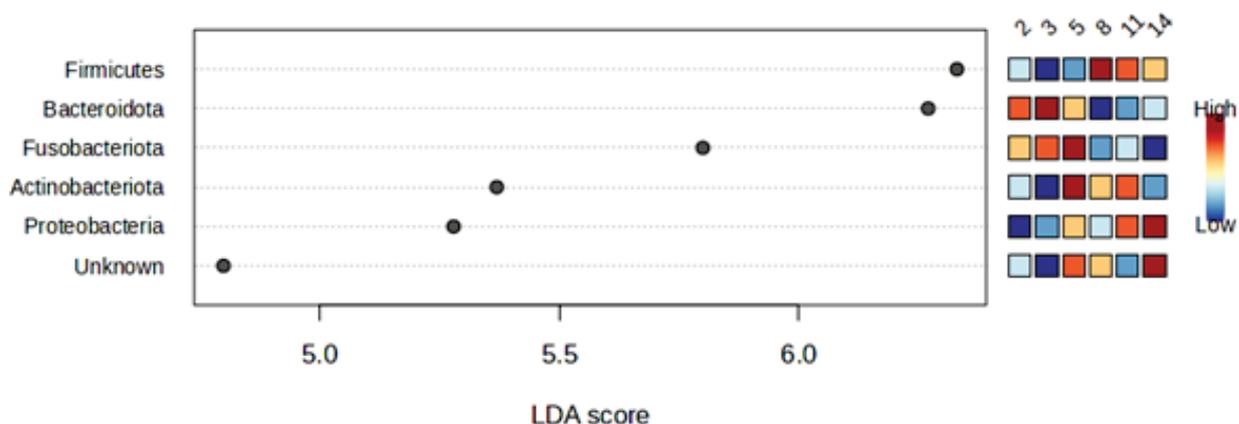
**Tabela 5:** Médias dos índices de alfa-diversidade (ASV's, Chao1 e Shannon) de cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.

Item	Idade (meses)						EPM	P-valor
	2	3	5	8	11	14		
Chao1	318,08 <sup>a</sup>	203,84 <sup>bc</sup>	222,39 <sup>b</sup>	200,51 <sup>bc</sup>	167,77 <sup>c</sup>	158,52 <sup>c</sup>	23,36	<0,001
ASVs	268,58 <sup>a</sup>	190,25 <sup>bc</sup>	200,82 <sup>b</sup>	198,71 <sup>bc</sup>	167,17 <sup>bc</sup>	157,68 <sup>c</sup>	15,94	<0,001
Shannon	3,77 <sup>a</sup>	3,79 <sup>a</sup>	3,68 <sup>a</sup>	3,77 <sup>a</sup>	3,66 <sup>a</sup>	3,59 <sup>a</sup>	0,03	0,680

EPM: erro padrão da média; P: probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

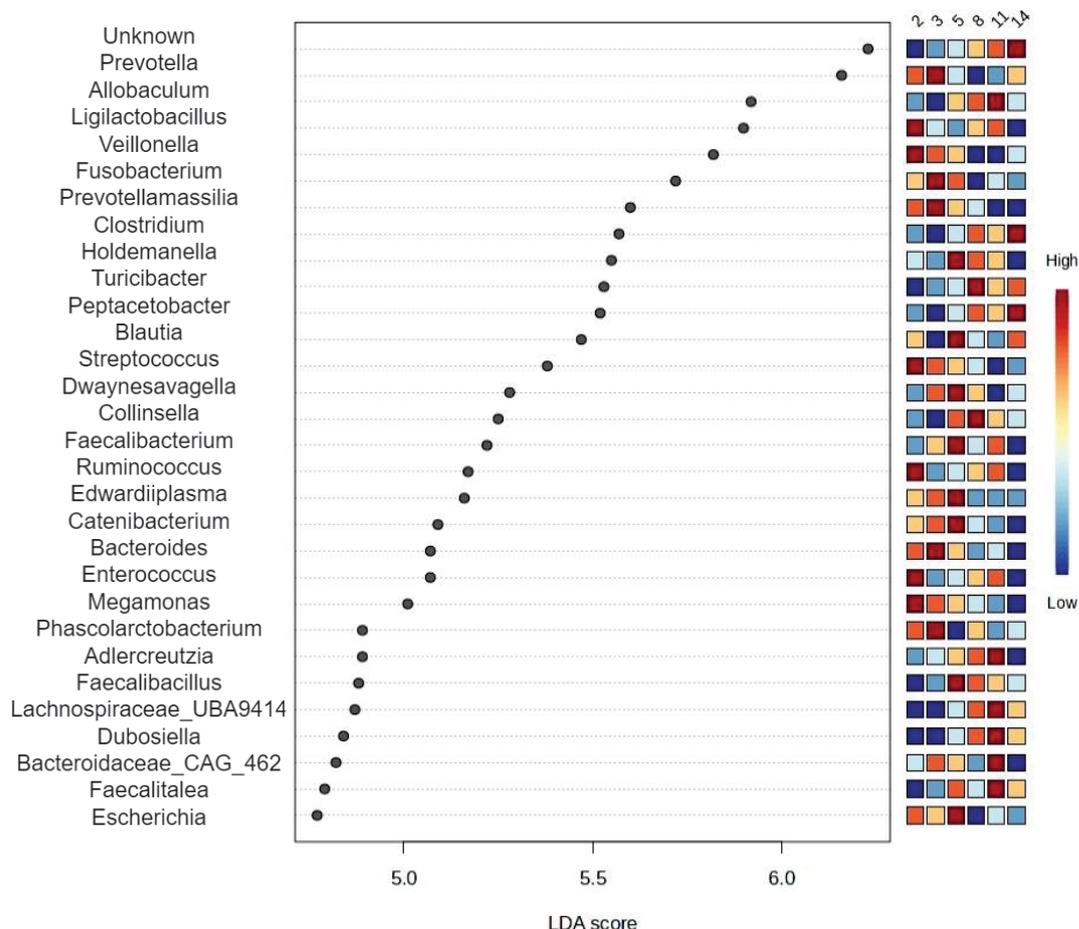
Os principais filos bacterianos encontrados nas fezes dos cães foram *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Fusobacteriota*, *Actinobacteriota* e *Proteobacteria* ( $P < 0,05$ , Figura 2). Dentre eles, os mais predominantes aos 2 e 3 meses de idade foram *Bacteroidota* e *Fusobacteriota*, e aos 5 meses de idade, *Fusobacteriota* e *Actinobacteriota* ( $P < 0,05$ , Figura 2). Já aos 8 meses de idade, o principal filo bacteriano encontrado foi *Firmicutes*; aos 11 meses de idade foram *Firmicutes*,

*Actinobacteriota* e *Proteobacteria*; e aos 14 meses de idade foram *Proteobacteria* e *Firmicutes* ( $P < 0,05$ , Figura 2).

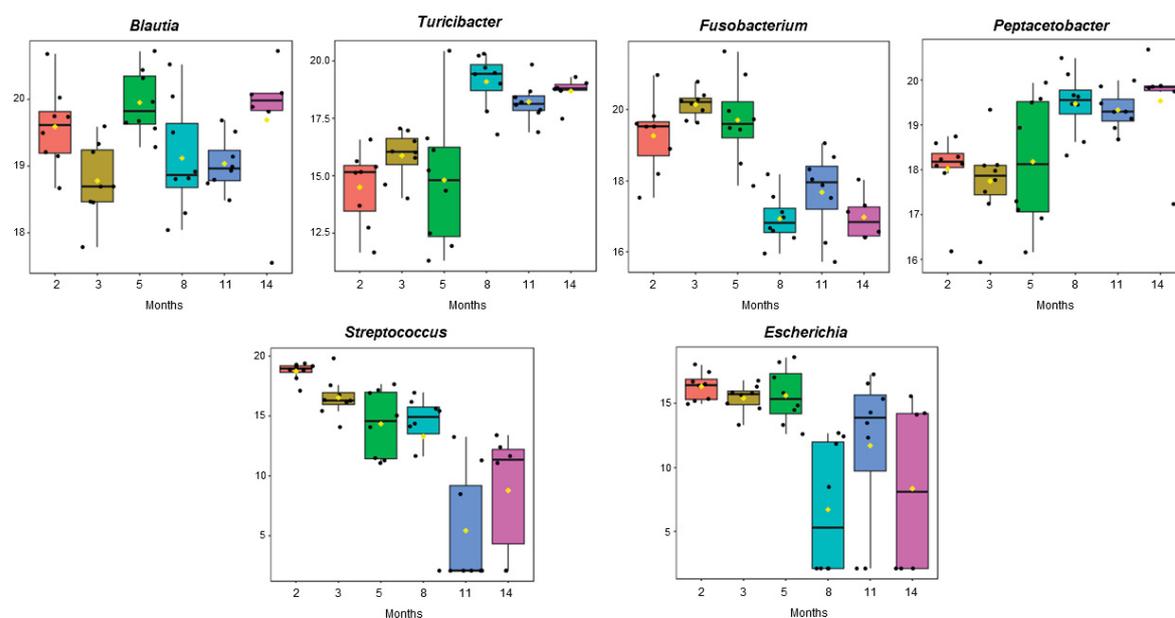


**Figura 2:** Filos bacterianos fecais enriquecidos nos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade. P ajustado  $< 0,05$  pelo teste LEfSe.

De modo geral, os resultados da LEfSe demonstraram que os gêneros mais abundantes nos cães com 2 a 5 meses de idade, em relação aos cães com 8 a 14 meses de idade foram, *Ligilactobacillus*, *Ruminococcus* e *Enterococcus* (2 meses); *Prevotella* (2 e 3 meses) e *Veilonella*, *Fusobacterium*, *Prevotellamassilia*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Edwardiiplasma*, *Catenibacterium*, *Megamonas* e *Escherichia* (2 a 5 meses) ( $P < 0,05$ , Figura 3). Em contrapartida, os gêneros mais abundantes nas fezes dos cães com 8 a 14 meses de idade, em relação aos mais novos, foram: *Allobaculum*, *Holdemanella*, *Collinsella*, *Adlercreutzia* e *Faecalibacillus* (8 e 11 meses); *Clostridium*, *Turicibacter*, *Peptacetobacter*, *Lachnospiraceae\_UBA9414* e *Dubosiella* (8 a 14 meses) e *Faecalitalea* (11 e 14 meses) ( $P < 0,05$ , Figura 3). A abundância de *Fusobacterium*, *Turicibacter*, *Escherichia*, *Blautia* e *Streptococcus* nas fezes dos cães com 2 a 14 meses de idade estão representadas na figura 4 ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3:** Principais gêneros bacterianos fecais enriquecidos nos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade. P ajustado <0,05 pelo teste LEfSe.



**Figure 4:** Abundância (log DNA) dos gêneros *Blautia*, *Turicibacter*, *Fusobacterium*, *Peptacetobacter*, *Streptococcus* e *Escherichia* nas fezes dos cães com 2, 3, 5, 8, 11 e 14 meses de idade.

## 3.2 Experimento 2

### 3.2.1 Digestibilidade e características fecais

Não foram observadas reações adversas às dietas, como episódios de vômito, diarreia ou recusa alimentar ao longo do estudo. A ingestão de MS, MO, PB, FDT, EEA e EM por  $\text{kg}^{0,75}/\text{dia}$  foi maior no grupo CF, quando comparada a ingestão dos cães CA ( $P < 0,05$ , Tabela 6). O CDA da MS, MO, PB e EB foi menor para os cães CF em relação ao CA ( $P < 0,05$ , Tabela 6). Em contrapartida, o CDA do EEA e EM não diferiu entre os grupos ( $P < 0,05$ , Tabela 6). A MSf e o escore fecal foram maiores e a produção fecal foi menor nos cães CA, em relação aos cães CF ( $P < 0,05$ , Tabela 6).

**Tabela 6:** Médias de ingestão, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), energia metabolizável e características fecais de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF).

Item	Grupos		EPM	P
	CA	CF		
<b>Ingestão em g na matéria seca/<math>\text{kg}^{0,75}/\text{dia}</math></b>				
Matéria seca	37,9	59,9	3,32	<0,001
Matéria orgânica	33,6	54,0	3,07	<0,001
Proteína bruta	9,1	14,7	0,83	<0,001
Extrato etéreo em hidrólise ácida	4,4	7,0	0,40	<0,001
Fibra dietética total	2,4	3,9	0,22	<0,001
Energia metabolizável (kcal)	127,7	196,4	13,20	<0,001
<b>CDA (%)</b>				
Matéria seca	67,5	65,7	0,34	0,003
Matéria orgânica	73	71,0	0,38	0,006
Proteína bruta	77,1	74,2	0,60	0,017
Extrato etéreo em hidrólise ácida	83,5	82,5	0,43	0,283
Energia bruta	73,7	71,7	0,44	0,017
<b>Energia metabolizável (kcal/kg)</b>	<b>3370,2</b>	<b>3279,1</b>	<b>18,60</b>	<b>0,190</b>
<b>Características fecais</b>				
Matéria seca (%)	35,5	33,1	0,51	0,012
Produção de fezes (g/cão/dia)	202	363,7	25,30	<0,001
Escore fecal	3,9	3,4	0,10	0,012

EPM: erro padrão da média; P: probabilidade pelo teste t-Student ( $P < 0,05$ )

### 3.2.2 Metabólitos de fermentação e microbiota fecal

A concentração de amônia fecal foi maior nos cães CF em comparação aos cães CA ( $P < 0,05$ , Tabela 7). Observou-se maior concentração fecal de butirato, isobutirato, ácidos valerato, hexanóico e heptanóico e AGCR totais nos cães CF em

comparação aos cães CA ( $P < 0,05$ , Tabela 7). No entanto, não houve diferença significativa no pH fecal, propionato, AGCC totais, isovalerato e 4-metilvalerato ( $P > 0,05$ , Tabela 7). Além disso, não foi observada diferença entre os grupos nas porcentagens das áreas de picos de fenóis, indóis e p-cresóis ( $P > 0,05$ , Tabela 7).

**Tabela 7:** Médias de pH e metabólitos de fermentação das fezes de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF).

Item	Grupos		EPM	P
	CA	CF		
pH	6,40	6,7	0,09	0,074
<b>AGCC (<math>\mu\text{mol/g}</math> de matéria seca)</b>				
Acetato	135,0	136,0	5,77	0,936
Propionato	50,5	46,6	1,98	0,351
Butirato	13,0	14,6	0,35	0,012
AGCC total	198,5	197,2	7,38	0,936
Valerato	4,8	6,2	0,25	0,001
<b>AGCR e voláteis (<math>\mu\text{mol/g}</math> de matéria seca)</b>				
Isovalerato	5,1	5,3	0,09	0,382
Isobutirato	5,2	5,7	0,08	0,002
AGCR total	10,3	11,0	0,01	0,106
4 metil valerato	0,6	0,6	0,04	0,009
Hexanóico	0,6	0,8	0,07	0,008
Heptanóico	4,2	4,6	0,24	0,005
<b>Fenóis e indóis (% área de pico)</b>				
Fenol	1,3	2,0	0,37	0,396
Indol	18,2	15,5	1,39	0,361
P-cresol	9,1	8,9	1,26	0,952
Amônia	0,1	0,2	0,02	0,021

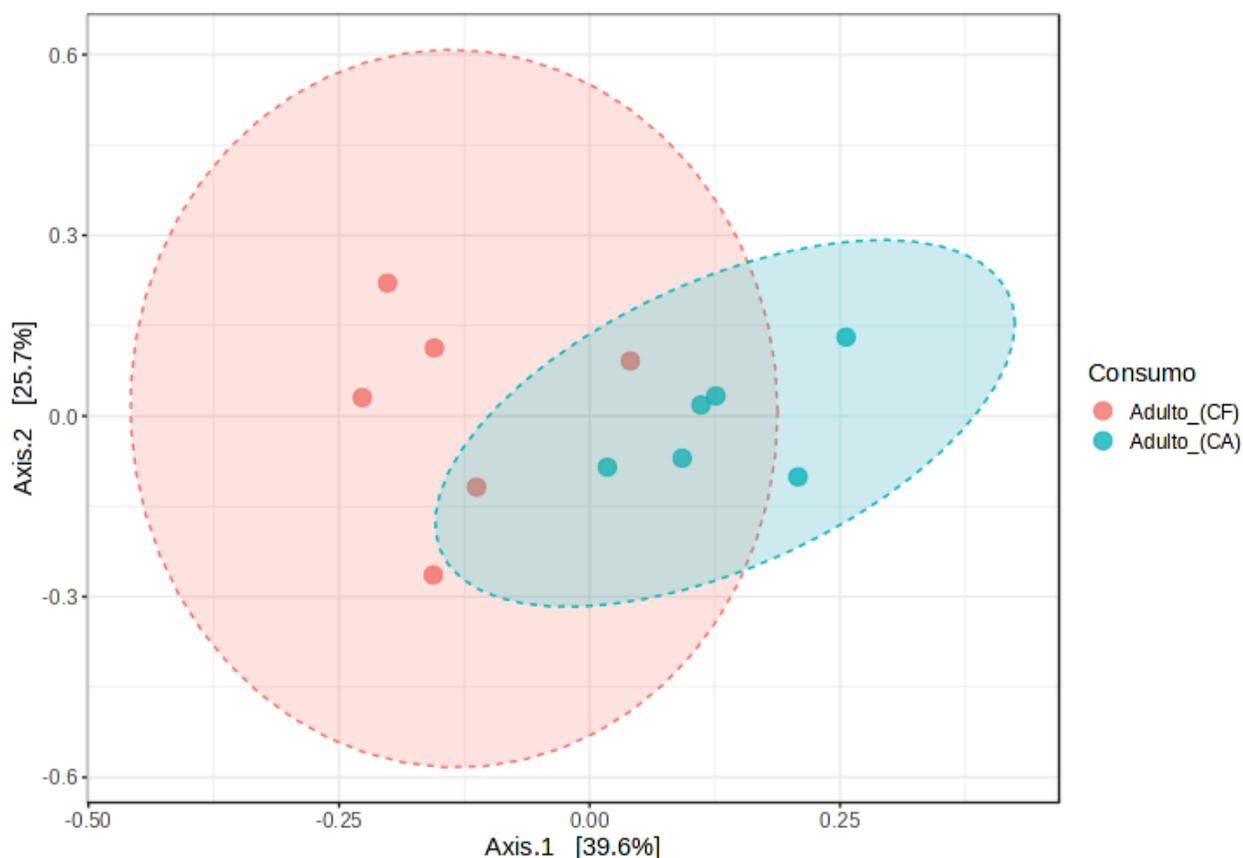
AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; AGCR: ácidos graxos de cadeia ramificada; EPM: erro padrão da média; P: probabilidade pelo teste t-Student.

A análise da beta-diversidade demonstrou diferenças gerais no perfil das comunidades bacterianas intestinais entre os grupos CF e CA ( $P < 0,05$ , Figura 5). Em relação à alfa-diversidade, o número de ASV's e os índices de Chao1 e Shannon foram maiores no grupo CF em comparação ao grupo CA ( $P < 0,05$ , Tabela 8). Não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos filos entre os grupos estudados ( $P > 0,05$ , Tabela 8).

**Tabela 8:** Médias dos índices de alfa-diversidade (ASV'S, Chao1 e Shannon) de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF).

Item	Grupos		EPM	P-valor
	CA	CF		
Chao1	152,09	185,03	6,75	0,003
ASVs	151,29	184,00	6,55	0,002
Shannon	3,35	3,69	0,06	0,001

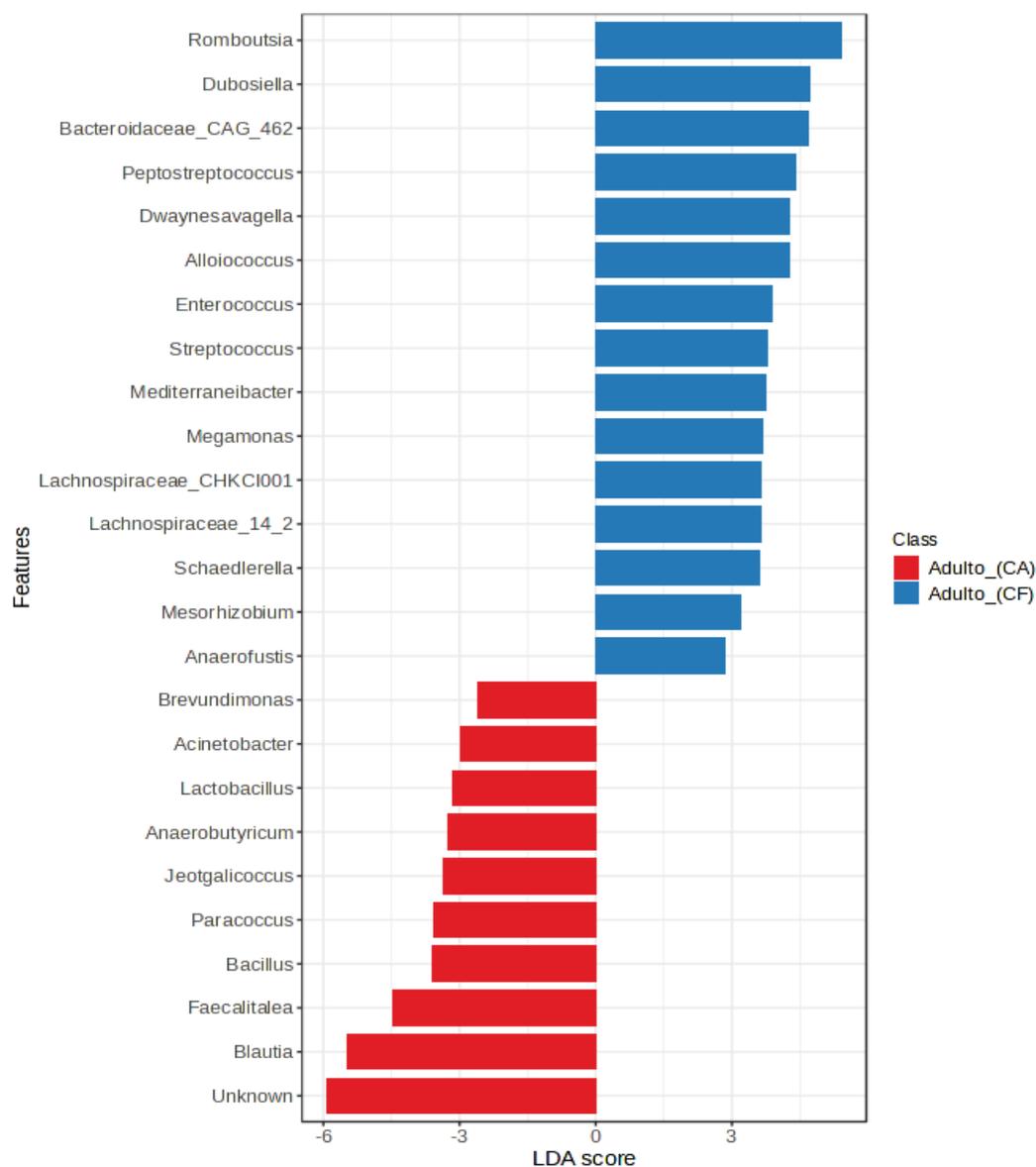
CA= consumo adequado; CF= consumo filhote; EPM: erro padrão da média; P: probabilidade pelo teste t-Student.



**Figura 5:** Beta-diversidade por dissimilaridade de Bray-curtis ilustrando a diferenciação das comunidades bacterianas dos cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF) ( $P < 0,05$  por PERMANOVA).

Os resultados da LEfSe demonstraram que os gêneros mais abundantes nas fezes dos cães do grupo CF foram *Romboutsia*, *Dubosiella*, *Bacteroidaceae\_CAG\_462*, *Peptostreptococcus*, *Dwaynesavagella*, *Alloiococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Mediterraneibacter*, *Megamonas*, *Lachnospiraceae\_CHKCI001*, *Lachnospiraceae\_14\_2*, *Schaedlerella*, *Mesorhizobium* e *Anaerofustis*, em relação ao CA ( $P < 0,05$ , Figura 6). Enquanto os gêneros mais abundantes no grupo CA foram *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*,

*Anaerobutyricum*, *Jeotgalicossu*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Faecalitalea* e *Blautia*, em relação ao CF ( $P < 0,05$ , Figura 6).



**Figura 6:** LDA score dos principais gêneros bacterianos que diferiram nas fezes de cães dos grupos consumo adulto (CA) e consumo filhote (CF).  $P$  ajustado  $< 0,05$  pelo teste LfSe.

#### 4. Discussão

O período de desenvolvimento dos cães é crítico para o estabelecimento da microbiota intestinal, a qual é importante para a funcionalidade do sistema gastrointestinal. No entanto, é perceptível a escassez de estudos que abordem a comparação da digestibilidade dos nutrientes, metabólitos de fermentação e microbioma intestinal entre cães adultos e filhotes, bem como o efeito do consumo

sobre esses parâmetros. Nesse cenário, o presente estudo evidenciou que a idade e o consumo podem afetar a digestibilidade das frações nutricionais da dieta, assim como os metabólitos de fermentação e o microbioma intestinal dos cães. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo longitudinal avaliando esses fatores juntos em cães durante a fase de crescimento.

Como esperado, os cães mais jovens apresentaram maior consumo por  $\text{kg}^{0,75}/\text{dia}$  de MS, MO, PB, FDT, EEA e EM, em relação aos adultos. Devido a esse maior consumo, foi realizado o experimento 2, para verificar se as diferenças observadas entre cães adultos e filhotes são devidas ao estágio fisiológico ou à ingestão de alimento. Nesse sentido, foi possível observar que provavelmente alguns resultados observados em filhotes foram influenciados pelo maior consumo e não apenas pela idade, como a menor MSf e pior consistência e maior produção fecal, os quais foram semelhantes entre cães filhotes e aos adultos no grupo CF. Cães em crescimento apresentam maior demanda energética e nutricional, que cães adultos. Quando um cão filhote atinge até 50% de seu peso corporal adulto, sua exigência calórica é aproximadamente 1,6 vezes superior àquela observada em cães adultos (FEDIAF, 2021).

Não foram encontrados estudos que comparassem a mesma faixa etária dos cães filhotes e adultos utilizados no presente estudo, mas a maioria dos autores que conduziram trabalhos semelhantes encontraram resultados divergentes, relatando nenhuma interferência da idade sobre os CDA das frações nutricionais ou maior digestibilidade da dieta em cães adultos (Lloid et al., 1995; Weber et al., 2002; Swanson et al., 2004). Por outro lado, estudos comparando o efeito do consumo sobre a digestibilidade das dietas em cães adultos, relataram menor digestibilidade da PB quanto maior o seu consumo (Nery et al., 2012; Hang et al., 2013; Herstad et al., 2017; Pinna et al., 2018; Jackson et al., 2018; Ephraim et al., 2020). Isso pode ser explicado pois a ingestão de maiores quantidades de PB pode ultrapassar a capacidade absorptiva do trato gastrointestinal dos cães, resultando na redução da digestibilidade (Hussein et al., 2000), como observado em cães mais jovens quando comparados aos mais velhos e em cães do grupo CF quando comparados aos do grupo CA. A menor digestibilidade da PB também foi observada em estudos que investigaram cães alimentados com dietas com altas concentrações proteicas, em relação às com menores concentrações (Nery et al., 2012; Hang et al., 2013; Herstad et al., 2017; Pinna et al., 2018; Jackson et al., 2018; Ephraim et al., 2020).

O maior CDA do EEA nos cães mais novos quando comparados aos cães mais velhos pode ter contribuído para a maior digestibilidade da MS e maior EM da dieta observadas nesse grupo. A maior digestibilidade aparente de lipídios observada em cães mais jovens pode ser atribuída à maior ingestão diária de EEA por  $\text{kg}^{0,75}/\text{dia}$ , que a de cães adultos (Sabchuk et al., 2019). Desse modo, ocorre menor participação relativa das perdas endógenas de lipídios, em relação ao consumido, no cálculo da digestibilidade aparente do EEA (Sabchuk et al., 2019). Esse fato também foi observado em outros estudos comparando a digestibilidade do EEA entre cães adultos e filhotes (Zanatta et al., 2011; Félix et al., 2013; Marx et al. 2017; Sabchuk., 2019). No entanto, no experimento 2, ao comparar duas quantidades de consumo, foi observado que não houve diferença no CDA do EEA e no conteúdo de EM da dieta. Isso indica que possivelmente a maior digestibilidade de lipídios é uma característica específica da digestão de filhotes, sendo independente dos níveis de consumo alimentar avaliados.

Em relação a digestibilidade dos nutrientes da dieta encontrados *in vitro*, observa-se que essa metodologia tende a superestimar os valores da digestibilidade *in vivo*. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que os ensaios *in vitro* pressupõem que todos os componentes solubilizados são potencialmente digestíveis e absorvíveis *in vivo*. No entanto, *in vivo*, nem todos os nutrientes solubilizados durante o ensaio *in vitro* serão efetivamente digeridos e absorvidos pelo organismo do animal (Hervera et al., 2007; Biagi et al., 2016). Para reduzir essa discrepância, utilizamos as equações para estimar os valores dos CDA *in vivo* a partir dos valores obtidos *in vitro*. Essas estimativas se aproximaram mais dos observados *in vivo*, demonstrando que o método *in vitro* pode ser um sistema alternativo para prever a digestibilidade dos nutrientes de uma dieta seca extrusada. Além disso, possui a vantagem de reduzir a necessidade da utilização de animais experimentais para esse tipo de análise (Hervera et al., 2007; Biagi et al., 2016).

A digestibilidade da dieta também pode afetar a modulação do microbioma intestinal dos cães nas fases de crescimento e adulta. O estabelecimento do microbioma intestinal começa logo no nascimento e continua a evoluir ao longo das diferentes fases da vida do cão (Guard, 2017; Garrigues et al., 2022). Com isso, as comunidades bacterianas continuam a diversificar-se após o desmame, substituindo bactérias importantes para a digestão do leite, por outras que desempenham papéis na digestão de dietas complexas (Garrigues et al., 2022).

No presente estudo, foi observada alteração da microbiota fecal dos cães ao longo do crescimento, a qual se estabilizou aos 8 meses de idade. O mesmo foi observado em outros estudos em cães em crescimento (Blake et al., 2020; Garrigues et al., 2022). Nos primeiros meses de vida, os filhotes apresentam microbiota intestinal imatura, característica de disbiose (Blake et al., 2020). Isso é evidenciado pelo aumento na abundância de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Streptococcus* e *Escherichia coli*, conforme observado em cães com até 5 meses de idade. Inclusive, a diminuição na abundância relativa de *E. coli* ao longo do crescimento pode ser indicativa da transição de um ambiente aeróbico para um ambiente suficientemente anaeróbico (Guard et al., 2017). A mudança para um ambiente intestinal anaeróbio contribui para o crescimento de bactérias associadas à eubiose, como *Turicibacter*, *Peptacetobacter* (*Clostridium hiranonis*) e *Blautia* (AlShawaqfeh et al., 2017), as quais aumentaram em cães a partir dos 8 meses de idade.

Essas diferenças no perfil da microbiota interferem no ambiente intestinal por diferentes mecanismos, sendo um deles pela modificação nos metabólitos de fermentação produzidos. A maior abundância fecal de bactérias proteolíticas, como o *Streptococcus* e *Escherichia coli* nos filhotes mais novos, pode ser relacionada às maiores concentrações de isobutirato, isovalerato, ácidos hexanóico e heptanóico e AGCR totais encontrados nas amostras fecais desse grupo. Esses compostos em altas concentrações podem ter efeitos inflamatórios para a mucosa intestinal e contribuem para o aumento do odor fecal (Windey et al., 2011). Ainda, o *Streptococcus* e a *E. coli*, além de estarem associados à disbiose intestinal (AlShawaqfeh et al., 2017), também estão presentes em maiores concentrações em cães com enteropatias crônicas (Vazquez-Baeza et al., 2016; Xu et al., 2016; White et al., 2017).

Além da maior concentração de metabólitos oriundos da fermentação de compostos nitrogenados, cães filhotes também apresentaram menor concentração fecal de AGCC. Esse resultado pode ser relacionado à menor abundância de bactérias produtoras de AGCC, como o *Turicibacter* e *Blautia*, observada em cães filhotes.

Maiores concentrações fecais de AGCC observadas em cães adultos podem ser positivamente associadas à saúde intestinal (Alshawaqfeh et al., 2017). Os AGCC contribuem com a eubiose da microbiota intestinal, atenuam a inflamação e o estresse oxidativo e participam do crescimento e da diferenciação celular normal (Vinolo et al., 2011; Tolhurst et al., 2012). O acetato, AGCC mais abundante, é importante para o

crescimento de bactérias associadas com a eubiose intestinal. Já, o butirato é considerado um dos metabólitos fermentativos mais importantes para a saúde intestinal, sendo a principal fonte de energia para os colonócitos e auxiliando no controle de processos inflamatórios no intestino (Chen e Vitetta, 2018; Zhong et al., 2019).

Ainda, foi observado aumento de indóis em cães mais velhos. Os indóis têm um papel importante na funcionalidade intestinal, como o fortalecimento da mucosa e a regulação negativa da expressão de citocinas pró-inflamatórias, sendo que seus efeitos positivos ou negativos dependem da sua concentração (Oliphant e Allen-Vercoe, 2019). Assim, parece que o aumento das concentrações de indóis nas fezes dos cães adultos está associado a efeitos positivos, uma vez que esses achados estão em consonância com o aumento observado nas bactérias relacionadas a eubiose e seus metabólitos.

Embora o *Fusobacterium* seja frequentemente associado à eubiose em cães (Alshawaqfeh et al., 2017), ele também é reconhecido como um gênero proteolítico (Louis e Flint, 2016). A redução de *Fusobacterium* em cães mais velhos pode estar associada à diminuição do consumo alimentar, que, por sua vez, resultou na maior digestibilidade da PB, como observado nos experimentos 1 e 2. Isso resulta em quantidade menor de substrato não digerido disponível no cólon (Ephraim et al., 2020), reduzindo a abundância de gêneros proteolíticos, incluindo o *Fusobacterium*.

Do mesmo modo, outros gêneros proteolíticos também reduziram nas fezes de cães adultos com menor consumo de PB kg<sup>0,75</sup>/dia (CA), quando comparado com o grupo com maior consumo (CF) no experimento 2, como *Peptostreptococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Assim como observado em filhotes, em relação aos adultos (Experimento 1), cães com maior consumo de PB no experimento 2 também apresentaram maiores concentrações fecais de metabólitos de fermentação nitrogenada, como amônia, isobutirato, ácidos hexanóico e heptanóico e AGCR totais. Curiosamente, houve também aumento da concentração fecal de butirato nesse grupo. Embora o butirato seja um metabólito associado à eubiose intestinal e à fermentação sacarolítica (Anshory et al., 2023), algumas bactérias proteolíticas específicas, como o *Fusobacterium*, também são capazes de produzir esse composto através das vias de degradação do glutamato e da lisina (Louis e Flint, 2016).

Cães adultos com menor consumo também apresentaram maior abundância de *Blautia* nas fezes. Como comentado anteriormente, esse gênero é conhecido por

produzir AGCC (Suchodolski et al., 2012; Alshawaqfeh et al., 2017; Félix et al., 2022). Apesar disso, não foi observado aumento de AGCC no grupo CA, o que provavelmente pode ser atribuído ao fato de que esses metabólitos são rapidamente absorvidos no lúmen intestinal, antes de atingir o cólon distal, o que pode reduzir sua concentração nas fezes (Strompfová et al., 2017, Lima et al., 2020).

Com base nos resultados observados, recomenda-se a utilização de fontes proteicas de alta digestibilidade, associadas à maior densidade calórica da dieta para cães em crescimento. Essa abordagem, além de favorecer à maior absorção de aminoácidos essenciais ao crescimento dos filhotes e reduzir a quantidade consumida de alimento, também pode contribuir para melhora da eubiose da microbiota e para a redução da produção de metabólitos com potencial tóxico para mucosa intestinal.

## 5. Conclusões

As necessidades energéticas dos cães variam ao longo do crescimento, influenciando a digestibilidade da dieta, devido ao maior consumo por quilo de peso metabólico por dia em cães mais jovens. Cães mais novos apresentaram maiores valores de CDA do EEA e EM, bem como menor CDA da PB quando comparados com cães mais velhos. Assim como cães do grupo CF apresentaram menor CDA da PB quando comparados aos cães do grupo CA. A partir de aproximadamente 8 meses de idade, a microbiota dos cães assemelha-se à encontrada em adultos saudáveis, mantendo-se estável na idade adulta, visto que apresentam maior abundância de gêneros relacionados à eubiose intestinal e maiores concentrações de AGCC. Em contraste, cães mais novos apresentam abundância reduzida de gêneros relacionados à eubiose intestinal e maiores concentrações de AGCR. Esses resultados permitem estabelecer estratégias de manejo nutricional para otimizar a digestibilidade e a funcionalidade intestinal em cães ao longo de seu desenvolvimento. Ainda, ao usar equações para estimar os CDA *in vivo* a partir de dados *in vitro*, as estimativas se aproximaram dos valores *in vivo*, sugerindo que o método *in vitro* é uma alternativa viável para prever a digestibilidade de dietas secas extrusadas.

## 6. Referências

ALSHAWAQFEH, M. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 11 out. 2017.

ANSHORY, M. et al. Butyrate Properties in Immune-Related Diseases: Friend or Foe? *Fermentation*, v. 9, n. 3, p. 205, 21 fev. 2023.

Association of American Feed Control Officials, 2016. Dog and Cat Nutrient Profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA.

Association of the official Analytical Chemists, 1995. Official Methods of Analysis, Sixteenth ed. AOAC, Washington, D.C., USA.

BLAKE, A. B. et al. Developmental stages in microbiota, bile acids, and clostridial species in healthy puppies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 6, p. 2345–2356, 2020.

BIAGI, G. et al. A new *in vitro* method to evaluate digestibility of commercial diets for dogs. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 617–625, 26 ago. 2016.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 11 abr. 2010.

CARCIOFI, A. C. et al. Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, n. 3-4, p. 251–260, maio 2009.

CHEN, J.; VITETTA, L. Inflammation-Modulating Effect of Butyrate in the Prevention of Colon Cancer by Dietary Fiber. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 17, n. 3, p. e541–e544, set. 2018.

DE BRITO, C.B.M et al. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 3-4, p. 150–155, 1 ago. 2010.

DEGNAN, P. H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME Journal**, v. 6, n. 1, p. 183–194, 16 jun. 2011.

DOMINGUES, L. et al. Effect of potato on kibble characteristics and diet digestibility and palatability to adult dogs and puppies. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 292–300, 2 jan. 2019.

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. 517, 12 ago. 2020.

FEDIAF. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. **European Pet Food Industry**, 2021.

FÉLIX, A. P. et al. Digestibility and metabolizable energy of raw soybeans manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2794–2801, 1 jun. 2013.

FÉLIX, A. P.; SOUZA, C. M. M.; DE OLIVEIRA, S. G. Biomarkers of gastrointestinal functionality in dogs: A systematic review and meta-analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 283, p. 115183, jan. 2022.

GARRIGUES, Q. et al. Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2 set. 2022.

GONZÁLEZ, F. J. Efeitos de aditivos com ação prebiótica utilizados em alimentos extrusados para gatos: uma abordagem in vitro. 2023. Tese (Doutorado em [Clínica Veterinária]) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

GUARD, B. C. et al. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175718, 27 abr. 2017.

HANG, I. et al. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 201, 9 out. 2013.

HERSTAD, K. M. V. et al. A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, 30 maio 2017.

HERVERA, M. et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 5-6, p. 205–209, jun. 2007.

HERVERA, M. et al. Prediction of digestible protein content of dry extruded dog foods: comparison of methods. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 3, p. 366–372, jun. 2009.

HUSSEIN, H. S.; SUNVOLD, G. D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: **Recent advances in canine and feline nutrition: 2000 Iams Nutrition Symposium Proceedings**. Wilmington, Ohio: Orange Frazer Press, 2000. p. 153-168.

JACKSON, M. I.; JEWELL, D. E. Balance of saccharolysis and proteolysis underpins improvements in stool quality induced by adding a fiber bundle containing bound polyphenols to either hydrolyzed meat or grain-rich foods. **Gut Microbes**, v. 10, n. 3, p. 298–320, 30 out. 2018.

KARA, K. Determination of the in vitro digestibility and nutrient content of commercial premium extruded foods with different types of protein content for adult dogs. **Veterinární Medicina**, v. 65, n. No. 6, p. 233–249, 26 jun. 2020.

LAFLAMME D. Developmental and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice*, 22(4), 10-15, 1997.

LI, M. et al. Effects of alpha-lipoic acid on the growth performance and serum biochemical index values of puppies. **Animal feed science and technology**, p. 116009–116009, 1 maio 2024.

LIMA, D. C. et al. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis* C-3102 improves gut health indicators and fecal microbiota of dogs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, p. 114672, dez. 2020.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29–41, 8 dez. 2016.

MAJECKA, Katarzyna et al. Behavioural outcomes of housing for domestic dog puppies (*Canis lupus familiaris*). **Applied animal behaviour science**, v. 222, p. 104899, 2020.

MARX, F. R. et al. Endogenous fat loss and true total tract digestibility of poultry fat in adult dogs<sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 7, p. 2928–2935, 1 jul. 2017.

National Research Council, 2006. Nutrient Requirements of Dogs. NRC, National Academy Press, Washington, DC, USA.

NERY, J. et al. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance<sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 8, p. 2570–2580, 1 ago. 2012.

OLIPHANT, K.; ALLEN-VERCOE, E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. **Microbiome**, v. 7, n. 1, 13 jun. 2019.

PARKS, D. H. et al. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. **Nucleic Acids Research**, 14 set. 2021.

PENAZZI, L. et al. In vivo and in vitro Digestibility of an Extruded Complete Dog Food Containing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Meal as Protein Source. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 11 jun. 2021.

PINNA, C. et al. Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative end-products, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 20 mar. 2018.

PROSKY, L. et al. Determination of Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods and Food Products: Interlaboratory Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 71, n. 5, p. 1017–1023, 1 set. 1988.

RAMOS, T. A. et al. IMPACTO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÃES E DIGESTIBILIDADE DA DIETA EM CANIL EXPERIMENTAL. **Archives of Veterinary Science**, v. 25, n. 3, 25 set. 2020.

SABCHUK, T. T. et al. Endogenous fat losses and true and apparent fat digestibility in adult and growing dogs fed diets containing poultry offal fat. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 1927–1937, 10 dez. 2019.

SALT, Carina et al. Growth standard charts for monitoring bodyweight in dogs of different sizes. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0182064, 2017.

STROMPFOVÁ, V.; KUBAŠOVÁ, I.; LAUKOVÁ, A. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 16, p. 6309–6319, 18 jul. 2017.

SUCHODOLSKI, J. S. et al. The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51907, 26 dez. 2012.

SWANSON, K. S. et al. Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 6, p. 1713–1724, 1 jun. 2004.

TOLHURST, G. et al. Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein-Coupled Receptor FFAR2. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 364–371, 21 dez. 2011.

VÁZQUEZ-BAEZA, Y. et al. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 12, 3 out. 2016.

VINOLO, Marco AR et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 858-876, 2011.

WEBER, M. et al. Influence of age and body size on gastrointestinal transit time of radiopaque markers in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 5, p. 677–682, 1 maio 2002.

WHITE, R. et al. Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 8, n. 5, p. 451–466, 5 jul. 2017.

WINDEY, K.; DE PRETER, V.; VERBEKE, K. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 1, p. 184–196, 25 nov. 2011.

XU, J. et al. Does canine inflammatory bowel disease influence gut microbial profile and host metabolism? **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, 16 jun. 2016.

YANG, K. et al. Gallnut Tannic Acid Exerts Anti-stress Effects on Stress-Induced Inflammatory Response, Dysbiotic Gut Microbiota, and Alterations of Serum Metabolic Profile in Beagle Dogs. v. 9, 27 abr. 2022.

ZANATTA, C. P. et al. Digestibility of dry extruded food in adult dogs and puppies. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 784–787, jun. 2011.

ZHONG, X. et al. Microbial-Driven Butyrate Regulates Jejunal Homeostasis in Piglets During the Weaning Stage. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 18 jan. 2019.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 035/2022, referente ao projeto de pesquisa “**Efeito da idade e do método de avaliação (in vivo e in vitro) sobre a digestibilidade dos nutrientes e energia metabolizável da dieta e produtos de fermentação intestinal em cães em crescimento**”, sob a responsabilidade de **Ananda Portella Félix**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em 02/09/2022.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	Setembro/2022 até Dezembro/2022
Espécie/Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i> (canino)
Número de animais	8
Peso/Idade	4,25kg a 4,78kg/3 meses
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Laboratório de Estudos em Nutrição Canina da UFPR em Curitiba, Paraná, Brasil

\*A autorização para início da pesquisa se torna válida a partir da data de emissão deste certificado.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol number 035/2022, regarding the research program “**Effect of age and method of evaluation (in vivo and in vitro) on nutrient digestibility and metabolizable energy of diet and intestinal fermentation products in growing dogs**” under **Ananda Portella Félix** – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, on 2022, September 2nd.

Purpose	Pesquisa
Validity	2022 September until 2022 December
Specie/Line	<i>Canis lupus familiaris</i> (canine)
Number of animals	8
Weight/Age	From 9.37lb up to 10.54lb /3 months old
Sex	Male and female
Origin	Laboratory of Studies in Canine Nutrition of UFPR in Curitiba, Paraná, Brazil

\*The authorization to start the research becomes valid from the date of issue of this certificate.

Curitiba, 02 de setembro de 2022

Documento assinado digitalmente  
ALEX MAIORKA  
Data: 13/09/2022 16:39:14 -0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Alex Maiorka  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
AG - UFPR



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OFÍCIO Nº 004/2023

**Para: Ananda Portella Félix**

**Assunto: Protocolo 035/2022**

Prezado(a) pesquisador(a),

Após avaliação do pedido sobre o projeto/aula sob sua responsabilidade, de protocolo número 035/2022 intitulado **“Efeito da idade e do método de avaliação (in vivo e in vitro) sobre a digestibilidade dos nutrientes e energia metabolizável da dieta e produtos de fermentação intestinal em cães em crescimento”**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR, concordou-se em ampliar a faixa etária dos animais da pesquisa para 9 a 12 meses de idade, bem como prorrogação do prazo do projeto para junho de 2023 para realizar a pesquisa com a faixa etária ampliada.

Curitiba, 08 de março de 2023.

Documento assinado digitalmente  
 ALEX MAIORKA  
Data: 14/03/2023 11:10:39-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Alex Maiorka

**Coordenador**

**Comissão de Ética no Uso de Animais**

**AG - UFPR**