

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INGESTÃO DE EXTRATO DE MALTE SOBRE A MICROBIOTA FECAL DE CÃES ADULTOS SAUDÁVEIS

Vanessa Ayumi Ochamoto

Thiago Henrique Annibale Vendramini

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

van_ayumi@usp.br

Objetivos

O extrato de malte é um ingrediente utilizado comumente na nutrição humana para a produção de diversos alimentos. A análise química deste produto, derivado de grãos de cevada, demonstrou características relevantes para a nutrição, tais como concentrações de aminoácidos, vitaminas e minerais, além de propriedades palatáveis, constituintes antioxidantes e prebióticos, podendo proporcionar benefícios à saúde animal. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de 1,0% de extrato de malte na matéria natural de alimento seco extrusado em parâmetros de microbiota fecal em cães adultos saudáveis.

Métodos e Procedimentos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) sob o protocolo nº 54991 60221, sendo desenvolvido no Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet) pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP. Foram selecionados 12 cães (6 beagles e 6 cocker spaniel inglês) com peso corporal (PC) médio de $13,45 \pm 1,76$ kg, machos e fêmeas, hípidos, castrados, adultos, com idade média de 2,0 anos, escore de condição corporal (ECC) ideal ($5,25 \pm 0,44$), considerando-se a escala de 9 pontos descrita por Laflamme (1997) e escore de massa muscular ideal (3) de acordo com a escala de 4

pontos descrita por Michel et al. (2011). O delineamento experimental empregado foi o *crossover* 2x2 e os cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos conforme o alimento fornecido. Os alimentos experimentais consistiam em Alimento Controle (AC) sem adição de extrato de malte e Alimento Malte (AM) com adição de 1,0% de extrato de malte, calculados pela fórmula [Necessidade energética de manutenção (NEM) = $110 \times PC^{0,75}$] conforme a FEDIAF (2021). As amostras fecais foram obtidas por meio de coleta de fezes estéreis para análise da microbiota fecal, sendo a determinação da população de bactérias realizada através do sequenciamento do sistema Illumina MiniSeq de nova geração. A extração do DNA total foi feita por meio do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ e as reações de PCR foram amplificadas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler. A reação de indexação foi executada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). As bibliotecas geradas foram purificadas utilizando *bead* magnética e quantificada por meio de PCR em Tempo Real, gerando um pool equimolar de DNA que foi sequenciado. A bioinformática da microbiota fecal foi realizada com QIIME 2 2021.4 e todas as variantes de sequência de amplicom (ASVs) foram alinhadas com *mafft*. As métricas de diversidade alfa e beta foram estimadas usando diversidade q2 e a taxonomia dos ASVs por meio do classificador de características q2 e *Bayes naïve classify-sklearn*. A análise estatística foi realizada com o PROC MIXED do SAS, verificada pelos testes de Shapiro-Wilk e Levine. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Não foram observadas diferenças entre tratamentos para alfa ($p=0,133$) e beta-diversidade ($p=0,097$) referente à abundância de bactérias através do índice de diversidade filogenética de Faith (*Faith's phylogenetic diversity index*), de modo que a alfa representa o número e a abundância de espécies encontradas na amostra e a beta refere-se a diferença na composição das espécies. Além disso, não foi encontrada diferença para alfa-uniformidade da microbiota (*Pielou's evenness index*) ($p=0,326$), refletindo a homogeneidade da distribuição de abundância das espécies nas amostras. Em relação à taxonomia, foram identificados 7 filos, 15 classes, 40 famílias e 69 gêneros distintos entre os grupos experimentais. O filo predominante para ambos os grupos foi o Firmicutes ($p>0,0001$), sendo a média deste maior para o tratamento AM. Constatou-se diferença para os grupos bacterianos pertencentes ao *cluster Clostridium XIVa* e gênero *Faecalibacterium* ($p<0,0001$), sendo bactérias que desempenham a produção de ácidos graxos de cadeia curta e que apresentam médias maiores no tratamento AM, além disso, foi notado redução do gênero *Bifidobacterium* ($p<0,0001$) para o mesmo tratamento.

Conclusões

O presente estudo possibilitou verificar o potencial benéfico da inclusão de 1% de extrato de malte no alimento seco extrusado na dieta de cães adultos saudáveis, modulando a microbiota fecal, aumentando a abundância de bactérias *cluster Clostridium XIVa* e gênero *Faecalibacterium*, desempenhando efeito prebiótico.

Referências Bibliográficas

FEDIAF. Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. Brussels: Fédération Européenne de l'Industrie des Aliments pour Animaux Familiers, 2021.

LAFLAMME, D. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice*, v. 22, p. 10–15, 1997.

MICHEL, K. E. et al. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy x-ray absorptiometry. *British Journal of Nutrition*, v. 106, p. 57-59, 2011.

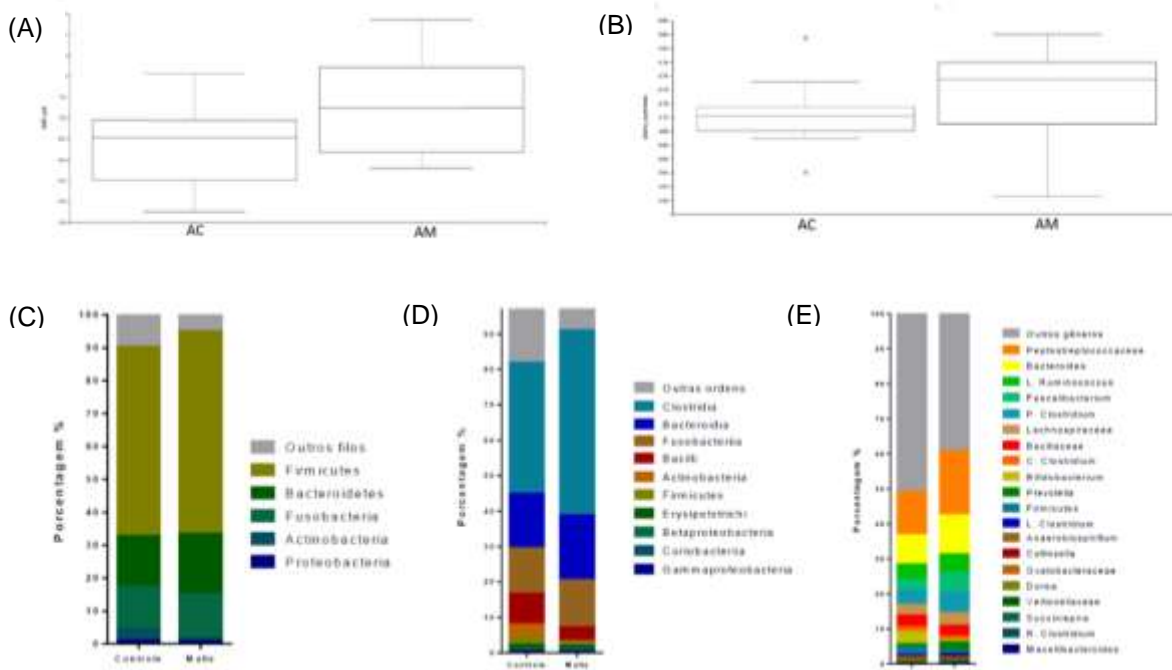


Figura 1 - Análise da microbiota fecal conforme o índice de diversidade filogenética de Faith (A), índice de uniformidade de Pielou (B), distribuição dos filos bacterianos (C), das classes bacterianas (D) e dos gêneros bacterianos (E) entre os grupos experimentais controle (AC) e malte (AM).

EVALUATION OF THE EFFECTS OF MALT EXTRACT INGESTION ON THE FECAL MICROBIOTA OF HEALTHY ADULT DOGS

Vanessa Ayumi Ochamoto

Thiago Henrique Annibale Vendramini

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

van_ayumi@usp.br

Objectives

Malt extract is an ingredient commonly used in human nutrition for the production of different foods. The chemical analysis of this product, derived from barley grains, showed relevant characteristics for nutrition, such as concentrations of amino acids, vitamins and minerals, in addition to palatable properties, antioxidant and prebiotic constituents, which may provide benefits to animal health. In view of the above, the objective of this study was to evaluate the effect of the inclusion of 1.0% malt extract in the natural matter of extruded dry food on fecal microbiota parameters in healthy adult dogs.

Methods and Procedures

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics of the University of São Paulo (FMVZ/USP) under protocol n° 54991 60221, being developed at the Center for Research in Dog Nutrology and Cats (CEPEN Pet) belonging to the Department of Nutrition and Animal Production at FMVZ/USP. Twelve dogs were selected (6 beagles and 6 English cocker spaniels) with a mean body weight (BW) of 13.45 ± 1.76 kg, males and females, healthy, neutered, adults, with a mean age of 2.0 years, of ideal body condition (BCS) (5.25 ± 0.44), considering the 9-point scale described by Laflamme (1997) and ideal muscle mass score (3) according to the 4-point scale described by Michel et al. (2011). The experimental design used was a crossover 2x2

the dogs were randomly divided into two groups according to the food provided. The experimental foods consisted of Control Food (CA) without the addition of malt extract and Malt Food (AM) with the addition of 1.0% of malt extract, calculated by the formula [Maintenance energy requirement (NEM) = $110 \times BW^{0.75}$] according to FEDIAF (2021). Fecal samples were obtained by collecting sterile feces for analysis of the fecal microbiota, and the determination of the bacterial population was performed by sequencing the new generation Illumina MiniSeq System. Total DNA extraction was performed using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ and the PCR reactions were amplified in a Veriti™ Thermal Cycler thermocycler. The indexing reaction was performed following the protocol of the Nextera XT Index kit (Illumina). The generated libraries were purified using *bead* and quantified by Real Time PCR, generating an equimolar pool of DNA that was sequenced. Fecal microbiota bioinformatics was performed with QIIME 2 2021.4 and all amplicon sequence variants (ASVs) were aligned with *mafft*. The alpha and beta diversity metrics were estimated using *q2* diversity and the taxonomy of the ASVs through the *q2* feature classifier and *Bayes naïve classify-sklearn*. Statistical analysis was performed using the SAS PROC MIXED, verified by the Shapiro-Wilk and Levine tests. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

No differences were observed between treatments for alpha ($p=0.133$) and beta-

diversity ($p=0.097$) regarding the abundance of bacteria through Faith's phylogenetic diversity index, so that alpha represents the number and abundance of species found in the sample and beta refers to the difference in species composition. Furthermore, no difference was found for microbiota alpha-uniformity (Pielou's evenness index) ($p=0.326$), reflecting the homogeneity of the abundance distribution of species in the samples. Regarding taxonomy, 7 phyla, 15 classes, 40 families and 69 genera were identified among the experimental groups. The predominant phylum for both groups was Firmicutes ($p>0.0001$), the mean being higher for the AM treatment. There was a difference for the bacterial groups belonging to the *Clostridium* XIVa cluster and the *Faecalibacterium* genus ($p<0.0001$), being bacteria that perform the production of short-chain fatty acids and that present higher averages in the AM treatment. reduction of the genus *Bifidobacterium* ($p<0.0001$) for the same treatment.

Conclusions

The present study made it possible to verify the beneficial potential of the inclusion of 1% malt extract in the extruded dry food in the diet of healthy adult dogs, modulating the fecal microbiota, increasing the abundance of *Clostridium* XIVa cluster bacteria and *Faecalibacterium* genus, performing prebiotic effect.

References

FEDIAF. Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. Brussels: Federation Européenne de l'Industrie des Aliments pour Animaux Familiers, 2021.

LAFLAMME, D. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice*, v. 22, p. 10–15, 1997.

MICHEL, K.E et al. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy x-ray absorptiometry. *British Journal of Nutrition*, v. 106, p. 57-59, 2011.

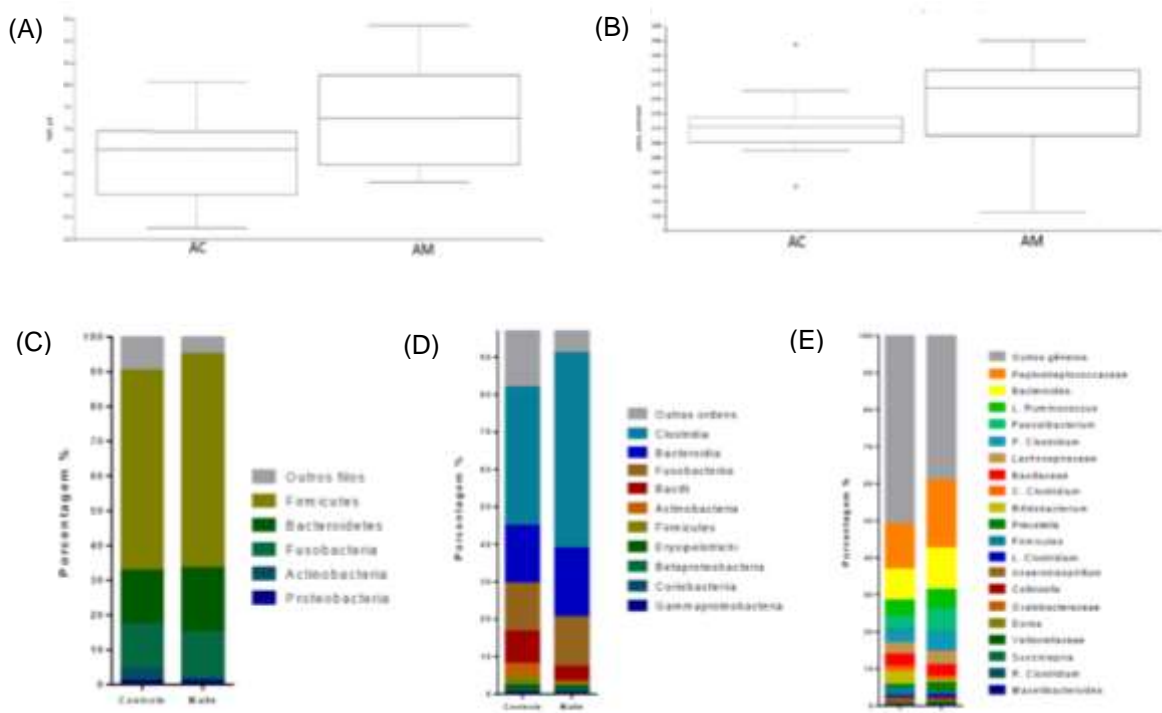


Figure 1 - Analysis of fecal microbiota according to Faith's phylogenetic diversity index (A), Pielou's uniformity index (B), distribution of bacterial phyla (C), bacterial classes (D) and bacterial genera (E) between the control (AC) and malt (AM) experimental groups.