



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Cambios en la microbiota fecal de perros adultos sanos
alimentados con dietas de diferente valor nutricional**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Karina Elizabeth Cosío Carpintero

Asesora:

Lilia Gutiérrez Olvera

(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)

Comité tutor:

Claudia Cecilia Márquez Mota

(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)

María Esther Ortega Cerrilla

(Colegio de Posgraduados)

Ciudad Universitaria, CD.MX, Febrero 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mi tío Juan, que ahora cuida de mí desde otro lugar. Seguimos creciendo, como siempre quisiste.

A mi mamá, por estar y animarme, por haberme facilitado llegar hasta aquí

A mi "Pali" que ahora está en un mejor lugar, gran parte de este sueño fue por ti.

Agradezco también a mis amigos de vida, Alan, Alex, Angie, Luigi, Norma, Tati. Que estos años han sido mi gran soporte ante las adversidades y dificultades surgidas

Agradecimientos

A mi amada Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, mi segundo hogar.

Al departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, que facilitó este arduo trabajo

A mi asesora Dra. Lilia Gutiérrez, por su paciencia y consejos.

Al Dr. Carlos Gutiérrez, ¡por ser mi coach siempre!

A la Dra. Claudia Márquez, por recibirme con tanto entusiasmo, por ser una excelente docente e investigadora y saber ser una gran líder.

A la Dra. María Esther Ortega, por sus consejos, correcciones y palabras,

A la Dra. Guadalupe Sánchez, sin usted mucho de esto no sería posible, por su entrega y paciencia, por estar.

Al QA Juan Carlos Oregel y al QA José Talamantes por el apoyo técnico en el laboratorio de Bromatología.

A PURINA PROPLAN® por el apoyo con parte del alimento y complementos empleados en el experimental.

A Conacyt por el apoyo económico y que contribuyó en gran medida al desarrollo del proyecto, con el CVU 492310.

Resumen

Muchas de las dietas comerciales para perros, en la actualidad, seleccionan los ingredientes no solo para cubrir las necesidades del individuo, sino también para mantener un equilibrio nutrición/microbioma/salud; se sabe que la fibra y la calidad de la proteína son uno de los factores más importantes en este equilibrio. En esta misma línea de conceptos, dietas altas en proteína de baja digestibilidad suelen favorecer a microorganismos que al fermentar aminoácidos generan sustancias que inducen inflamación que se encuentra comúnmente relacionada a colitis; mientras que la proteína de alta digestibilidad y fibra fermentable, se han relacionado a bacterias benéficas para el individuo. El objetivo del estudio fue identificar los cambios en la abundancia relativa de microorganismos específicos (*Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarum*, *Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium varium*) mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), asociados a dos dietas de diferente calidad y digestibilidad. Se emplearon 20 perros adultos, divididos en dos grupos, el primero alimentado con una dieta de alta digestibilidad (n=10), el segundo con una dieta de baja digestibilidad (n=10). Posterior a 3 días de adaptación a la dieta se tomaron muestras fecales a nivel de colon al día 15 y 30. Los resultados mostraron que la dieta de alta calidad promueve un aumento transitorio (15 días) en la abundancia relativa *F. varium* y *E. faecium*, así como un aumento persistente hasta el día 30 de *L. salivarum* y *B. fragilis*. Como en muchos estudios de este tema, resulta cada vez más evidente que la forma en la que los nutrientes afectan la microbiota intestinal, difiere entre individuos y el organismo siempre busca un equilibrio, dado lo cual, en la mayoría de los casos no se han logrado establecer patrones claros para un perfil dietético ideal.

Palabras clave: perro, microbiota, dieta, calidad, digestibilidad

Abstract

Nowadays, many commercial dog diets select the ingredients not only to meet the needs of the individual and maintain a balance between nutrition/microbiome/health; fiber and protein quality are known to be one of the most important factors in this balance. Diets high in low digestible protein tend to favor microorganisms that when fermenting amino acids generate substances that induce inflammation, while high digestible protein and fermentable fiber have been related to beneficial bacteria. The study's objective was to identify changes in the relative abundance of specific microorganisms (*Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius*, *Bacteroides fragilis* and *Fusobacterium varium*) by PCR (polymerase chain reaction), associated with two diets of different quality and digestibility. Twenty adult dogs were used, divided into two groups, the first one fed with a high digestibility diet (HD) (n=10), the second one with a low digestibility diet (LD) (n=10). After 3 days of adaptation to the diet, fecal samples were taken at day 15 and 30. The results showed that the high-quality diet promotes a transient increase (15 days) in the relative abundance of *F. varium* and *E. faecium*, as well as a persistent increase until day 30 of *L. salivarius* and *B. fragilis*. As in many studies on this subject, it is becoming more and more evident that the way in which nutrients affect the intestinal microbiota differs between individuals. The organism always seeks a balance, given which, in most cases, clear patterns for an ideal dietary profile have not been established.

Key words: dog, microbiota, diet, quality, protein-digestibility.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Revisión de literatura | 1 |
| 1.1.1. Microbioma y microbiota | 1 |
| 1.1.2. Nutrientes | 6 |
| 1.1.3. Disbiosis | 8 |
| 1.1.4. Prebióticos y probióticos | 9 |
| 2. Justificación | 12 |
| 3. Objetivos | 13 |
| 3.1. Objetivo general | 13 |
| 3.2. Objetivos particulares | 13 |
| 4. Hipótesis | 14 |
| 5. Material y métodos | 15 |
| 5.1. Animales | 15 |
| 5.2. Alimento | 16 |
| 5.3. Muestra de heces | 16 |
| 5.4. Extracción de ADN | 16 |
| 5.5. PCR tiempo real | 17 |
| 5.6. Análisis estadístico | 18 |
| 6. Resultados | 20 |
| 7. Discusión | 23 |
| 8. Conclusiones | 27 |
| Parte 2 | |
| Resumen | 29 |
| 9. Introducción | 29 |
| 10. Justificación | 31 |
| 11. Objetivos | 32 |
| 11.1. Objetivo general | 32 |
| 11.2. Objetivos específicos | 32 |
| 12. Hipótesis | 33 |
| 13. Material y métodos | 34 |
| 13.1. Animales | 34 |
| 13.2. Alimento | 34 |
| 13.3. Análisis de laboratorio | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 13.3.1. Humedad en heces | 36 |
| 13.3.2. Digestibilidad de materia seca y elementos minerales | 36 |
| 13.4. Análisis estadístico | 37 |
| 14. Resultados | 38 |
| 14.1. Digestibilidad aparente de elementos minerales | 40 |
| 14.1.1. Calcio..... | 40 |
| 14.1.2. Magnesio..... | 40 |
| 14.1.3. Hierro | 40 |
| 14.1.4. Cobre..... | 40 |
| 14.2. Digestibilidad de la materia seca..... | 41 |
| 14.3. Consumo voluntario | 42 |
| 14.4. Producción de heces | 43 |
| 14.5. Materia Seca en heces | 43 |
| 14.6. Peso corporal | 44 |
| 15. Discusión | 45 |
| 15.1. Digestibilidad aparente de elementos minerales | 45 |
| 15.1.1. Calcio y Magnesio | 45 |
| 15.1.2. Hierro | 47 |
| 15.2. Materia Seca | 48 |
| 15.3. Producción y % de MS en heces | 50 |
| 15.4. Consumo voluntario y peso vivo..... | 50 |
| 16. Conclusiones | 52 |
| 17. Referencias | 53 |
| 18. Anexos | 73 |
| 18.1. Anexo I. Lista de ingredientes de los alimentos | 72 |
| 18.2. Anexo II. Técnica de extracción de ADN | 73 |
| 18.3. Anexo III. Artículo publicado | 74 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Secuencias de <i>primers</i> utilizadas en el qPCR | 18 |
| Cuadro 2. Análisis químico proximal y análisis complementarios realizados a los alimentos | 20 |
| Cuadro 3. Rango promedio de la abundancia relativa de los microorganismos por dieta a lo largo del tiempo | 21 |
| Cuadro 4. Rango promedio de la abundancia relativa entre los tiempos por alimento..... | 22 |
| Cuadro 5. Perfil de macronutrientes de las dietas evaluadas..... | 35 |
| Cuadro 6. Resumen de las digestibilidades aparentes y características de las heces por tratamiento y con sus comparaciones múltiples de Bonferroni..... | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Especies bacterianas representativas por región en perros | 4 |
| Figura 2. Confirmación de la presencia de ADN (banda superior) en agarosa.PCR tiempo real..... | 17 |
| Figura 3. Rango promedio de las abundancias relativas de los microorganismos cuantificados al día 15 y 30 considerando una dieta de alta digestibilidad (AD) y una de baja digestibilidad (BD)..... | 22 |
| Figura 4. Digestibilidad aparente de elementos minerales (%) por grupo a través del tiempo 1)Calcio, 2)Magnesio 3)Hierro 4) Cobre..... | 41 |
| Figura 5. Digestibilidad de la Materia Seca (%)por grupo a través del tiempo.. | 42 |
| Figura 6. Consumo voluntario (g) por grupo a través del tiempo..... | 42 |
| Figura 7. Materia seca en heces (%) y producción total de heces (g) por grupo a través del tiempo..... | 43 |
| Figura 8. Peso inicial y peso final (Kg) por grupo a través del tiempo | 44 |

1. Introducción

Aunque la domesticación de perros y gatos tiene años de desarrollo, recientemente la coexistencia ha generado un vínculo más fuerte que los ha llevado a ser vistos como un integrante más de la familia, buscando para ellos beneficios de salud equivalentes, que incluye el cuidado de su estilo de vida, medicina preventiva y dieta (Grze et al., 2015). Derivado de esto, la nutrición ha cobrado una mayor importancia y los alimentos procesados han buscado ya no solo estar diseñados para alimentar, sino también para ofrecer otros nutrientes que favorezcan la salud de los animales mediante la selección de los ingredientes utilizados en su formulación (Arboleda, 2017) ; (Michel, 2006). Es el caso de los nutrientes como carbohidratos, grasas y proteína, que tienen un gran impacto sobre el microbioma intestinal (Herstad et al., 2017);(Mori et al., 2019);(Wernimont et al., 2020), por lo que múltiples investigaciones se han enfocado en estudiar las interacciones entre microorganismos, alimento y hospedador, tanto en animales sanos como en enfermos (Moon et al., 2018).

Por su parte, la digestibilidad de la dieta también afecta el microbioma, pues todo aquello que no es digerido y absorbido en el intestino delgado por el animal, representa un sustrato disponible para las bacterias en el colon (Wernimont et al., 2020). El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la digestibilidad de la proteína, así como la calidad de dos dietas procesadas, sobre la abundancia relativa de microorganismos específicos (microbiota).

1.1. Revisión de literatura

1.1.1. Microbioma y microbiota

La domesticación del perro ha generado una estrecha relación con el humano, así como adaptaciones metabólicas, conductuales y fisiológicas, dentro de las que se incluye la evolución del microbioma (Alessandri et al., 2019). El interés por conocer los microorganismos y la microbiología, surge desde el siglo XVII tratando de comprender enfermedades públicas asociadas a procesos

infecciosos, así como la microbiología alimentaria a razón de conocer y entender a los pequeños microorganismos que participan en el proceso de fermentación y elaboración de algunos alimentos (Berg et al., 2020) .

Desde Leeuwenhoek y sus investigaciones con bacterias, hongos y protozoarios que inicialmente denominó animáculos, hasta Robert Koch que asoció las enfermedades humanas y animales con microorganismos patógenos (concepto de patogenicidad), fue claro que la atención se centró en conocer las interacciones existentes entre distintos tipos de bacterias, visualizando que adicional a las entidades patógenas, existen miles más que cohabitan en beneficio de su hospedador (Berg et al., 2020).

Dos de los principales conceptos que se han generado al respecto en los últimos años, y que se han apoyado de tecnologías cada vez más avanzadas como las secuenciaciones, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) e inmunofluorescencia, entre otras, son los de "Microbiota" y "Microbioma".

Microbioma hace referencia al hábitat completo, incluye a los microorganismos (bacterias, virus, hongos), sus genes y las condiciones ambientales creadas alrededor. El concepto se basa en el término "bioma", que contempla factores bióticos y abióticos, por lo que incluye nociones adicionales como meta genómica, metatranscriptómica, metabonómica y metaproteómica (Marchesi & Ravel, 2015)

Por su parte, la *microbiota intestinal*, que es la de interés en este caso, se refiere a los microorganismos vivos (bacterias, protozoarios, virus, hongos) que cohabitan el tubo digestivo. Previamente se le denominaba "microflora", sin embargo, por adecuaciones etimológicas se determinó microbiota partiendo del griego "bios" = vida. Dentro de ellos, las más abundantes son las bacterias, que tradicionalmente se identificaban a través de cultivos, aunque de acuerdo a análisis más recientes como la secuenciación y el PCR, ha sido posible determinar que la mayoría de las que cohabitan en el intestino, no son cultivables (Jan S. Suchodolski, 2016).

De acuerdo con la mayoría de los análisis moleculares que se han desarrollado en perros hasta la fecha, el core de las comunidades microbianas en perros, es dominado por los Filos: *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (Pilla & Suchodolski, 2021). Dentro del filo Firmicutes, la taxa más representativa es la Clostridia, que suele ser abundante a lo largo de todo el tubo digestivo, mientras que a nivel de colon específicamente, las *Fusobacteria* y *Bacteroidetes* son más representativas (Grze et al., 2015). Los géneros de *Fusobacterium* son bastante comunes en perros y menos asociados a enfermedades inflamatorias gastrointestinales, en contraste con lo que sucede en humanos (Pilla & Suchodolski, 2021).

Representantes de Proteobacterias y Actinobacterias suelen encontrarse en menores concentraciones, tal es el caso de *E. coli*, que de forma normal habita el intestino de perros, y cuyo incremento se llega a asociar a alteraciones gastrointestinales (disbiosis) (Pilla & Suchodolski, 2021).

Por su parte los Lactobacilares pueden ser encontrados en concentraciones de 10^4 a 10^8 UFC/ml siendo el *L. acidophilus* el más común, seguido de *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y *L. salivarium*.

Las bifidobacterias han llegado a reportarse en cantidades de 10^8 / g en heces. A pesar de que ha sido difícil caracterizarlos, se sabe que son los que aportan mayores beneficios a la salud (Grze et al., 2015), relacionándose con la producción de ácido butírico, ácido graso que participa activamente en proporcionar energía al enterocito, y modulando posibles procesos inflamatorios.

También se han identificado microorganismos clave como Eubacterium, Bacteroides, Clostridium, Peptococcus, Bifidobacterium y Lactobacillus (Hooda et al., 2012) que participan activamente en los procesos fermentativos. Algunos de estos microorganismos interactúan entre sí modificando el microambiente, evitando la colonización de patógenos, interviniendo en la digestión de algunos

nutrientes y estimulando el sistema inmune (Lagkouvardos, Illias, Overmann, Jöng, Clavel, 2017) ; (J. S. Suchodolski, 2011).

Otros como *Clostridium perfringens*, aumenta la concentración de compuestos de putrefacción (J. S. Suchodolski, 2011) ; (Hooda et al., 2012), así como de aminas biogénicas que generan posibles efectos inflamatorios, asociados con enfermedades crónicas (Lagkouvardos., 2017). Estos microorganismos predominantes son capaces de mantener una estabilidad, que sin duda se altera de forma positiva o negativa dependiendo en gran medida de la dieta consumida por el animal (Vanhoutte et al., 2005). (Figura 1)

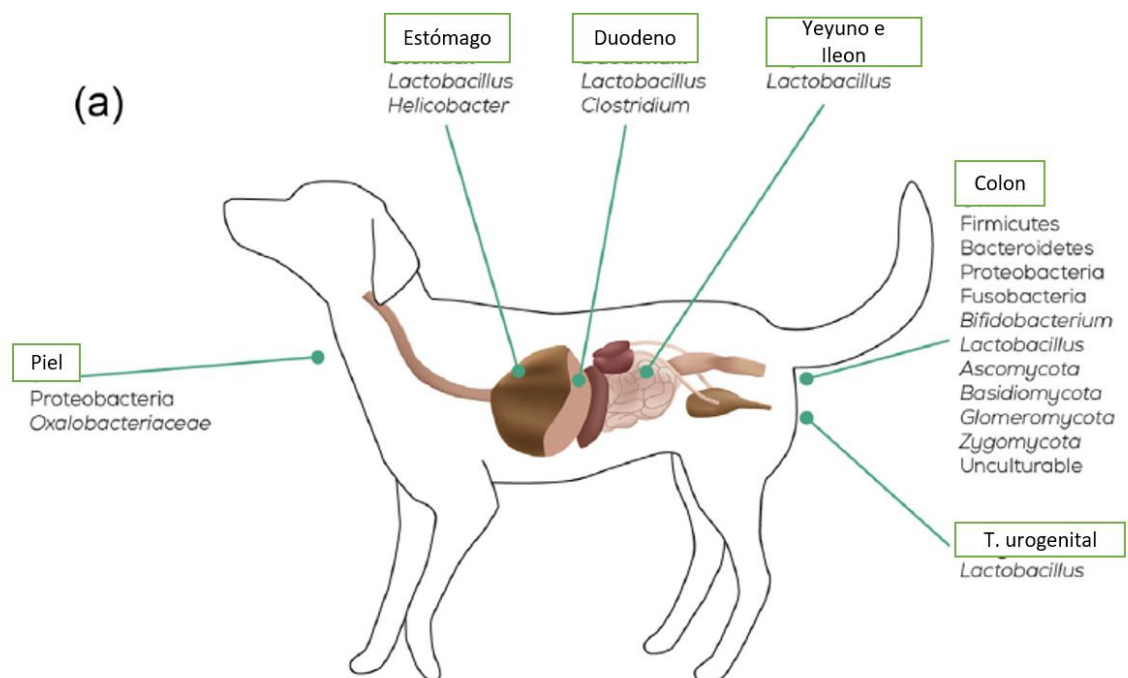


Figura 1. Especies bacterianas representativas por región en perros (Grze et al., 2015)

La estimación de estas células microbianas a nivel intestinal alcanza los trillones, se habla de diez veces más que el número de células en el cuerpo. Todos estos microorganismos interactúan directa e indirectamente con el hospedador principalmente produciendo moléculas bioactivas que son capaces de estimular rutas inmunológicas, homeostáticas y energéticas que promueven

principalmente la defensa o resistencia ante patógenos (Mills et al., 2019), así como la síntesis de vitaminas (Complejo B y K), biotransformación de ácidos biliares e incluso la mejora en la absorción de algunos nutrientes (Mondo et al., 2019). A todo este ambiente (factores bióticos y abióticos), entre microorganismos (su genoma) , secreciones enzimáticas, producción de sustancias bacterianas, cambios en el pH, osmolaridad y presencia de moléculas nutritivas, se le conoce como *microbioma* (Marchesi & Ravel, 2015)

Actualmente se sabe que un organismo con "intestino sano" (microbiota + microbioma) (Grze et al., 2015), no solo mantienen su equilibrio intestinal, sino también afecta a otros sistemas como el neuroendocrino, dando pie al estudio de eje cerebro-intestino-microbiota (Lyu et al., 2020) y al eje - cerebro- intestino- piel (Pilla & Suchodolski, 2021). Algunos microorganismos como las Bifidobacterias y los Lactobacilos tienen la capacidad de producir ácido gamma amino butírico que es neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, los Enterococos producen serotonina y los Bacillus dopamina (Tilocca et al., 2020).

De manera general, la microbiota puede alterarse por factores como la edad, estilo de vida, interacción con otras especies, y de forma muy particular, la dieta (Alessandri et al., 2019). Cuando cualquiera de estos factores se altera de forma drástica, se puede promover un cuadro de disbiosis, (modificaciones en la composición y riqueza de las especies) (Jan S. Suchodolski, 2016b), estos cambios han sido detectados en pacientes con obesidad, enfermedad renal, cáncer alergias, así como diarreas o trastornos gastrointestinales como la colitis y la enfermedad inflamatoria intestinal (Grze et al., 2015) ; (Pilla & Suchodolski, 2021)

El conocimiento de estos microorganismos, sus interacciones y las consecuencias negativas de un cuadro de disbiosis, permite sugerir la implementación de terapias que favorezcan la restauración del equilibrio, también denominada "modulación del microbioma" (Marzec & Feleszko, 2020). Dentro de estos recursos, se pueden encontrar a los prebióticos (principalmente fibras de la dieta), probióticos (microorganismos vivos complementados),

simbióticos (mezcla de los anteriores) y post bióticos (fracciones y metabolitos de microorganismos).

1.1.2. Nutrientes

Como se mencionó previamente, la dieta influye de forma importante en la composición de la microbiota. Los perros y gatos por mucho tiempo se han considerado carnívoros estrictos que equivale a dietas con altos contenidos de proteína, sin embargo, debido a la domesticación, el perro ha generado adaptaciones alimenticias que lo han hecho tolerar mejor los carbohidratos (Axelsson et al., 2013) y por ende dietas con perfiles más cercanos a los de los humanos.

Las dietas comerciales o actuales están representadas principalmente por los productos extruidos o croquetas (Pilla & Suchodolski, 2021) cuyo perfil en la mayoría de los casos se inclina a niveles altos de carbohidratos y moderados de proteínas y grasa. De ahí siguen alimentos húmedos (enlatados), semi húmedo y dietas alternativas como la BARF (Bone and raw food), con una variedad importante de ingredientes, perfiles de macronutrientes y presencia o ausencia de componentes funcionales como fibras prebióticas.

Las dietas manufacturadas rigen su elaboración bajo las normas establecidas por AAFCO (Association of American Feed Control Official's) (Raditic, 2021) tienden a cubrir los perfiles de macronutrientes, aunque las complementaciones adicionales y el tipo de ingredientes que utilicen, no sigue ninguna reglamentación específica, por lo que pueden variar sus grados de digestibilidad, aspecto que también puede alterar el comportamiento de la microbiota (Algya et al., 2018).

La importancia de los nutrientes presentes en la dieta, radica en que son compuestos que pueden fermentarse y originar compuestos que afectan el ambiente intestinal y la salud del hospedador (Lyu et al., 2020) tanto positiva como negativamente. Estudios sobre la forma en que la proteína, fibra,

carbohidratos y otros nutrientes influyen en la microbiota han ido en aumento, y se han enfocado en comparar dietas crudas (BARF) contra dietas comerciales, se ha observado que aquellos alimentos con niveles altos de proteína y grasa a partir de fuentes naturales, reducen la proporción de géneros como *Lactobacillus* sp, *Paralactobacillus* sp y *Prevotella* sp (Sandri et al., 2017), así como de Proteobacterias (Moon et al., 2018).

Por su parte, las proteínas y aminoácidos que son utilizados por las bacterias proteolíticas, tienden a incrementar el pH fecal y estimular la producción de metabolitos fecales como el amoníaco, indoles y fenoles que pueden ser dañinos para el intestino (Herstad et al., 2017); (Xu et al., 2017). Otros estudios que han evaluado el efecto de la proteína y sus fuentes a partir de subproductos, han determinado que elevadas concentraciones de este macronutriente, tienen una relación directamente proporcional con las Fusobacterias (Hang et al., 2013). Las fuentes vegetales vs las fuentes animales, parecen no mostrar cambios significativos en el ambiente y microbiota intestinal de perros con sensibilidad digestiva o alergia alimentaria (Bresciani et al., 2018). La proteína también puede ser empleada por organismos como el *F. varium* para producir compuestos benéficos como el butirato, siendo asociada a dietas con altos niveles de este nutriente y asociándose a una adaptación a largo plazo (Kim et al., 2017).

En el caso de carbohidratos no digeribles o estructurales, como la fibra; esta favorece una mayor producción de ácidos grasos volátiles o ácidos grasos de cadena corta, siendo el de mayor interés el butirato, ya que es una fuente nutritiva para los enterocitos y posee propiedades antineoplásicas, siendo parte fundamental de la salud gastrointestinal (Vital et al., 2015); (Herstad et al., 2017). De aquí han derivado conceptos adicionales como el de *fibras funcionales* o también llamadas *prebióticas*, en los que resaltan productos como la inulina y los fructanos, que favorecen el crecimiento de bacterias benéficas la producción de metabolitos con potencial positivo para la salud. En dietas complementadas con este tipo de fibras, se suelen observar una reducción en

la concentración de Fusobacteria e incrementos en Firmicutes, aunque ha sido posible distinguir cierta idiosincrasia por animal (Ingmar S. Middelbos et al., 2010).

Un estudio comparativo entre cuatro dietas de prescripción (control de peso, baja en grasa, enfermedad renal y alergia), cuyos perfiles nutricionales varían considerablemente, concluyó que la grasa favorece al orden Coryobacteriales, la fibra reduce la relación Firmicutes/ Bacteroidetes, e incrementa la concentración de géneros como *Faecalibacterium*, asociado a la producción de ácidos grasos de cadena corta que promueven un efecto anti inflamatorio, y las dietas de mayor contenido de proteína, favorecieron la abundancia de Fusobacterias (Mori et al., 2019).

De este modo, y debido a las posibles variaciones que puede ejercer la dieta, es importante considerar la digestibilidad como un nuevo punto a evaluar. En este estudio se consideran dos dietas extrudizadas de diferente valor nutricional y con diferentes grados de digestibilidad de proteína, para evaluar su efecto sobre ciertos microorganismos seleccionados.

1.1.3. Disbiosis

Un sistema microbiano en balance (eubiosis) permite la regulación inmunológica y salud del hospedero. Una alteración en la composición o riqueza de la microbiota intestinal, se denomina disbiosis. La disbiosis puede ser de tres tipos: a) la que presenta una reducción en la diversidad bacteriana b) en la que hay pérdida de bacterias benéficas c) en la que hay sobre crecimiento de patógenos (Mondo et al., 2019). Este proceso está íntimamente relacionado con la presentación clínica de desórdenes inflamatorios como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis y síndrome de intestino irritable, siendo una duda actual si la disbiosis es causa o consecuencia de dichos trastornos, debido a que también se establece una predisposición genética. (Jan S. Suchodolski, 2016b)

Un microbioma disbiótico puede asociarse directamente a la reducción de metabolitos anti inflamatorios, así como trastornos digestivos, por ejemplo: microorganismos como *Lactobacillus* spp y *Clostridium* spp, desconjugan ácidos biliares, por lo que una composición anormal de estos géneros pueden alterar la absorción de grasas. El sobre crecimiento de microorganismos patógenos promueve la presencia de entero toxinas que dañan la mucosa intestinal y su capacidad absorptiva resultando en diarreas. (Suchodolski et al., 2015 ; Suchodolski, 2016a). La

Para corregir alteraciones sugerentemente asociadas a disbiosis, se suele emplear la manipulación del microbioma gastrointestinal, para lo cual se emplea la dieta, antibióticos, prebióticos, probióticos y más recientemente, los trasplantes fecales. (Mondo et al., 2019)

1.1.4. Prebióticos y probióticos

Los prebióticos se definen como “compuestos no digeribles que pueden metabolizar los microorganismos en el intestino, modulando la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, confiriendo beneficios positivos en el hospedero” (Mondo et al., 2019). El uso de este tipo de compuestos en la dieta de perros ha reportado beneficios en la modulación de la microbiota y en el manejo de infecciones entéricas. El uso de inulina (1.5%) pueden reducir el pH fecal e incrementa la población de *Bifidobacteria* (Zentek et al., 2003; Middelbos et al., 2007). También se ha reportado que el uso de fructooligosacáridos (FOS) promueve el crecimiento de *Bifidobacteria* y mejora la digestibilidad de algunos elementos minerales en perros como el calcio, magnesio, sodio, zinc y hierro (Pinna et al., 2018)

Por otra parte, los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas promueven un beneficio en la salud del hospedador, sobre todo a nivel inmunológico (Mondo et al., 2019). En perros se han empleado como moduladores de enfermedades gastrointestinales causantes de diarreas (Lucena et al., 2018) y se ha mostrado

que pueden ser mucho más eficientes en combinaciones con prebióticos y antidiarreicos (Nixon et al., 2019). Algunas de las principales cepas empleadas hasta el momento son pertenecientes a bacterias conocidas como ácido lácticas, dentro de las que resaltan *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*. *Enterococcus faecium* ha demostrado tener efectos tanto sistémicos como locales y funcionar en la estimulación inmunológica en cachorros (Benyacoub et al., 2003), a la vez que se ha tratado de probar su efecto sobre la absorción de nutrientes marcadores de la salud gastrointestinal como el folato y la cobalamina (Lucena et al., 2018).

La cepa SF68 de *Enterococcus faecium* se aisló por primera vez en 1968 a partir de las heces de bebés recién nacidos, se detectó que formaba parte del grupo de bacterias ácido lácticas que se adquieren a partir del consumo de leche materna, identificándose, así como parte de la biota normal de humanos y otros animales de sangre caliente. Sus aplicaciones clínicas han sido dirigidas a la modulación de la microbiota en desórdenes gastrointestinales en adultos y niños, así como tratamiento de diarreas agudas tras eventos de enteritis o enterocolitis (Holzapfel, et al. 2018). y se le han conferido propiedades potenciales como probiótico asociado a la producción de sustancias antimicrobianas (enterocinas) que pueden contribuir en el control de poblaciones patógenas (Kuba et al., 2018), también tiene la característica de pertenecer fundamentalmente a la microbiota canina, lo cual le permite alcanzar un mejor nivel de colonización.

De acuerdo a los estudios de seguridad, se ha demostrado que la vía de administración tradicional oral, es altamente segura, libre de efectos secundarios y toxicidad. Vía intraperitoneal en ratones, se establece una DL50 > 140,000 veces la dosis terapéutica (225 millones de UFC de SF68), administrándose por 10 días. Hasta el momento no se reportan casos de translocación gastrointestinal a otros órganos (Holzapfel, et al., 2018). La dosis mínima y máxima en perros se establece en 4.5×10^6 – 2×10^9 UFC/Kg de alimento, la cepa SF68 no comparte marcadores genéticos con las cepas asociadas a

infecciones intrahospitalarias y no demuestra ser irritante para piel ni mucosa (Food & Authority, 2013)

Respecto a la concentración necesaria para ejercer un efecto clínico probiótico, se sabe que debe ir de 1×10^7 y hasta 1×10^9 UFC/día, dosis que ha demostrado mejorar la calidad de las heces y controlar procesos diarreicos (Minelli et al., 2009), tomando en cuenta que la dosis puede variar dependiendo el proceso patológico o el efecto fisiológico deseado, así como la idiosincrasia entre paciente.

2. Justificación

La dieta es uno de los principales factores asociados a los posibles cambios en los microorganismos intestinales; muchos estudios han determinado la posible participación de ingredientes específicos, pero es poca la información que se establece sobre el papel de la calidad o digestibilidad de una dieta en el comportamiento de la microbiota.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo específico*

Evaluar cambios en la abundancia relativa de microorganismos específicos en heces de perros adultos sanos alimentados con dos dietas de diferente nivel de digestibilidad.

3.2. *Objetivos particulares*

Establecer valores de abundancia relativa de microorganismos específicos a partir de heces de perros adultos en mantenimiento utilizando técnicas de biología molecular.

Comparar las abundancias relativas a partir del tipo de dieta ofrecida y establecer si la calidad y digestibilidad de la dieta influyen en el comportamiento de microorganismos patógenos.

4. Hipótesis

Una dieta de baja digestibilidad favorecerá el incremento de la abundancia relativa de microorganismos patógenos como *Clostridium perfringens*, mientras que la dieta de mejor digestibilidad favorecería la abundancia relativa de especies benéficas como *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium varium*, *Lactobacillus salivarium* y *Enterococcus faecium*.

5. Material y Métodos

5.1. Animales

El proyecto fue evaluado y aprobado por el SICUAE- Subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales, con el protocolo número DC-2018/2-10.

Se emplearon 20 perros adultos no esterilizados, clínicamente sanos, diferentes razas (entre cocker spaniel, basenji, schnauzer, dachshund y otras razas únicas) de entre 2 y 6 años con un peso promedio de 6.7 ± 2.55 kilogramos. De forma aleatoria se formaron dos grupos, la selección de alimentos se realizó tomando en cuenta los parámetros establecidos por AFFCO (2011) para perros en mantenimiento. El primer grupo fue alimentado con croquetas de aporte proteico alto (>22% PC en MS), una densidad energética alta (superior a 3500 kilocalorías por cada 100 gramos) y digestibilidad de proteína superior al 75% (alta calidad- digestibilidad); el segundo grupo fue alimentado con un nivel mínimo de proteína (20% PC en MS), una baja densidad energética (menos de 3200 kilocalorías por cada 100 gramos) y una digestibilidad de proteína menor al 75% (baja calidad- baja digestibilidad). La lista de ingredientes de cada producto, se presenta en el **ANEXO 1**.

Se contempló un periodo de adaptación al nuevo alimento de 3 días (transición 75:25, 50:50, 25:75) para evitar la presentación de problemas digestivos. Para determinar las cantidades a ofrecer, se calculó el requerimiento energético de los animales de forma individual y con base a fórmulas establecidas: Requerimiento energético en mantenimiento (REM) = $(\text{Peso vivo})^{0.75} \times 95$ kilocalorías. (Case et al., 2011).

Todos los animales se mantuvieron en condiciones similares de casa, sin encierros en jaula, con acceso a patio para reducir el estrés, sin alimentos adicionales, agua a libre acceso y evaluando que no existiera la presencia de comportamientos indeseable como coprofagia. Al inicio, intermedio y final del

periodo experimental, se evaluó la condición corporal, masa muscular y peso de los animales (Freeman, 2011).

5.2. *Alimento*

El alimento fue pesado para la administración individual de cada sujeto experimental, se ofrecía en una toma diaria en la que se garantizaba el consumo total con una alimentación controlada y en espacios separados.

Al alimento ofrecido se le realizó estudio bromatológico para lo cual se determinó: humedad (AOAC método 934.01)(2005), proteína cruda (AOAC método 954.01)(2005), grasa cruda (AOAC método 920.39)(2005), fibra cruda (AOAC método 962.09)(2005), cenizas (AOAC 1990) y carbohidratos por diferencia.

Así como proteína verdadera (AOAC método 991.29) (2005), proteína no digestible, digestibilidad de proteína *in vitro* (AOAC método 971.09)(2005), fibra neutro detergente y fibra ácido detergente como análisis complementarios (método Van Soest y Wine, 1967).

5.3. *Muestras de heces*

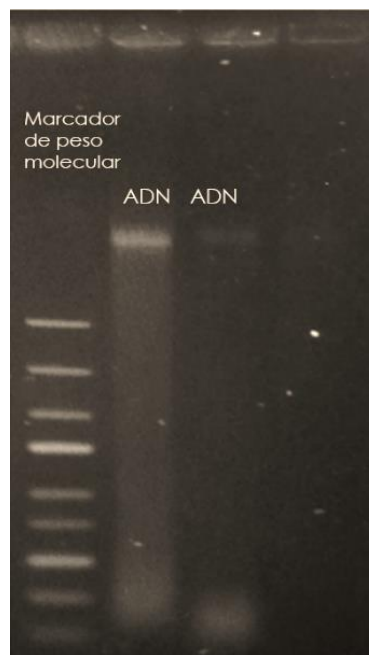
La colecta de las muestras se realizó el día en que se completó la transición de 3 días (día 0), al día 15 y 30 del periodo experimental. Las excretas se tomaban en el momento inmediato de defecar tratando de que no tocaran el suelo, se emplearon bolsas herméticas para su conservación y condiciones de ultracongelación (-70°C) hasta el procesamiento.

5.4. *Extracción de ADN*

Las heces se sometieron a extracción empleando una técnica modificada de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB 10%) (Wilson, 2001) (DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56)(García, 2019) que incluye una precipitación en isopropanol dejando la muestra en refrigeración al menos 12 horas. Las modificaciones en la técnica consistieron en: A) Re suspender el pellet obtenido del lavado en 570µl de buffer TE + 50 µl de lisozima (10mg/mL Sigma-

Aldrich) incubando a 37°C durante 30 minutos. B) Incubar a 56°C por una hora el paso que incluye la adición de 30 µl ed SDS + 4 µl Proteinasa K. **ANEXO 2**

Se realizó una confirmación de la presencia de ADN en gel de agarosa al 0.8% (20 ml de TAE 50X + 0.18 g de Agarosa) con las condiciones: 70 V 300 mA 45 minutos. Figura 4. Posteriormente se realizaron cuantificaciones en el equipo Nanodrop®, siendo aceptables aquellas lecturas de entre 1.8 y 2.0 para A260/A280 y ≥ 1.9 para A260/A280. **(Figura 2)**



**Figura 2. Confirmación de la presencia de ADN (banda superior) en agarosa.
PCR tiempo real**

5.5. PCR en tiempo real

Todas las muestras se estandarizaron a 4 ng/ml de ADN, a partir de ellas se realizaron los qPCR, empleando el kit KAPA SYBR® FAST for light cycler® 480. El volumen de reacción fue de 12 µl (6µl KAPA SYBR® FAST + 3.4 µl de agua grado biología molecular libre de nucleasas+ 0.6µl de primer mezcla forward-reverse + 2µl de muestra). Para la detección de microorganismos se emplearon primers desarrollados mediante información obtenida en la base GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) y con ayuda del programa DNAMan®. El universal se tomó de referencia (Yang et al., 2015). (**Cuadro 1**)

Cuadro 1. Secuencias de primers utilizadas en el qPCR

| Corrida | Secuencia (Gen 16S) | Tamaño aproximado (pb) | Temperatura alineamiento (°C) |
|---------------------------------|--|------------------------|-------------------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | F: CAGTTCGCCATACAA R: GGATTCTCTTCCGCTTGAC | 131 | 57 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | F: TGA AAC TGG GAG ACT TGA GTG C R: CTT AGG TAA GGT TCT TCG CGT TGC | 100 | 55 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | F: GCATAGCCCCGCACCTG R: GTTACTCTCATCCTGTCTCTC | 160 | 54 |
| <i>Fusobacterium varium</i> | F: GGGATGTCAAACGCTGG R: GGCGCTGAGGTTGAG | 143 | 57 |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | F: GTTCTCCTACGGCTACCTGTGTTACG R: TTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG | 225 | 57 |
| Universal (Yang 2015) | F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGG | 136 | 60 |

Las corridas se realizaron por duplicado en el equipo Rotor Gene® con las siguientes condiciones: 95°C 3 min, 35 ciclos de 95°C 30 seg, temperatura de alineamiento 30 segundos, 72°C 3 min y extensión final de 72°C 3 min. Los resultados fueron analizados con el programa Qrex®. Se obtuvieron los valores de Ct (Threshold point) siendo aceptables aquellas repeticiones que diferían por máximo un ciclo entre sí. Se determinó la abundancia relativa a partir del método $\Delta\Delta Ct$ (Green, 2012), a partir de valores de Ct obtenidos con un primer universal.

5.6. Análisis estadístico

Los resultados de abundancia relativa fueron analizados con el programa IBM® SPSS® Statistics Versión 23. Se evaluó: normalidad (Prueba Shapiro-Wilk) y Homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene) (Daniel, 2010), al no cumplir

con los supuestos para pruebas paramétricas, se emplearon pruebas no paramétricas trabajando rangos promedios de los resultados.

Para comparar la abundancia bacteriana relativa entre dietas a lo largo del tiempo se empleó U de Mann Whitney (suma de rangos) como sustitución de prueba t – Student para muestras independientes. Para evaluar las diferencias entre las abundancias relativas de cada uno de los microorganismos se empleó prueba de Kruskall Wallis, en sustitución a un ANOVA para muestras no pareadas. Finalmente, para determinar si existía diferencia entre las abundancias relativas de las dietas a través del tiempo, se empleó prueba de Friedman como alternativa de ANOVA para muestras pareadas. Un *p* - value ($p < 0,05$) es considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

6. Resultados

El Cuadro 2 resume los análisis bromatológicos y complementarios realizados a las dietas empleadas en el experimental.

Cuadro 2. Análisis químico proximal y análisis complementarios realizados a los alimentos.

| Analito (%) | Dieta ¹ | |
|-------------------------------|--------------------|-----------|
| | AD | BD |
| Humedad | 5.0±0.87 | 7.5±0.42 |
| Proteína cruda | 33.8±0.28 | 20.1±2.1 |
| Grasa cruda | 14.9±0.01 | 7.1±0.01 |
| Fibra cruda | 1.5±0.2 | 4.1±0.01 |
| Cenizas | 5.7±0.01 | 9.0±0.01 |
| Carbohidratos | 42.0±1.25 | 53.0±1.8 |
| Proteína verdadera | 33.6±0.07 | 19.1±0.01 |
| Proteína no digestible | 9.6±0.01 | - |
| Proteína digestible | 71.8±0.09 | 12.3±0.28 |
| Fibra neutro detergente (FND) | 10.3±0.32 | 8.5±0.2 |
| Fibra ácido detergente (FAD) | 28.6±0.36 | 31.5±0.15 |

¹ AD: Alta calidad- digestibilidad; BD: Baja calidad- digestibilidad

En el Cuadro 3 se muestra la diferencia en la abundancia relativa de cada microorganismo, entre las dietas a lo largo del tiempo. Existió una mayor abundancia para los microorganismos *Fusobacterium varium*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus salivarium*, con la dieta 1 en los primeros 15 días de consumo.

Cuadro 3. Rango promedio de la abundancia relativa de los microorganismos por dieta a lo largo del tiempo.

| Microorganismo | Día 15 | | P-value | Día 30 | | P- value |
|------------------------|-------------------|------------------|---------|-------------------|-------------------|----------|
| | Dieta | | | Dieta | | |
| | AD | BD | | AD | BD | |
| <i>Cl. perfringens</i> | 12.3 ^a | 8.7 ^a | 0.190 | 10.3 ^a | 10.7 ^a | 0.912 |
| <i>F. varium</i> | 14.7 ^a | 6.3 ^b | 0.001 | 13.1 ^a | 7.9 ^a | 0.052 |
| <i>L. salivarium</i> | 15.1 ^a | 5.9 ^b | 0.000 | 13.4 ^a | 7.6 ^b | 0.028 |
| <i>E. faecium</i> | 14.7 ^a | 6.3 ^b | 0.001 | 11.5 ^a | 9.5 ^a | 0.481 |
| <i>B. fragilis</i> | 13.9 ^a | 7.1 ^b | 0.009 | 13.5 ^a | 7.5 ^b | 0.023 |

AD: Alta calidad- digestibilidad; BD: Baja calidad- digestibilidad
 Literales diferentes por línea denotan significancia estadística. Mann Whitney U test (p<0.05).

La Figura 3 resume las abundancias relativas de las poblaciones de microorganismos, pudiendo observar que se mantuvieron estables durante el periodo de estudio por dieta ofrecida.

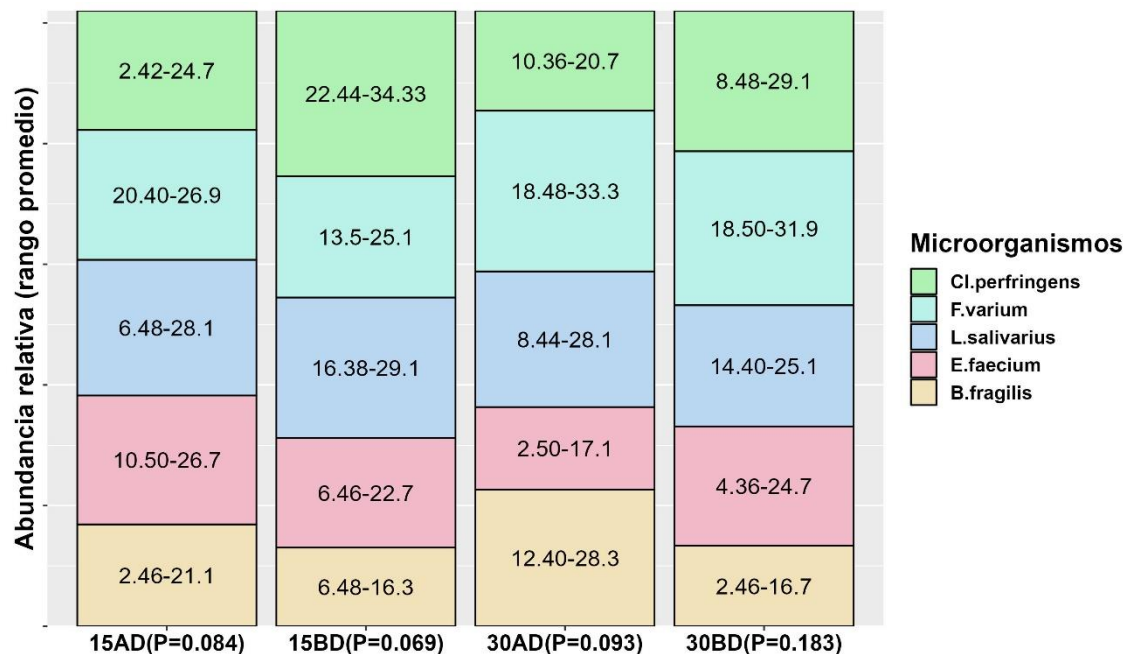


Figura 3. Rango promedio de las abundancias relativas de los microorganismos cuantificados al día 15 y 30 considerando una dieta de alta digestibilidad (AD) y una de baja digestibilidad (BD)

Finalmente, en el Cuadro 4 se muestran las diferencias significativas en la abundancia relativa general entre el día 15 y 30 para los diferentes alimentos proporcionados. El alimento 1 presentó una mayor abundancia relativa al día 15 en comparación con el día 30 de administración.

Cuadro 4. Rango promedio de la abundancia relativa entre los tiempos por alimento.

| Dieta | | | | | |
|------------------|------------------|--------------|------------------|------------------|--------------|
| AD | | | BD | | |
| ARD15 | AR D30 | P-value | AR D15 | AR D30 | P-value |
| 2.0 ^a | 1.0 ^b | 0.025 | 1.2 ^a | 1.8 ^a | 0.180 |

AD: Alta calidad- digestibilidad; BD: Baja calidad-; Literales diferentes por línea denotan significancia estadística. Prueba de Friedman(p<0,05)
ARD15 = Abundancia relativa día 15
ARD30 = Abundancia relativa día 30

c

7. Discusión

La nutrición actual en perros busca no solo cubrir los requerimientos fisiológicos de los animales, sino también generar un mayor integridad y salud intestinal, lo cual se ve reflejada en la salud del individuo, la cual abarca desde el sistema inmunológico hasta posibles repercusiones en la salud mental (Pilla & Suchodolski, 2020). Resulta cada vez más evidente, la forma en la que la dieta afectan la microbiota intestinal, no solo en un individuo, dado que difiere entre individuos (Herstad et al., 2017). Dicho lo anterior, resulta evidente, que en muchos casos no se han logrado establecer patrones claros para un perfil dietético ideal, pero permite pensar en perfiles a la medida o individuales que conduzcan a este equilibrio de "intestino sano". Diversos estudios sobre microbioma, han establecido que no solo la anatomofisiología intestinal, difiere entre especies o razas, dado que existe una evidente variabilidad individual (Suchodolski, 2005), situación que suele reflejarse en los resultados que muestran que aún con cambios en la dieta, el microbioma tiende a regresar a un balance (Herstad et al., 2017). Así mismo, este balance "dietético", puede verse afectado por factores adicionales como el uso de antibióticos, estrés, procesos infecciosos, enfermedades crónicas, etc., casos en los que la homeostasis individual se rompe, generando alteraciones como colitis, síndromes de mala absorción, diarreas persistentes, etc., que pueden llevar a la muerte del individuo (J. S. Suchodolski, 2011). Uno de los principales microorganismos asociados a este tipo de trastornos digestivos es *Clostridium perfringens*. De acuerdo con diversos autores (Schmidt, 2018; Sandri, 2017; Vital, 2015; Hang, 2012), ambientes ricos en proteína y con altas cantidades de aminoácidos, promueven el crecimiento tanto de *Clostridium difficile* y *Clostridium perfringens*, microorganismos relacionados a procesos inflamatorios. Zentek (2003), observó un incremento en las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Cl. perfringens* (de 3,3 UFC que incrementaron hasta 8,2 a 8,8 UFC/g heces) ofreciendo dietas con alto nivel de proteína (> 40% PC), con la característica de ser de baja calidad y digestibilidad. A pesar de esperar un cambio similar, en el presente estudio no fue posible asociar la digestibilidad de la proteína de la dieta con un incremento en la abundancia relativa de *Cl. perfringens*, por lo que puede

sugerirse que aunque la dieta tenga baja digestibilidad y permita un ambiente colónico rico en aminoácidos, el microbioma tiene la capacidad de estabilizar el crecimiento de posibles patógenos, esto en respuesta a la presencia de otros nutrientes o a factores intrínsecos de un paciente sano (Allaway et al., 2020), aun así en nuestro estudio no se evaluó la consistencia de la heces, ni se evaluó el efecto de la dieta por más de 30 días.

Los resultados de *Fusobacterium varium* obtenidos en nuestro estudio, se asemejan a lo reportado por Mori (2019), quien comparó el microbioma de perros sanos alimentados con cuatro dietas de prescripción; en dicho estudio se encontró una abundancia relativa elevada de *Fusobacterium* cuando los animales consumieron la dieta que presentaba mayor nivel de proteína cruda (30% PC) (abundancias: 7,6 vs 2.9, 1.4 y 0). En este caso, la dieta de mayor proteína cruda (33.8 vs 20.1%PC) derivó en una mayor abundancia relativa del microorganismo en cuestión (7.6 vs 2.4) aunque este efecto sólo fue significativo para los primeros 15 días, se puede observar una tendencia a mantener una mayor abundancia en la dieta de alta proteína hasta los 30 días (6.8 vs 4.2). Moinard (2020) también reportó un incremento de *Fusobacterium* cuando la dieta ofrecida era elevada en proteína (29.3%PC). *Fusobacterium sp* se considera un fermentador de aminoácidos, que en ocasiones se relaciona con la presentación de trastornos digestivos, Hang (2012) obtuvo una abundancia relativa alta de este género cuando se administró una dieta de muy alta proteína (60% PC), en su caso se reportaron diarreas y cambios en la consistencia de las heces. Es importante notar que la tendencia de *Fusobacterium sp* a incrementar su abundancia relativa en dietas altas en proteína, también podría tener un efecto benéfico, pues Vital (2015), lo reporta como un microorganismo que presenta la capacidad de producir butirato, ácido graso volátil que funciona como fuente energética para el intestino y se asocia a propiedades antineoplásicas.

Respecto a *Lactobacillus salivarium*, en este estudio fue posible observar una abundancia relativa alta en la dieta de mayor digestibilidad y calidad, con respecto a la de baja calidad y digestibilidad durante los 30 días de

experimentación. Estos datos corresponden con lo observado por Middelboss (2007), quien encontró una mayor abundancia relativa de este microorganismo en una dieta complementada con fibra prebiótica, que aquella dieta que no incluía este tipo de fibra (12.2 vs 10), esto debido a que los géneros de *Lactobacillus* son microorganismos asociados a la presencia de fibras funcionales como la inulina, fructooligosacáridos, mananoligosacáridos y pulpa de remolacha. El alimento de alta calidad y alta digestibilidad contenía dentro de sus ingredientes inulina, lo cual podría explicar el comportamiento de este microorganismo. A su vez, Bermingham (2017), también reportó una correlación entre el grado de digestibilidad de la dieta, y el crecimiento de Lactobacilares, semejante a los resultados del presente estudio.

El género de *Enterococcus* presenta una gran diversidad ecológica, *Enterococcus faecium* particularmente, es un microorganismo con amplia distribución en la naturaleza, algunas cepas se consideran causales de enfermedades nosocomiales en humanos y zoonóticas (Santaniello et al., 2020), mientras que otras variedades tienen potencial probiótico y se emplean en la producción de fermentados (Lam et al., 2012)(Ghattargi et al., 2018). La identificación y cuantificación de este microorganismo ha sido muy variada en perros tanto sanos como enfermos (Zishiri, 2018) (Mori et al., 2019)(Jha et al., 2020). En el presente estudio fue posible identificar una abundancia relativa de *E. faecium* más elevada en la dieta de alta proteína y calidad (14.7 vs 6.3), las asociaciones entre el tipo de dieta o sustratos con el crecimiento de este microorganismos son pocas, pero de acuerdo estudios previos, tiene una alta capacidad para utilizar a los carbohidratos (Ghattargi et al., 2018). En el caso del alimento de alta calidad – digestibilidad, presentaba menor cantidad de carbohidratos que el alimento de baja calidad - digestibilidad (42 % vs 53%), lo que podría la abundancia reportada de este microorganismo. Por otra parte es importante considerar que los primers utilizados para la identificación molecular de *E. faecium*, no contemplaron alguna cepa en particular, por lo que sería interesante realizar nuevos estudios que determinen si esta abundancia asociada con la dieta pertenece a cepas con potencial zoonótico, o bien, son inocuas.

Bacteroides es un género en el que se han detectado discrepancias importantes. Mientras que algunos autores han reportado elevadas concentraciones en pacientes con diarrea (Jia et al., 2010) (Deng & Swanson, 2015), otros lo han reportado en menores concentraciones cuando el paciente presenta enfermedad inflamatoria intestinal (Inness et al., 2007). Estas posibles diferencias se asocian a cuestiones como la técnica de extracción utilizada, tipo de muestra, especie (perro o gato), así como al tipo de dieta (Deng & Swanson, 2015). Respecto a este último factor, ha sido posible asociar a Bacteroides con dietas altas en proteína y grasa (Mori et al., 2019) (Birmingham et al., 2013). Deush (2014) encontró que gatos alimentados con dieta de alta proteína y bajos carbohidratos (110 gr PC y 49 gr GC / 1000 kcalEM) presentaban una mayor abundancia relativa de este microorganismo, contra los alimentados con una dieta moderada en proteína y carbohidratos (78g PC y 44 g GC /1000 kcal). Este resultado se asemeja a lo obtenido en este experimental, considerando que la dieta de alta calidad tiene un perfil de 91.2 g PC y 40.15 g GC /1000 kcal. Así mismo Swanson (2011) también encontró relación entre el tipo de fibras contenidas en el alimento al crecimiento de especies pertenecientes a la familia de los Bacteroides. De forma similar a lo mencionado con *L. salivarium*, la dieta de alta calidad - digestibilidad contiene dentro de sus ingredientes inulina, componente que pudo favorecer a estos dos microorganismos durante los 30 días del experimental.

Finalmente es posible observar que la abundancia relativa general de los microorganismos, se modifica a lo largo del tiempo en la dieta de alta calidad-digestibilidad, esto puede estar determinado por la capacidad del microbioma intestinal de adaptarse rápidamente y regularse ante cambios transitorios intrínsecamente, de forma similar a lo observado por (Allaway et al., 2020), quien ofreció dos dietas intercaladas a perros labradores, y observó que pasado el tiempo, los microorganismos recuperan su estabilidad o perfil inicial, teniendo cambios significativos en ciertas bacterias, como *Fusobacterium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*. Este efecto también ha sido reportado en humanos (Wu et al., 2011), en donde evaluando el microbioma de 98 individuos alimentados con dos tipos de dietas (de niveles distintos de grasa y fibra), lograron detectarse

cambios significativos durante las primeras 24 horas, y una estabilización de las poblaciones transcurridos 10 días.

8. Conclusiones

La búsqueda de una dieta ideal para el mantenimiento de un intestino sano ha permitido establecer cómo es que los nutrientes interfieren en el desarrollo de la microbiota, tras este estudio es posible observar que existen cambios importantes tras el consumo de dietas con diferente calidad y digestibilidad, pero que estos solo son transitorios, y que organismos sanos, tienden a tener la capacidad de estabilizar sus poblaciones.

PARTE 2

Efecto de la complementación de *Enterococcus faecium*- inulina sobre calidad fecal y digestibilidad aparente de materia seca y elementos minerales en perros adultos con dos dietas comerciales.

Resumen

El uso de simbióticos en la dieta de perros es de los factores más importantes para la salud gastrointestinal. Es sabido que la elección del probiótico y el prebiótico pueden favorecer la digestibilidad, aún con dietas de bajo valor proteico. El presente estudio evaluó el efecto del *Enterococcus faecium* SF68 + inulina sobre la digestibilidad de materia seca y elementos minerales, así como parámetros de calidad de heces en dos grupos de perros adultos alimentados con dos dietas de diferente perfil energético y proteico. Para disminuir la variabilidad entre grupos, se utilizaron 20 perros de la estirpe náhuatl, los cuales se dividieron en dos grupos con una repetición por grupo (n=5): GD1: dieta de baja calidad; GD1Ef: dieta de baja calidad más *Enterococcus faecium* SF68 + inulina; GD2: dieta de alta calidad y GD2Ef: dieta de alta calidad *Enterococcus faecium* SF68 + inulina. El GD1Ef presente la mayor digestibilidad aparente de Ca, Mg y MS. El Fe presentó diferencias entre grupos asociada a la dieta. Las heces con mejor consistencia se presentaron en el GD1Ef.

Palabras clave: Probiótico, inulina, perro, *E. faecium*, elementos minerales.

9. Introducción

Se sabe bien que la dieta influye de forma importante en el ambiente intestinal (Benyacoub et al., 2003), ingredientes específicos, la digestibilidad, la presencia o ausencia de ciertos microorganismos, residuos fermentables, entre otros factores, determinan la salud gastrointestinal (Jugan et al., 2017). Junto con el alimento, el uso de probióticos y prebióticos pueden favorecer efectos benéficos en los animales mediante diversos mecanismos de acción, como exclusión competitiva, secreción de bacteriocinas, inmunomodulación, producción de nutrientes, así como mejoras en la absorción de ciertos micronutrientes, entre otros factores (Jugan et al., 2017; Lee et al., 2022).

Actualmente los propietarios de perros y gatos buscan mejoras en aspectos básicos como la calidad de las heces. En animales sanos, la calificación y calidad fecal se relaciona en gran medida con la calidad y por ende el grado de digestibilidad del alimento, de hecho, algunos estudios han demostrado que su utilización promueve una mayor absorción de micronutrientes como el folato y la cobalamina (Lucena et al., 2018). Para alcanzar estos parámetros, se ha empleado tanto la calidad de la dieta como el uso de complementos nutricionales como los probióticos y las fibras prebióticas, dentro de las cuales resalta la inulina, carbohidrato indigestible, que se encuentra en cantidades abundantes en las plantas (Roberfroid, 2002), algunos de los mecanismos mediante los cuales promueve la salud gastrointestinal incluyen la estimulación del crecimiento de bifidobacterias que producen ácidos grasos volátiles y que sirven como fuente energética a las células intestinales, manteniendo así su estructura y funcionalidad (Nie et al., 2017), también pueden modificar las condiciones intestinales como el pH, factor que a su vez puede interferir en la digestibilidad de ciertos nutrientes (Verdonk et al., 2005). Por otra parte, el *Enterococcus faecium* es uno de los microorganismos de mayor distribución en el tracto gastrointestinal (TGI) de los perros, es una bacteria ácido láctica que ha sido estudiada y empleado como probiótico en perros (Holzapfel, et al. 2018), una de sus actividades descritas es una mejor consistencia de las heces, la cual se ha relacionado a una mejor digestibilidad (Greuter et al., 2020; Bybee

et al., 2011; Mondo et al., 2019), principalmente en pacientes con diarreas de diversos orígenes (Benyacoub et al., 2003).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la complementación de *Enterococcus faecium* SF68 (Forti Flora®, Purina Proplan) de forma independiente y conjunta con inulina de agave como prebiótico, sobre la digestibilidad aparente (*in vivo*) de materia seca y elementos minerales (Ca, Mg, Fe, Zn y Cu), así como sobre la materia seca fecal, producción de heces, consumo voluntario y peso vivo, en perros adultos sanos alimentados con dos dietas comerciales de diferente valor nutricional.

10. Justificación

El uso de complementos nutricionales como moduladores intestinales ha incrementado considerablemente en años recientes. Los más comunes son los prebióticos y probióticos, cuya gran parte de investigación está enfocada en sus efectos sobre la calidad fecal, modificaciones en la microbiota y absorción de algunos nutrientes como los minerales, este último aspecto ha sido poco estudiado en perros, por lo que este experimental se enfoca en evaluar el efecto de la complementación de un prebiótico y un probiótico en dos dietas de diferente calidad nutricional, sobre la digestibilidad aparente de elementos minerales.

11. Objetivos

11.1. Objetivo general

Determinar el efecto de *Enterococcus faecium* SF68 (Fortiflora® Purina) a dosis de 1×10^8 UFC/día, solo y con inulina, sobre la digestibilidad aparente de elementos minerales y la calidad fecal en perros adultos.

11.2. Objetivos específicos

Complementar la dieta de perros adultos sanos con *Enterococcus*, durante un periodo de 30 días (tiempo indicado por el fabricante). *faecium* SF68 (Fortiflora® Purina) a dosis de 1×10^8 UFC/día

Complementar la dieta de perros adultos sanos con *Enterococcus faecium* SF68 (Fortiflora® Purina) a dosis de 1×10^8 UFC/día (Fortiflora® Purina) e inulina de agave (1% de la dieta) durante 15 días.

Medir la digestibilidad aparente de elementos minerales (Ca, Mg, Cu, Zn y Fe) en perros adultos con y sin complementación.

Medir la humedad y producción de heces en perros adultos con y sin complementación.

12. Hipótesis

La complementación del probiótico *Enterococcus faecium* SF68 (Fortiflora® Purina) a dosis de 1×10^8 UFC/día, solo y con inulina, favorecerá de forma positiva la digestibilidad aparente de elementos minerales (Ca, Mg, Cu, Zn y Fe) y la calidad fecal utilizando un alimento de baja y alta calidad como dieta base.

13. Material y Métodos

13.1. Animales

El estudio se llevó a cabo en el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez ubicado al sur de la Ciudad de México, México. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el SICUAE- Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el número de protocolo DC2018/2-10.

Se emplearon 20 caninos adultos de la estirpe "Náhuatl" consanguíneos de laboratorio, de entre 1 - 7 años con un peso (promedio de 20.6 Kg \pm DE). Los animales se encontraban clínicamente sanos, se realizaron pruebas coprológicas para descartar la presencia de parásitos, así como la presentación de diarreas o signologías digestivas. Cada animal se encontraba alojado en un espacio individual de 1.5 m² (NOM 062-ZOO-1999) con un comedero y bebedero de acero inoxidable.

13.2. Alimentación y complementación

Se eligieron dos dietas comerciales extrudizadas para perros adultos en mantenimiento que cumplieran con los requerimientos establecidos por AFFCO (Cuadro 5) para corroborar el contenido ambas dietas fueron sometidas a un análisis químico proximal de acuerdo con la AOAC (2005, 2016)

Los 20 perros se dividieron de forma aleatoria en 4 grupos (n=5), el grupo uno (identificado como **GCD1**) y el tres (identificado como **GCD2**) fueron los controles que solo se alimentaron con las croquetas (alta y baja calidad – digestibilidad) sin complementación. Mientras tanto el grupo dos (identificado como **GD1ef**) y grupo cuatro (identificado como **GD2ef**) se alimentaron con las croquetas correspondientes más un sobre de *Enterococcus faecium* (Fortiflora® Purina) SP68 (1x10⁸ UFC) al día durante un periodo de 30 días, y en un sobre de *Enterococcus faecium* SP68 (1x10⁸ UFC) + inulina de agave comercial de la marca NBFoods® calculada al 1% de la ración durante un periodo de 15 días adicionales.

La cantidad de alimento se estableció mediante fórmula: $REM = 132 (PV \text{ en Kg})^{0.75}$ para perros activos (Case, 2007). Para medir el consumo total de alimento durante el tiempo de estudio, el gramaje correspondiente era ofrecido una vez al día en los comederos individuales dispuestos en cada jaula. Se realizó diario recolección y pesado del alimento sobrante antes de administrada la nueva ración.

Cuadro 5. Perfil de macronutrientes de las dietas evaluadas.

| Analito %Materia seca (MS) | Dieta 1 (D1) | Dieta 2 (D2) |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Proteína cruda | 20.1 | 33.8 |
| Extracto etéreo | 7.09 | 14.88 |
| Fibra cruda | 4.1 | 1.5 |
| Cenizas | 9.2 | 5.7 |
| ELN (Elementos libres de nitrógeno) | 53 | 42 |

Para las heces, se realizó el pesaje diario de todo lo producido por animal, así mismo se realizaba un registro de la calificación basada en la escala fecal de Bristol (Lewis SJ, 1997). Durante tres días consecutivos previos a la finalización de cada periodo de complementación se colectaron la totalidad de las heces para determinar la digestibilidad aparente de la materia seca, materia orgánica y elementos minerales. Las muestras mantuvieron en refrigeración (5° C) hasta su procesamiento en el laboratorio de bromatología II del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

13.3. Análisis de laboratorio

13.3.1. Humedad en heces

La determinación de la humedad en heces se realizó por secado en estufa, según lo establecido en AOAC 930.15 (2000). Se realizó pesaje de la muestra inicial fresca y se expuso a una temperatura de 72 a 75°C por 24 horas o hasta alcanzar peso constante, una vez realizado tal proceso, los datos se aplicaron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad heces} = \frac{\text{Peso fresco (gramos)} - \text{Peso seco (gramos)}}{\text{Peso fresco (gramos)}} \times 100$$

Para la materia seca se calculó la diferencia de 100 menos el dato anterior:

$$\% \text{MS en heces} = 100 - \% \text{humedad en heces}$$

13.3.2. Digestibilidad de MS y elementos minerales

Respetando la técnica de AOAC 930.15, se calculó la materia seca del alimento, conociendo los datos de consumo voluntario por periodo fue posible estimar los gramos materia seca ingeridos para aplicar en la siguiente fórmula (Stein 2007):

$$\% \text{Dig MS} = \frac{\text{Gramos de MS consumida} - \text{Gramos de MS defecada}}{\text{Gramos de MS consumida}} \times 100$$

Para la digestibilidad de elementos minerales, primero fue necesario obtener las cenizas por el método de calcinación establecido en AOAC 923.03 (1990) (Iturbe, 2011). Se pesa 1 gramo de muestra seca en crisoles estandarizados a peso constante (2 horas en horno a 90°C). Se realiza una pre calcinación a 90°C por aproximadamente 15 minutos (campana de extracción). Posteriormente se pasa a mufla precalentada a una temperatura de 550°C durante 5 horas como mínimo.

Una vez frías, las muestras se mezclan con solución de HCl al 25 % (5 a 10 mL) durante 20 minutos manteniendo los crisoles en una platina térmica a temperatura constante de 40°C para favorecer la digestión. Pasado este tiempo, la muestra se deja enfriar y se procede a filtrar con embudo y filtro de

poro fino en matraces de aforo de 50 ml. Se debe obtener un líquido con una coloración amarilla, y aforar con agua des ionizada. Esta solución final se almacena en frascos de polipropileno y se conoce como solución madre. A partir de ellas se realiza la medición de elementos minerales a partir de espectrofotometría de absorción atómica (Equipo Perkin Elmer).

La absorbancia de cada muestra y de cada elemento mineral, deberán obtenerse con un rango lineal definido previamente, para posteriormente obtener los miligramos de elemento mineral por cada 100 gramos de muestra (alimento y heces)

Finalmente, esos resultados se expresan en la fórmula

$$\% \text{Dig Mineral} = \frac{\text{Gramos de Mineral consumido} - \text{Gramos de Mineral defecado}}{\text{Gramos de Mineral consumida}} \times 100$$

13.4. Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente aleatorizado 2 x 2. Debido a que algunas de las variables no cumplieron supuestos de homogeneidad de varianzas, se realizaron transformaciones Box Cox ajustándose así un diseño completamente aleatorizado de un factor con cuatro niveles y con mediciones repetidas en el tiempo. A las variables que presentaron diferencias significativas se les aplicaron contrastes múltiples de Bonferroni. El programa utilizado para el análisis fue JMP versión 8.0.

14. Resultados

El Cuadro 6 resume los resultados de las digestibilidades aparentes, características fecales, consumo voluntario y peso corporal, por tratamiento, tiempo, interacción (Tx * T), periodo y las comparaciones múltiples de Bonferroni en los casos correspondientes.

Cuadro 6. Resumen de las digestibilidades aparentes y características de las heces por tratamiento y con sus comparaciones múltiples de Bonferroni.

| Parámetro | Baja calidad | | Alta calidad | | P- value | | | | |
|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|--|
| | GD1 | GD1Ef | GD2 | GD2Ef | Tx | Tiempo (T) | Tx*T | Periodo | Bonferroni |
| Digestibilidad nutriente (%) | | | | | | | | | |
| Calcio (Día 0-15) | 46.70 ± 9.90 | 45.25 ± 2.98 | 78.83 ± 14.85 | 76.52 ± 2.8 | | | | 0.0001 | GD1-GD2 (0.0025) GD1-GD2Ef (0.0003) GD1Ef-GD2 (0.0037) GD1Ef-GD2Ef (0.0004) |
| Calcio (Día 15-30) | 28.18 ± 19.08 | 49.04 ± 5.46 | 91.5 ± 12.78 | 96.71 ± 0.85 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0329 | GD1-GD1Ef (0.009) GD1-GD2 (0.0001) GD1Ef-GD2 (0.0088) GD1-GD2Ef (0.0001) |
| Calcio (Día 30-45) * | 31.79 ± 19.74 | 51.00 ± 9.90 | 97.12 ± 0.48 | 97.23 ± 0.34 | | | | 0.4194 | |
| Magnesio (Día 0-15) | 98.63 ± 0.41 | 98.43 ± 0.45 | 99.63 ± 0.15 | 99.52 ± 0.29 | 0.001 | 0.0002 | 0.0001 | 0.0001 | GD1-GD2 (0.0009) GD1-GD2Ef (0.0013) GD1Ef-GD2 (0.0010) GD1Ef-GD2Ef (0.0016) |
| Magnesio (Día 15-30) | 98.10 ± 0.84 | 98.41 ± 0.19 | 99.21 ± 0.12 | 98.98 ± 0.27 | | | | 0.0026 | GD1Ef-GD2 (0.002) |
| Magnesio (Día 30-45)* | 97.95 ± 0.49 | 98.58 ± 0.42 | 99.14 ± 0.17 | 99.11 ± 0.11 | | | | 0.8741 | |
| Hierro (Día 0-15) | 97.92 ± 0.55 | 97.83 ± 0.25 | 97.93 ± 0.93 | 98.40 ± 0.57 | | | | NA | |
| Hierro (Día 15 -30) | 97.15 ± 1.12 | 97.81 ± 0.47 | 97.99 ± 0.69 | 98.32 ± 0.67 | 0.0413 | 0.5018 | 0.4932 | NA | GD1 - GD2 (0.045) GD1 - GD2Ef (0.0069) |
| Hierro (Día 30-45) * | 96.95 ± 1.85 | 98.04 ± 0.58 | 98.59 ± 0.17 | 98.64 ± 0.14 | | | | NA | |
| Cobre (Día 0-15) | 97.41 ± 0.29 | 97.17 ± 0.91 | 97.93 ± 1.28 | 98.21 ± 0.41 | | | | 0.0009 | |
| Cobre (Día 15-30) | 97.01 ± 1.48 | 98.00 ± 0.84 | 97.39 ± 1.16 | 98.10 ± 1.37 | 0.2519 | 0.00014 | 0.4697 | 0.8586 | |
| Cobre (Día 30 -45) * | 97.32 ± 0.68 | 98.46 ± 0.46 | 97.93 ± 0.57 | 98.25 ± 0.57 | | | | 0.1504 | |
| Zinc (Día 0-15) | 99.12 ± 0.43 | 99.3 ± 0.19 | 97.17 ± 0.97 | 99.46 ± 0.27 | | | | NA | |
| Zinc (Día 15-30) | 98.85 ± 0.45 | 99.19 ± 0.20 | 99.19 ± 0.20 | 99.29 ± 0.34 | 0.3702 | 0.3063 | 0.9512 | NA | |
| Zinc (Día 30-45) * | 98.77 ± 0.74 | 99.26 ± 0.14 | 99.12 ± 0.14 | 99.14 ± 0.11 | | | | NA | |
| Materia Seca (Día 0-15) | 88.07 ± 1.98 | 84.49 ± 1.38 | 95.04 ± 0.95 | 91.28 ± 1.99 | | | | 0.0007 | |
| Materia Seca (Día 15 -30) | 80.87 ± 5.01 | 83.68 ± 1.69 | 92.05 ± 3.1 | 89.43 ± 4.27 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0152 | 0.0003 | GD1 - GD1Ef (0.0091) GD1-GD2Ef (0.0247) |
| Materia Seca (Día 30-45) ** | 72.55 ± 7.62 | 78.16 ± 2.88 | 84.23 ± 2.78 | 86.89 ± 3.62 | | | | 0.007 | |
| Características fecales | | | | | | | | | |
| Materia seca (%) Día 0-15 | 35.05 ± 3.60 | 45.49 ± 4.71 | 33.06 ± 2.29 | 42.19 ± 3.62 | | | | | |
| Materia seca (%) Día 15-30 | 44.88 ± 4.70 | 50.52 ± 4.85 | 43.51 ± 7.89 | 48.94 ± 7.80 | 0.0247 | <0.0001 | 0.1095 | 0.0014 | GD1-GD1Ef (0.0095) GD1 - GD2Ef (0.0339) GD1Ef - GD2 (0.029) |
| Materia seca (%) Día 30-45 * | 59.22 ± 7.30 | 52.81 ± 3.05 | 60.78 ± 6.96 | 55.65 ± 6.19 | | | | | |
| Producción de heces (g) Día 15-30 | 269.13 ± 58.27 | 232.20 ± 46.73 | 116.55 ± 27.06 | 120.96 ± 17.91 | | | | NA | GD1 - GD2 (0.0001) |
| Producción de heces (g) Día 30-45* | 236.03 ± 57.13 | 215.88 ± 21.74 | 114.04 ± 26.08 | 115.41 ± 24.93 | 0.0001 | 0.1238 | 0.5818 | NA | GD1 - GD2Ef (0.0001) GD1Ef - GD2 (0.0002) |
| Otros | | | | | | | | | |
| Consumo voluntario (g) Día 15-30 | 333.4 ± 60.85 | 362 ± 10.95 | 272.53 ± 58.18 | 283.73 ± 39.99 | 0.0650 | 0.0250 | 0.1221 | 0.1379 | |
| Consumo voluntario (g) Día 15-30* | 327.69 ± 67.92 | 360.07 ± 12.18 | 300.12 ± 52.37 | 290.85 ± 34.01 | | | | 0.0186 | |
| Peso corporal inicial (Kg) | 20.6 ± 2.16 | 21.5 ± 2.03 | 20.1 ± 3.78 | 20.3 ± 1.6 | | | | | |
| Peso corporal final (Kg) Day 45 | 19.42 ± 2.7 | 19.7 ± 2.11 | 19.7 ± 4.12 | 20 ± 1.22 | 0.9742 | 0.0050 | 0.2374 | | |

14.1. Digestibilidad aparente de elementos minerales

(Crampton y Lloyd 1959)

14.1.1. Calcio

Para este elemento mineral se encontró una diferencia significativa en la interacción del tiempo * tratamiento (T*tx) ($p = 0.0001$). La digestibilidad aparente del calcio presentó una diferencia significativa entre el día 0-15 ($p = 0.0001$), y 15-30 ($p < 0.0329$), más no así entre el día 30 a 45 ($p = 0.4197$). Para determinar los tratamientos entre los que existió diferencia significativa se realizaron comparaciones múltiples de Bonferroni que pueden observarse en el Cuadro 6. Figura 4.

14.1.2. Magnesio

De forma similar al calcio, el magnesio expresó una diferencia significativa en la interacción del tiempo * tratamiento (T*tx) ($p = 0.0001$). La diferencia se presentó entre los días 0-15 ($p = 0.0001$), y entre el 15 -30 ($p = 0.0026$). Para determinar los tratamientos entre los que hubo diferencia significativa se realizaron comparaciones múltiples de Bonferroni que pueden observarse en el Cuadro 6. El periodo entre el día 30 y 45 no mostró diferencias significativas ($p = 0.8741$). Figura 4.

14.1.3. Hierro

Para la digestibilidad de hierro, se encontraron diferencias entre tratamientos ($p = 0.0413$), de acuerdo a las comparaciones múltiples, los tratamientos con diferencia son el GD1 vs GD2 (entre dietas) y GD1 vs GD2Ef (dieta 1 no complementadas vs dieta 2 complementada). Figura 4.

14.1.4. Cobre

El cobre únicamente presentó diferencia significativa en el tiempo ($p = 0.00014$), sin efecto del tratamiento o dieta. Figura 4.

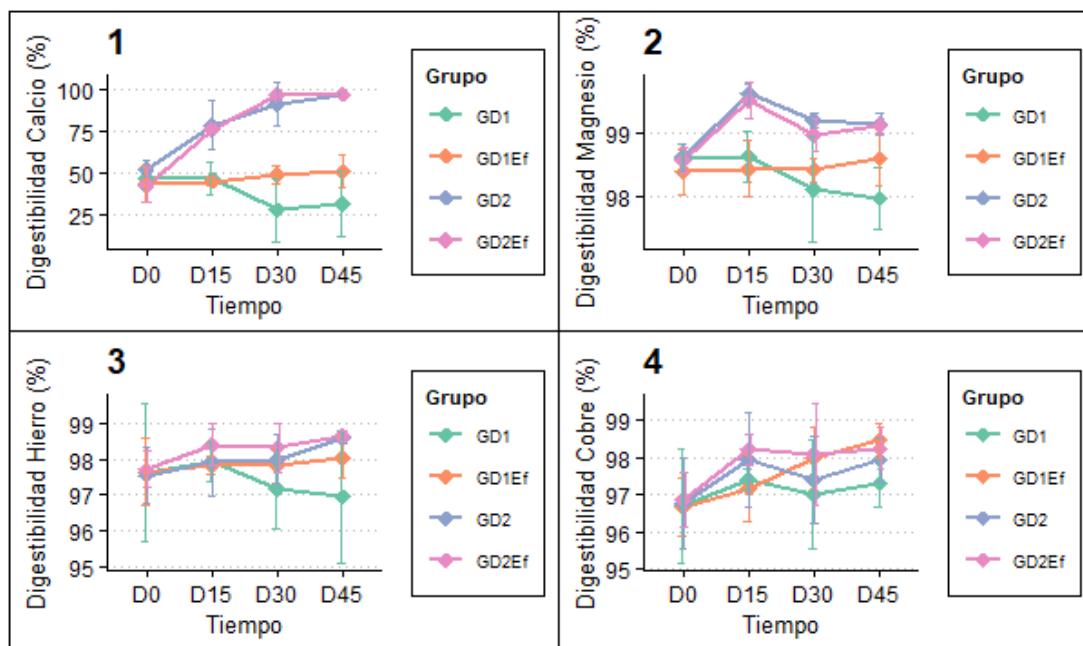


Figura 4. Digestibilidad aparente de elementos minerales por grupo a través del tiempo. 1) Calcio, 2) Magnesio, 3) Hierro, 4) Cobre.

14.2. Digestibilidad Materia Seca

Para la digestibilidad de materia seca hubo diferencia significativa en la interacción entre tiempo * tratamiento (T*tx) ($p=0.0095$), sólo para el tiempo 15 a 30 ($p=0.0007$), por su parte, el tiempo del día 30 al 45 no fue significativo ($p=0.411$). Figura 7. Para identificar los tratamientos entre los que existió diferencia en el periodo del día 15 a 30, se realizaron comparaciones múltiples de Bonferroni. Cuadro 6. Figura 5.

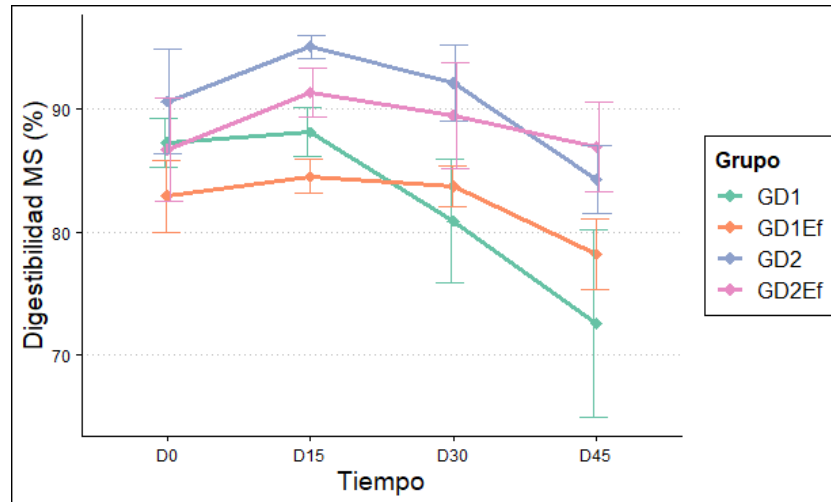


Figura 5. Digestibilidad de la materia seca (%) por grupo a través del tiempo.

14.3. Consumo voluntario (Minson 1990)

El consumo voluntario presentó diferencia estadísticamente significativa únicamente para el tiempo ($p=0.0250$), en el periodo correspondiente al día 30 a día 45 ($p=0.0186$). Cuadro 6. Figura 6.

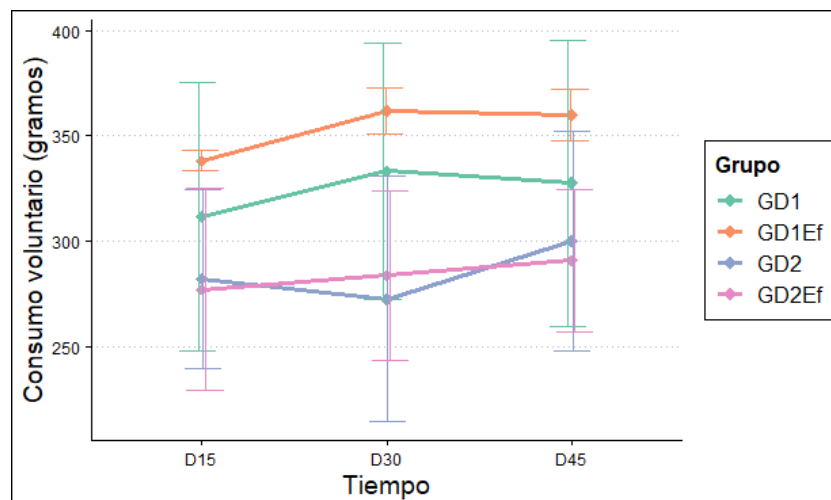


Figura 6. Consumo voluntario (gramos) por grupo a través del tiempo.

14.4. Producción de heces

Para las heces producidas se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.0001$). Se realizaron comparaciones múltiples de Bonferroni para identificar los tratamientos que fueron diferentes. Cuadro 6. Figura 7.

14.5. Materia seca en heces

Para el porcentaje de materia seca en las heces, se encontró una diferencia significativa entre tratamientos ($p=0.027$) y entre tiempos ($p= 0.0001$), no así entre la interacción tiempo x tratamiento ($p=0.1095$). El tiempo en que se encontró una diferencia significativa, fue el correspondiente al día 15 – 30 ($p = 0014$), y para identificar los tratamientos que fueron diferentes, realizaron comparaciones múltiples de Bonferroni. Cuadro 6. Figura 7.

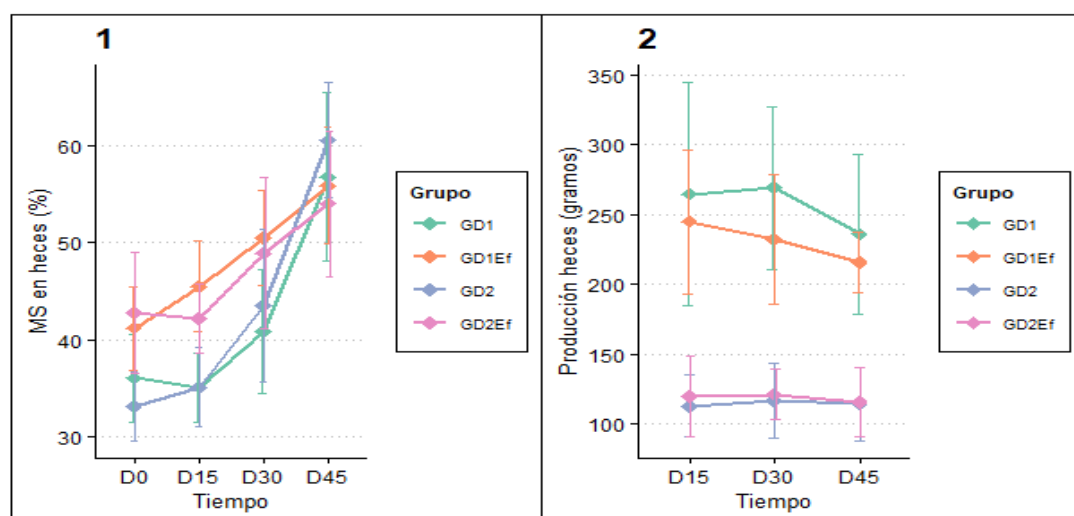


Figura 7. 1) Materia seca en heces (%) y 2) producción total de heces (g) por grupo a través del tiempo.

14.6. Peso corporal

Para la diferencia entre el peso inicial y el peso final de los sujetos experimentales, no se encontró efecto por tratamiento ($p=0.9742$) ni por la interacción tiempo x tratamiento ($p=0.2374$). Sólo se identificó una diferencia en el tiempo, peso inicial (día 0) – peso final (día 45) ($p=0.005$). Cuadro 6. Figura 8.

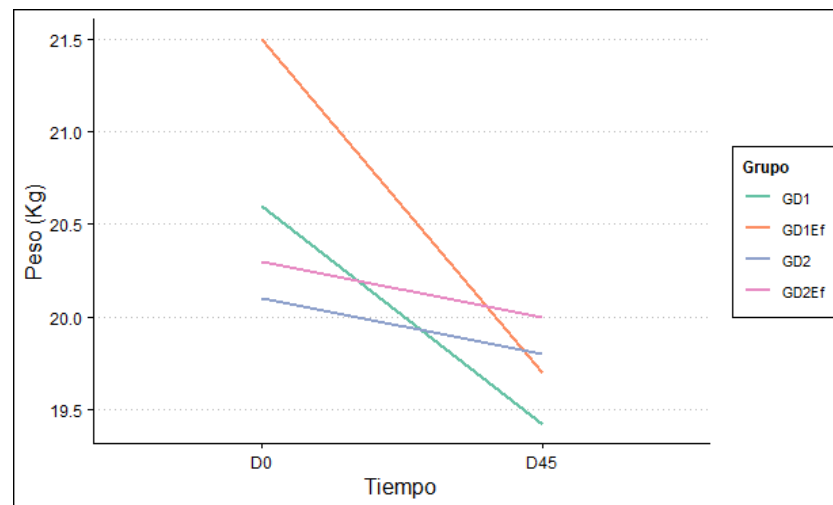


Figura 8. Peso inicial y peso final (Kg) por grupo a través del tiempo.

15. Discusión

Los alimentos comerciales para perros rigen su elaboración en los estándares establecidos por AFFCO (América) y FEDIAF (Europa), con la intención de mantener los requerimientos mínimos necesarios para la especie (Burdett 2018). La calidad de una dieta se puede valorar con el grado de digestibilidad de sus nutrientes, que a su vez utiliza de herramienta la calidad de las heces medida a partir de la escala de Bristol. Heces firmes y bien formadas son indicativo de una adecuada salud gastrointestinal, mientras que heces acuosas, sin forma o con volumen incrementado, son indicativos de diarrea cuyo origen puede ser la calidad alimentaria y el acúmulo de nutrientes no digeridos (diarrea osmótica) (Marks 2013).

Con la finalidad de mejorar estos parámetros, existen complementos como las fibras prebióticas (inulina, achicoria, FOOS, MOOS) (Rose 2017), y los probióticos (microorganismos vivos de diferentes cepas conocidas) (Nixon 2019), que tienen la capacidad de generar cambios en el ambiente intestinal (microbioma) cuando se administran junto con o adicional a la dieta base.

15.1. Digestibilidad aparente de elementos minerales

15.1.1. *Calcio y magnesio*

Actualmente, los alimentos comerciales para perro están diseñados bajo recomendaciones de límites mínimos y máximos de nutrientes establecidos por asociaciones como AAFCO y NRC. Por lo regular la investigación de los macronutrientes y su digestibilidad son abundantes, pero la información respecto a la absorción de micronutrientes, es escasa (Cargoo-Froom 2019). Los productos comerciales disponibles no sólo se centran en cumplir con los aportes adecuados, sino también en la biodisponibilidad de las fuentes que emplean, la capacidad de absorción de las mismas y las posibles interacciones con otros nutrientes, siendo más marcadas estas características en los alimentos considerados de gama alta contra los alimentos básicos o de gama baja. De

forma adicional, se ha buscado la implementación de complementos como los probióticos y fibras prebióticas como la inulina para mejorar el nivel de absorción de nutrientes como el calcio y el magnesio (Scholz 2002). En el presente estudio fue posible observar que la complementación con *Enterococcus faecium* SF68 (1×10^8 UFC) por un periodo de 30 días, incrementó la digestibilidad aparente de calcio (28.19% GCD1 vs 49.05% GD1Ef). Este efecto ha sido descrito por Chawla (2013) quien demostró una mayor biodisponibilidad de calcio en pollos complementados con una dosis de 2.8×10^8 UFC/ Kg, y por Moura (2011) quien demostró que la complementación de una mezcla de 1×10^8 UFC/g de *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y 10^5 UFC/ g de levadura *S. cerevisiae* mejora la digestibilidad aparente de calcio en caballos adultos en comparación con animales no complementados (42.18% vs 49.55%). La mejora en la absorción de este elemento mineral en el tracto gastrointestinal se debe a un incremento en su solubilidad, que se ha asociado fuertemente a una reducción del pH duodenal, consecuencia de la fermentación bacteriana que genera ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta.

Como particularidad de la digestibilidad aparente del calcio, se encontró una diferencia significativa entre la dieta de baja calidad sin complemento y la dieta de alta calidad con y sin complemento. Esto se puede deber a la biodisponibilidad y fuentes de calcio empleadas entre dietas. El carbonato y citrato de calcio son los principales complementos comerciales de calcio, seguidos de presentaciones como los fosfatos, gluconatos, lactatos, malatos y otras sales. La mezcla de fuentes permite incrementar la solubilidad y disponibilidad del elemento mineral. El alimento de alta calidad reporta en su etiqueta el uso de carbonato de calcio (40% de Ca, con solubilidad de 46 g/L) + ortofosfato de calcio (17 al 36% de Ca, con solubilidad de 21 g/L) (Shkenbi 2022). El alimento de baja calidad, no reporta en su etiqueta su(s) fuente(s) de Ca, limitando la información a "sales", por lo que se desconoce si se emplean mezclas o un solo tipo de sal, y por ende la posible biodisponibilidad. Esto último también puede explicar la diferencia entre las dietas de alta y baja calidad complementadas (GD1Ef vs GD2Ef), asumiendo que la participación de las fuentes de calcio utilizadas entre dietas, es determinante en el grado de absorción aparente, adicional a la complementación.

Respecto a la digestibilidad aparente del magnesio, la dieta de baja calidad complementada y sin complementar (GD1 y GD1Ef) fue diferente a los grupos de dieta de alta calidad. Esto indica que las variaciones se asocian más con las fuentes del elemento mineral utilizadas en ambos productos que con la complementación. La biodisponibilidad y solubilidad del magnesio depende gran medida de si proviene de una fuente orgánica (citrato p.ej) o inorgánica (óxido p.ej), siendo las primeras las de mayor solubilidad, pero contenido limitado de elemento mineral (Blancquaert 2019). El alimento de alta calidad reporta uso de sulfato de magnesio, mientras que la dieta de baja calidad no especifica y mantiene el uso general de óxidos y/o sales.

La inclusión de fibras prebióticas y la combinación simbiótica (prebióticos + probióticos), también ha mostrado cambios en el pH que favorecen la solubilización – absorción de calcio y magnesio (Bielik 2021). En el presente estudio la complementación de inulina con fines simbióticos no demostró ningún beneficio sobre la absorción de estos elementos minerales para ninguna de las dietas (día 30 a 45 de complementación). Esto también puede deberse a que de acuerdo a un estudio reciente de Perini (2020), el tiempo mínimo para observar efectos positivos en parámetros inmunológicos y fecales en perros, con una complementación al 1% (como la empleada en el presente experimental), debe realizarse por lo menos a 60 días, y para observar mejores resultados en un periodo ≤ 40 días, se sugiere que la dosis sea más elevada.

15.1.2. Hierro

El hierro es un elemento mineral cuya absorción es principalmente a nivel de duodeno y en estado ferroso (Fe^{2+}). En la dieta puede presentarse en dos formas: no heme (cereales y vegetales) y heme (carne), siendo esta última la que tiene mejor grado de absorción y biodisponibilidad. (Dinaz 2012; Darius 2015; Gulec 2014). De forma general, la capacidad del duodeno para absorber hierro, es limitada. (Dinaz 2012; Mc Cown 2011)

Para el caso del hierro, se encontraron diferencias significativas entre la dieta de baja calidad no complementada y los dos grupos de la dieta de alta calidad

(con y sin complemento). Esto puede deberse netamente a la diferencia en la biodisponibilidad del hierro a partir de los ingredientes empleados entre las dietas.

De acuerdo con Hurrell (2010), existen dos formas de hierro dietario, el no heme que está presente en plantas, cereales y cárnicos, y el heme que es más común en tejidos de origen animal. Este último contribuye en más del 40 % del hierro absorbido en el tracto gastrointestinal. Además de este factor, es importante tomar en cuenta posibles inhibidores o potencializadores de la absorción de este elemento mineral. Los inhibidores incluyen fitatos y poli fenoles presentes en frutas, vegetales y cereales, cantidades elevadas de calcio en la dieta y proteínas de la leche y el huevo. Por otra parte, el principal potencializador es el ácido ascórbico, seguido de la inclusión de tejido cárnico.

La dieta 1 (baja calidad) tiene dentro de sus primeros ingredientes: Cereales y derivados, menudencias de pollo y/o res y/o puerco y/o pastas de oleaginosas, grasa animal y aceite vegetal. La dieta 2 (alta calidad) por su parte, contiene: harina de subproductos de pollo, harina de carne y hueso, harina de pescado, maíz arroz y trigo.

La mayor parte de las comparativas de digestibilidad entre fuentes de proteína e ingredientes están enfocados a los macronutrientes (Vanelli 2021). El estudio más cercano que compara la digestibilidad de elementos minerales incluyendo los elementos traza, a partir de dietas vegetales vs animales no mostró diferencias significativas para el hierro (Vegetal 114% vs Animal 140% en digestibilidad verdadera), por lo que podría pensarse en más estudios que relacionen estas características con nutrientes menos considerados como los traza.

15.2. Digestibilidad Materia seca

Algunos estudios previos en perros no han demostrado un efecto sobre la digestibilidad aparente de materia seca al emplear probióticos como complementos. Biourge (1998) reportó que el uso de dosis generales de

probióticos de 7.5×10^8 UFC/ día; no resultaban en una modificación positiva de este parámetro. Yang Sun (2019) en un estudio con *Weissella cibara* JW15 a dosis de 3×10^8 y 3×10^9 tampoco encontró efectos sobre la materia seca (digestibilidad de 86.99 vs 87.12; $p=0.4080$). Estudios comparables en animales de producción, han tenido resultados diferentes. Yan Kim (2013) complementó dos dietas de diferente densidad energética (baja y alta) para cerdos en crecimiento, con *Enterococcus faecium* DSM7134 a dosis de 1×10^{10} UFC/g durante 6 semanas, encontrando un incremento en la digestibilidad de materia seca tras el uso del probiótico (74.9% vs 79.3% en la dieta de alta densidad energética y 73.5% vs 77.6% en la dieta de baja densidad energética). Este efecto es similar al descrito en el presente experimental, en el que la dieta de baja calidad, tuvo una diferencia significativa en el parámetro mencionado (80.86 % vs 83.68%) durante el periodo (día 15 a 30) en el que se complementó el probiótico *Enterococcus faecium* SF68 a dosis de 1×10^8 UFC/g. Efecto que se mantuvo durante el periodo de complementación de fibra a partir de inulina (72.55% vs 78.16%), lo cual puede reflejar un posible efecto simbiótico positivo entre inulina + *E. faecium* para este parámetro analizado. De acuerdo a lo descrito en animales de producción, esto se explica por la posible interacción de los microorganismos a nivel intestinal, que en conjunto con la fibra, mejora el balance, metabolismo y transformación del alimento, facilitando su digestión y utilización.

Durante el periodo de complementación probiótico + inulina (día 30 a 45), también fue posible encontrar una diferencia significativa ($p = 0.007$), a favor del grupo complementado (78.16% vs 72.55%), lo cual puede implicar que en la digestibilidad de la materia seca, si existe un efecto simbiótico. Esto contrasta con Lee (2022), quién reportó que la digestibilidad de materia seca, es menor tras administrar una dieta complementada con inulina y lactobacilos (digestibilidad control 85.2% vs digestibilidad simbiótico 74.9%, $p = <0.0001$). Pinna (2018) menciona que los oligosacáridos no digeribles, como la inulina y los fructooligosacáridos (FOS), se asocian a una mejor digestibilidad de macro y micronutrientes.

15.3. Producción y % materia seca en heces

La producción de las heces se relaciona de forma inversa con la calidad de la dieta, es decir que a mayor grado de digestibilidad (calidad), menor será el volumen de las excreciones, además de resultar más sólidas y mejor formadas (Brambillasca;2010). Do (2021) comparó características fecales en perros alimentados con dietas de diferente calidad basada en el tipo de ingredientes, incluyendo de grado humano que hipotéticamente debe tener un alto nivel de digestibilidad; concluyendo que la calidad de la dieta reduce el volumen fecal (31.85 gr/día vs 11.15 gr/día),. Bermingham (2017) evaluó que una dieta de mejor digestibilidad de proteína y energía, resulta en una menor producción de heces diarias (70.4 gr/día vs 24.9 gr/día). De forma similar en este estudio, fue posible observar una menor producción de heces en la dieta de alta calidad (con y sin complemento) respecto a la dieta de baja calidad (GD1: 17gr/día; GD1Ef: 15.35 gr/día vs GD2: 7.6gr; GD2Ef 7.8 gr/día).

Bruni (2020) demostró que la complementación de *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL a dosis de 5×10^{10} UFC/g durante 28 días, reduce la cantidad de humedad en heces generando mejores características fecales, esto tanto en Labrador Retriever como en Cocker Spaniel. Por su parte, Portella (2010), reporta que una dieta complementada con *Bacillus subtilis* durante 25 días, modifica la materia seca en heces (36.5% grupo control vs 39.1% grupo probiótico), similar a lo encontrado en el presente estudio a los 30 días (GD1: 44.88% vs GD1EF : 50.52%). Cabe mencionar que este efecto sólo se observó en la complementación de la dieta de baja calidad, lo cual implicaría que una dieta de alta digestibilidad, no se vería mejorada por el uso de probióticos como complementos.

15.4. Consumo voluntario y peso vivo

El consumo voluntario de alimento se incrementó a lo largo del tiempo, independientemente a los tratamientos. Por ello se puede asumir que fue una respuesta de preferencia intrínseca, sabiendo que los animales regulan su consumo voluntario para cubrir sus requerimientos y mantener la homeostasis (Alegría-Morán 2019).

El peso de los animales tuvo un comportamiento directamente inverso al consumo voluntario. Se redujo la media general (20.65 vs 19.70) pero sin generar un efecto negativo en la condición corporal ni masa muscular (WASAVA). Por lo que se puede relacionar con la capacidad de regulación que tienen los animales, así como los factores intrínsecos y extrínsecos que determinan su consumo voluntario, gasto energético y mantenimiento del peso vivo (Bermingham;2014).

16. Conclusiones

La complementación de *Enterococcus faecium* SF68 (Fortiflora® Purina) a dosis de 1×10^8 durante 30 días, puede incrementar la digestibilidad aparente de calcio y materia seca, así como reducir la producción de heces y en nivel de humedad en las mismas, particularmente cuando la dieta es de baja digestibilidad, aunque el grado de aprovechamiento o de mejoras en las características fecales, no alcanza a ser similar al de una dieta de alta digestibilidad. La mejor absorción de hierro y cobre, son atribuibles sólo al tipo de dieta. La complementación adicional de inulina + probiótico únicamente modifica la digestibilidad de la materia seca, requiriéndose probablemente más tiempo de uso en conjunto para generar un efecto simbiótico mayor.

17. Referencias

- Alessandri, G., Milani, C., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Lugli, G. A., Viappiani, A., Duranti, S., Turroni, F., Ossiprandi, M. C., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2019). Metagenomic dissection of the canine gut microbiota: insights into taxonomic, metabolic and nutritional features. *Environmental Microbiology*, 21(4), 1331–1343. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14540>
- Algya, K. M., Cross, T. W. L., Leuck, K. N., Kastner, M. E., Baba, T., Lye, L., de Godoy, M. R. C., & Swanson, K. S. (2018). Apparent total-tract macronutrient digestibility, serum chemistry, urinalysis, and fecal characteristics, metabolites and microbiota of adult dogs fed extruded, mildly cooked, and raw diets. *Journal of Animal Science*, 96(9), 3670–3683. <https://doi.org/10.1093/jas/sky235>
- Allaway, D., Haydock, R., Lonsdale, Z. N., Deusch, O. D., O'Flynn, C., & Hughes, K. R. (2020). Rapid reconstitution of the fecal microbiome after extended diet-induced changes indicates a stable gut microbiome in healthy adult dogs. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(13), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.00562-20>
- Arboleda, M. (2017). Estudio de la oferta y la demanda de productos de mascotas relacionados con la alimentación y los accesorios en la ciudad de Medellín para determinar oportunidades de innovación y desarrollo de nuevos productos. *Tesis Maestría*, 400.
- Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M. L., Maqbool, K., Webster, M. T., Perloski, M., Liberg, O., Arnemo, J. M., Hedhammar, Å., & Lindblad-Toh, K. (2013). The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*, 495(7441), 360–364. <https://doi.org/10.1038/nature11837>
- Benyacoub, J., Czarnecki-maulden, G. L., Cavadini, C., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J., & Weid, T. Von Der. (2003). *Supplementation of Food with Enterococcus faecium (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs*

1. September 2002, 1158–1162.

- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome d1. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(1):1–22. efinition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1–22.
- Bermingham, E. N., Young, W., Kittelmann, S., Kerr, K. R., Swanson, K. S., Roy, N. C., & Thomas, D. G. (2013). *Dietary format alters fecal bacterial populations in the domestic cat (Felis catus)*. 173–181. <https://doi.org/10.1002/mbo3.60>
- Bresciani, F., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S., Galiazzo, G., Vecchiato, C. G., Pinna, C., Biagi, G., & Pietra, M. (2018). Effect of an extruded animal protein-free diet on fecal microbiota of dogs with food-responsive enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1903–1910. <https://doi.org/10.1111/jvim.15227>
- Case, L., Daristole, L., Hayek, M., & Foess, M. (2011). *Canine and feline nutrition* (M. Elsevier (ed.); 3 th).
file:///C:/Users/youhe/Downloads/kdoc_o_00042_01.pdf
- Daniel, W. (2010). *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud* (4 th). Limusa Wiley.
- Deng, P., & Swanson, K. S. (2015). *Gut microbiota of humans , dogs and cats : current knowledge and future opportunities and challenges q British Journal of Nutrition British Journal of Nutrition*.
<https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
- Food, E., & Authority, S. (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Cylactin® (Enterococcus faecium) as a feed additive for cats and dogs. *EFSA Journal*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3098>
- Freeman, L. (2011). Guía para la evaluación Nutricional. *Clin. Vet. Peq. Anim*,

31(2), 91–102.

García, A. (2019). *Implementación de técnicas de extracción de ADN a partir de líquido ruminal para la detección e identificación de microorganismos mediante PCR*. UNAM.

Ghattargi, V. C., Gaikwad, M. A., Meti, B. S., Nimonkar, Y. S., Dixit, K., Prakash, O., Shouche, Y. S., Pawar, S. P., & Dhotre, D. P. (2018). *Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in Enterococcus faecium strains*. 1–16.

Green 1954-, M. R. (Michael R. (2012). *Molecular cloning : a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook* (J. Sambrook & C. S. H. Laboratory (eds.)). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Grze, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015). *Anaerobe Microbiota and probiotics in canine and feline welfare*. 34, 14–23.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>

Hang, I., Heilmann, R. M., Grützner, N., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., de Vos, W. M., Zentek, J., & Spillmann, T. (2013). *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*, 9.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-201>

Herstad, K. M. V., Gajardo, K., Bakke, A. M., Moe, L., Ludvigsen, J., Rudi, K., Rud, I., Sekelja, M., & Skancke, E. (2017). *A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs*. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1073-9>

Holzappel, Arini, A. (2018). *Enterococcus faecium SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics Abstract*. *Beneficial Microbes*, 9(3), 375–388. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0148>

Hooda, S., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S., & Swanson, K. S. (2012). *Current state*

of knowledge : the canine gastrointestinal microbiome. 13(1), 78–88.
<https://doi.org/10.1017/S1466252312000059>

Inness, V. L., McCartney, A. L., Khoo, C., Gross, K. L., & Gibson, G. R. (2007).
Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to Desulfovibrio spp . 91, 48–53.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00640.x>

Iturbe, F. (2011). *Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas* (UNAM (ed.); 1a ed.).

Jha, A. R., Shmalberg, J., Tanprasertsuk, J., Perry, L. A., Massey, D., & Honaker, R. W. (2020). Characterization of gut microbiomes of household pets in the United States using a direct-to-consumer approach. *PLoS ONE*, 15(2), 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227289>

Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G. R., Rastall, R. A., & McCartney, A. L. (2010).
chronic diarrhoea. 71 (day 4), 304–312. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00812.x>

Jugan, M. C., Rudinsky, A. J., Parker, V. J., & Gilor, C. (2017). Use of probiotics in small animal veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 250(5), 519–528.
<https://doi.org/10.2460/javma.250.5.519>

Kim, J., An, J. U., Kim, W., Lee, S., & Cho, S. (2017). Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathogens*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>

Kuba, I., Lauková, A., Hamarová, L., Prista, P., & Stropfová, V. (2018).
Evaluation of enterococci for potential probiotic utilization in dogs.

Lagkouvardos, Ilias, Overmann, Jörg, Clavel, T. (2017). *Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota*. 8(5), 493–503.

- Lam, M. M. C., Seemann, T., Bulach, D. M., Gladman, S. L., Chen, H., Haring, V., Moore, R. J., Ballard, S., Grayson, M. L., Johnson, P. D. R., Howden, B. P., & Stinear, T. P. (2012). *Comparative Analysis of the First Complete Enterococcus faecium*. 2334–2341. <https://doi.org/10.1128/JB.00259-12>
- Lee, A. H., Lin, C. Y., Do, S., Oba, P. M., Belchik, S. E., Steelman, A. J., Schauwecker, A., & Swanson, K. S. (2022). Dietary supplementation with fiber, “biotics,” and spray-dried plasma affects apparent total tract macronutrient digestibility and the fecal characteristics, fecal microbiota, and immune function of adult dogs. *Journal of Animal Science*, 100(3), 1–15. <https://doi.org/10.1093/jas/skac048>
- Lewis SJ. (1997). Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(9), 920–924. doi: 10.3109/00365529709011203
- Lucena, R., Olmedilla, A. B., Blanco, B., Novales, M., & Ginel, P. J. (2018). *Effect of Enterococcus faecium SF68 on serum cobalamin and folate concentrations in healthy dogs AND*. 1–6. <https://doi.org/10.1111/jsap.12845>
- Lyu, Y., Su, C., Verbrugghe, A., Wiele, T. Van De, & Summers, K. L. (2020). *Past , Present , and Future of Gastrointestinal Microbiota Research in Cats*. 11(July). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01661>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Marzec, A., & Feleszko, W. (2020). *Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics 2* . 1–17.
- Michel, K. E. (2006). Unconventional Diets for Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 36(6), 1269–1281. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.003>
- Middelbos, I. S., Fastinger, N. D., & Fahey, G. C. (2007). Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber

standards. *Journal of Animal Science*, 85(11), 3033–3044.
<https://doi.org/10.2527/jas.2007-0080>

Middelbos, Ingmar S., Boler, B. M. V., Qu, A., White, B. A., Swanson, K. S., & Fahey, G. C. (2010). Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE*, 5(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>

Mills, S., Stanton, C., Lane, J. A., Smith, G. J., & Ross, R. P. (2019). Precision nutrition and the microbiome, part I: Current state of the science. *Nutrients*, 11(4), 1–45. <https://doi.org/10.3390/nu11040923>

Minelli, E. B., Benini, A., Minelli, E. B., & Benini, A. (2009). *Microbial Ecology in Health and Disease Relationship between number of bacteria and their probiotic effects Relationship between number of bacteria and their probiotic effects*. 2235. <https://doi.org/10.1080/08910600802408095>

Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M., & Di Leone, A. (2019). Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Veterinary Journal*, 9(3), 253–258. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i3.10>

Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., & Bermingham, E. N. (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *MicrobiologyOpen*, 7(5), 1–20. <https://doi.org/10.1002/mbo3.677>

Mori, A., Goto, A., Kibe, R., Oda, H., & Kataoka, Y. (2019). *Comparison of the effects of four commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiome in healthy dogs*. 1783–1790.
<https://doi.org/10.1292/jvms.19-0055>

Nie, Y., Lin, Q., & Luo, F. (2017). Effects of non-starch polysaccharides on inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071372>

Nixon, S. L., Rose, L., & Muller, A. T. (2019). Efficacy of an orally administered anti-

diarrheal probiotic paste (Pro-Kolin Advanced) in dogs with acute diarrhea: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1286–1294.
<https://doi.org/10.1111/jvim.15481>

Officials, A. of A. F. C. (2011). *Association of American Feed Control Officials official publication*.

Perini, M. P., Rentas, M. F., Pedreira, R., Amaral, A. R., Zafalon, R. V. A., Rodrigues, R. B. A., Henríquez, L. B. F., Zanini, L., Vendramini, T. H. A., Balieiro, J. C. C., Pontieri, C. F. F., & Brunetto, M. A. (2020). Duration of prebiotic intake is a key-factor for diet-induced modulation of immunity and fecal fermentation products in dogs. *Microorganisms*, 8(12), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8121916>

Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2020). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>

Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2021). The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 51(3), 605–621. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.002>

Pinna, C., Bonaldo, A., Stefanelli, C., Vecchiato, C. G., Zaghini, G., & Biagi, G. (2018). Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative endproducts, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. *BMC Vet. Res.*, 17(1), 106.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1459210>

Raditic, D. M. (2021). Insights into Commercial Pet Foods. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 51(3), 551–562.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.013>

Roberfroid, M. B. (2002). Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(2), S139–S143. doi: 10.1079/BJN/2002529

- Sandri, M., Dal Monego, S., Conte, G., Sgorlon, S., & Stefanon, B. (2017). Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC Veterinary Research*, *13*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0981-z>
- Santaniello, A., Sansone, M., Fioretti, A., & Menna, L. F. (2020). *Systematic Review and Meta-Analysis of the Occurrence of ESKAPE Bacteria Group in Dogs , and the Related Zoonotic Risk in Animal-Assisted Therapy , and in Animal-Assisted Activity in the Health Context.*
- Suchodolski, J. S. (2011). Companion animals symposium: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, *89*(5), 1520–1530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>
- Suchodolski, Jan S. (2005). Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *Am J Vet Res*, *66*, 1555–1562. <https://doi.org/https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1556>
- Suchodolski, Jan S. (2016a). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Veterinary Journal*, *215*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Suchodolski, Jan S. (2016b). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. In *Veterinary Journal* (Vol. 215, pp. 30–37). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Suchodolski, Jan S., Foster, M. L., Sohail, M. U., Leutenegger, C., Queen, E. V., Steiner, J. M., & Marks, S. L. (2015). The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127378>
- Tilocca, B., Pieroni, L., Soggiu, A., Britti, D., Bonizzi, L., Roncada, P., & Greco, V. (2020). Gut–brain axis and neurodegeneration: State-of-the-art of meta-omics sciences for microbiota characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21114045>

- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., Fahey, G. C. J., & Swings, J. (2005). Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.003>
- Verdonk, J. M. A. J., Shim, S. B., van Leeuwen, P., & Verstegen, M. W. A. (2005). Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S125–S138. <https://doi.org/10.1079/bjn20041355>
- Vital, M., Gao, J., Rizzo, M., Harrison, T., & Tiedje, J. M. (2015). Diet is a major factor governing the fecal butyrate-producing community structure across Mammalia, Aves and Reptilia. 832–843. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.179>
- Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., Macleay, J. M., Jewell, D. E., Suchodolski, J. S., Waite, D. W., & Petri, R. M. (2020). *The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease*. 11(June), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266>
- Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 56(1), 2.4.1–2.4.5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Xu, J., Verbrugghe, A., Lourenço, M., Cools, A., Liu, D. J. X., Wiele, T. Van De, Marzorati, M., Eeckhaut, V., Immerseel, F. Van, Vanhaecke, L., Campos, M., & Hesta, M. (2017). *The response of canine faecal microbiota to increased dietary protein is influenced by body condition*. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1276-0>
- Yang, Y. W., Chen, M. K., Yang, B. Y., Huang, X. J., Zhang, X. R., He, L. Q., Zhang,

- J., & Hua, Z. C. (2015). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(19), 6749–6756. <https://doi.org/10.1128/AEM.01906-15>
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Ballèvre, O., & Rochat, F. (2003). Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *87*(11–12), 397–407. <https://doi.org/10.1046/j.0931-2439.2003.00451.x>
- Zishiri, O. (2018). *Prevalence of virulence genes in Enterococcus species isolated from companion animals and livestock*. 1–8.
- Weaver CM, Heaney RP. Calcium. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, et al, eds. *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006;198
- Alessandri, G., Milani, C., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Lugli, G. A., Viappiani, A., Duranti, S., Turrone, F., Ossiprandi, M. C., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2019). Metagenomic dissection of the canine gut microbiota: insights into taxonomic, metabolic and nutritional features. *Environmental Microbiology*, *21*(4), 1331–1343. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14540>
- Algya, K. M., Cross, T. W. L., Leuck, K. N., Kastner, M. E., Baba, T., Lye, L., de Godoy, M. R. C., & Swanson, K. S. (2018). Apparent total-tract macronutrient digestibility, serum chemistry, urinalysis, and fecal characteristics, metabolites and microbiota of adult dogs fed extruded, mildly cooked, and raw diets. *Journal of Animal Science*, *96*(9), 3670–3683. <https://doi.org/10.1093/jas/sky235>
- Allaway, D., Haydock, R., Lonsdale, Z. N., Deusch, O. D., O'Flynn, C., & Hughes, K. R. (2020). Rapid reconstitution of the fecal microbiome after extended diet-induced changes indicates a stable gut microbiome in healthy adult dogs. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(13), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.00562-20>

- Arboleda, M. (2017). Estudio de la oferta y la demanda de productos de mascotas relacionados con la alimentación y los accesorios en la ciudad de Medellín para determinar oportunidades de innovación y desarrollo de nuevos productos. *Tesis Maestría*, 400.
- Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M. L., Maqbool, K., Webster, M. T., Perloski, M., Liberg, O., Arnemo, J. M., Hedhammar, Å., & Lindblad-Toh, K. (2013). The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*, 495(7441), 360–364.
<https://doi.org/10.1038/nature11837>
- Benyacoub, J., Czarnecki-maulden, G. L., Cavadini, C., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J., & Weid, T. Von Der. (2003). *Supplementation of Food with Enterococcus faecium (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs 1. September 2002*, 1158–1162.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome d1. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(1):1–22. efnition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1–22.
- Bermingham, E. N., Young, W., Kittelmann, S., Kerr, K. R., Swanson, K. S., Roy, N. C., & Thomas, D. G. (2013). *Dietary format alters fecal bacterial populations in the domestic cat (Felis catus)*. 173–181. <https://doi.org/10.1002/mbo3.60>
- Bresciani, F., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S., Galiazzo, G., Vecchiato, C. G., Pinna, C., Biagi, G., & Pietra, M. (2018). Effect of an extruded animal protein-free diet on fecal microbiota of dogs with food-responsive enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1903–1910.
<https://doi.org/10.1111/jvim.15227>
- Case, L., Daristole, L., Hayek, M., & Foess, M. (2011). *Canine and feline nutrition* (M. Elsevier (ed.); 3 th).

file:///C:/Users/youhe/Downloads/kdoc_o_00042_01.pdf

Daniel, W. (2010). *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud* (4 th). Limusa Wiley.

Deng, P., & Swanson, K. S. (2015). *Gut microbiota of humans , dogs and cats : current knowledge and future opportunities and challenges q British Journal of Nutrition British Journal of Nutrition.*
<https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>

Food, E., & Authority, S. (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Cylactin® (Enterococcus faecium) as a feed additive for cats and dogs. *EFSA Journal*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3098>

Freeman, L. (2011). Guía para la evaluación Nutricional. *Clin. Vet. Peq. Anim*, 31(2), 91–102.

García, A. (2019). *Implementación de técnicas de extracción deADN a partir de líquido ruminal para ladetección e identificación de microorganismosmediante PCR.* UNAM.

Ghattargi, V. C., Gaikwad, M. A., Meti, B. S., Nimonkar, Y. S., Dixit, K., Prakash, O., Shouche, Y. S., Pawar, S. P., & Dhotre, D. P. (2018). *Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in Enterococcus faecium strains.* 1–16.

Green 1954-, M. R. (Michael R. (2012). *Molecular cloning : a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook* (J. Sambrook & C. S. H. Laboratory (eds.)). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Grze, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015). *Anaerobe Microbiota and probiotics in canine and feline welfare.* 34, 14–23.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>

Hang, I., Heilmann, R. M., Grützner, N., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., de Vos, W. M., Zentek, J., & Spillmann, T. (2013). *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*, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-201>
- Herstad, K. M. V., Gajardo, K., Bakke, A. M., Moe, L., Ludvigsen, J., Rudi, K., Rud, I., Sekelja, M., & Skancke, E. (2017). A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1073-9>
- Holzapfel, Arini, A. (2018). Enterococcus faecium SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics Abstract. *Beneficial Microbes*, 9(3), 375–388. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0148>
- Hooda, S., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S., & Swanson, K. S. (2012). *Current state of knowledge : the canine gastrointestinal microbiome*. 13(1), 78–88. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000059>
- Inness, V. L., McCartney, A. L., Khoo, C., Gross, K. L., & Gibson, G. R. (2007). *Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to Desulfovibrio spp . 91*, 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00640.x>
- Iturbe, F. (2011). *Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas* (UNAM (ed.); 1a ed.).
- Jha, A. R., Shmalberg, J., Tanprasertsuk, J., Perry, L. A., Massey, D., & Honaker, R. W. (2020). Characterization of gut microbiomes of household pets in the United States using a direct-to-consumer approach. *PLoS ONE*, 15(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227289>
- Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G. R., Rastall, R. A., & McCartney, A. L. (2010). *chronic diarrhoea*. 71(day 4), 304–312. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00812.x>
- Jugan, M. C., Rudinsky, A. J., Parker, V. J., & Gilor, C. (2017). Use of probiotics in small animal veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary*

Medical Association, 250(5), 519–528.

<https://doi.org/10.2460/javma.250.5.519>

Kim, J., An, J. U., Kim, W., Lee, S., & Cho, S. (2017). Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathogens*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>

Kuba, I., Lauková, A., Hamarová, L., Prista, P., & Strompfová, V. (2018). *Evaluation of enterococci for potential probiotic utilization in dogs.*

Lagkouvardos, Ilias, Overmann, Jörg, Clavel, T. (2017). *Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota.* 8(5), 493–503.

Lam, M. M. C., Seemann, T., Bulach, D. M., Gladman, S. L., Chen, H., Haring, V., Moore, R. J., Ballard, S., Grayson, M. L., Johnson, P. D. R., Howden, B. P., & Stinear, T. P. (2012). *Comparative Analysis of the First Complete Enterococcus faecium.* 2334–2341. <https://doi.org/10.1128/JB.00259-12>

Lee, A. H., Lin, C. Y., Do, S., Oba, P. M., Belchik, S. E., Steelman, A. J., Schauwecker, A., & Swanson, K. S. (2022). Dietary supplementation with fiber, “biotics,” and spray-dried plasma affects apparent total tract macronutrient digestibility and the fecal characteristics, fecal microbiota, and immune function of adult dogs. *Journal of Animal Science*, 100(3), 1–15. <https://doi.org/10.1093/jas/skac048>

Lewis SJ. (1997). Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(9), 920–924. doi: 10.3109/00365529709011203

Lucena, R., Olmedilla, A. B., Blanco, B., Novales, M., & Ginel, P. J. (2018). *Effect of Enterococcus faecium SF68 on serum cobalamin and folate concentrations in healthy dogs AND.* 1–6. <https://doi.org/10.1111/jsap.12845>

Lyu, Y., Su, C., Verbrugghe, A., Wiele, T. Van De, & Summers, K. L. (2020). *Past*,

Present , and Future of Gastrointestinal Microbiota Research in Cats.
11(July). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01661>

- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Marzec, A., & Feleszko, W. (2020). *Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics 2* . 1–17.
- Michel, K. E. (2006). Unconventional Diets for Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 36(6), 1269–1281. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.003>
- Middelbos, I. S., Fastinger, N. D., & Fahey, G. C. (2007). Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. *Journal of Animal Science*, 85(11), 3033–3044. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0080>
- Middelbos, Ingmar S., Boler, B. M. V., Qu, A., White, B. A., Swanson, K. S., & Fahey, G. C. (2010). Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
- Mills, S., Stanton, C., Lane, J. A., Smith, G. J., & Ross, R. P. (2019). Precision nutrition and the microbiome, part I: Current state of the science. *Nutrients*, 11(4), 1–45. <https://doi.org/10.3390/nu11040923>
- Minelli, E. B., Benini, A., Minelli, E. B., & Benini, A. (2009). *Microbial Ecology in Health and Disease Relationship between number of bacteria and their probiotic effects Relationship between number of bacteria and their probiotic effects.* 2235. <https://doi.org/10.1080/08910600802408095>
- Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M., & Di Leone, A. (2019). Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Veterinary Journal*, 9(3), 253–258. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i3.10>
- Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., & Bermingham, E. N.

- (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *MicrobiologyOpen*, 7(5), 1–20. <https://doi.org/10.1002/mbo3.677>
- Mori, A., Goto, A., Kibe, R., Oda, H., & Kataoka, Y. (2019). Comparison of the effects of four commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiome in healthy dogs. 1783–1790. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0055>
- Nie, Y., Lin, Q., & Luo, F. (2017). Effects of non-starch polysaccharides on inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071372>
- Nixon, S. L., Rose, L., & Muller, A. T. (2019). Efficacy of an orally administered anti-diarrheal probiotic paste (Pro-Kolin Advanced) in dogs with acute diarrhea: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1286–1294. <https://doi.org/10.1111/jvim.15481>
- Officials, A. of A. F. C. (2011). *Association of American Feed Control Officials official publication*.
- Perini, M. P., Rentas, M. F., Pedreira, R., Amaral, A. R., Zafalon, R. V. A., Rodrigues, R. B. A., Henriques, L. B. F., Zanini, L., Vendramini, T. H. A., Balieiro, J. C. C., Pontieri, C. F. F., & Brunetto, M. A. (2020). Duration of prebiotic intake is a key-factor for diet-induced modulation of immunity and fecal fermentation products in dogs. *Microorganisms*, 8(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121916>
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2020). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2021). The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 51(3), 605–621. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.002>

- Pinna, C., Bonaldo, A., Stefanelli, C., Vecchiato, C. G., Zaghini, G., & Biagi, G. (2018). Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative endproducts, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. *BMC Vet. Res.*, *17*(1), 106. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1459210>
- Raditic, D. M. (2021). Insights into Commercial Pet Foods. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *51*(3), 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.013>
- Roberfroid, M. B. (2002). Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, *87*(2), S139–S143. doi: 10.1079/BJN/2002529
- Sandri, M., Dal Monego, S., Conte, G., Sgorlon, S., & Stefanon, B. (2017). Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC Veterinary Research*, *13*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0981-z>
- Santaniello, A., Sansone, M., Fioretti, A., & Menna, L. F. (2020). *Systematic Review and Meta-Analysis of the Occurrence of ESKAPE Bacteria Group in Dogs , and the Related Zoonotic Risk in Animal-Assisted Therapy , and in Animal-Assisted Activity in the Health Context.*
- Suchodolski, J. S. (2011). Companion animals symposium: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, *89*(5), 1520–1530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>
- Suchodolski, Jan S. (2005). Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *Am J Vet Res*, *66*, 1555–1562. <https://doi.org/https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1556>
- Suchodolski, Jan S. (2016a). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Veterinary Journal*, *215*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>

- Suchodolski, Jan S. (2016b). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. In *Veterinary Journal* (Vol. 215, pp. 30–37). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Suchodolski, Jan S., Foster, M. L., Sohail, M. U., Leutenegger, C., Queen, E. V., Steiner, J. M., & Marks, S. L. (2015). The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127378>
- Tilocca, B., Pieroni, L., Soggiu, A., Britti, D., Bonizzi, L., Roncada, P., & Greco, V. (2020). Gut–brain axis and neurodegeneration: State-of-the-art of meta-omics sciences for microbiota characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21114045>
- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., Fahey, G. C. J., & Swings, J. (2005). Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiology Letters*, *249*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.003>
- Verdonk, J. M. A. J., Shim, S. B., van Leeuwen, P., & Verstegen, M. W. A. (2005). Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *British Journal of Nutrition*, *93*(S1), S125–S138. <https://doi.org/10.1079/bjn20041355>
- Vital, M., Gao, J., Rizzo, M., Harrison, T., & Tiedje, J. M. (2015). Diet is a major factor governing the fecal butyrate-producing community structure across Mammalia, Aves and Reptilia. 832–843. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.179>
- Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., Macleay, J. M., Jewell, D. E., Suchodolski, J. S., Waite, D. W., & Petri, R. M. (2020). The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. *11*(June), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266>
- Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, *56*(1), 2.4.1–2.4.5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>

- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, *334*(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Xu, J., Verbrugghe, A., Lourenço, M., Cools, A., Liu, D. J. X., Wiele, T. Van De, Marzorati, M., Eeckhaut, V., Immerseel, F. Van, Vanhaecke, L., Campos, M., & Hesta, M. (2017). *The response of canine faecal microbiota to increased dietary protein is influenced by body condition*. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1276-0>
- Yang, Y. W., Chen, M. K., Yang, B. Y., Huang, X. J., Zhang, X. R., He, L. Q., Zhang, J., & Hua, Z. C. (2015). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(19), 6749–6756. <https://doi.org/10.1128/AEM.01906-15>
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Ballèvre, O., & Rochat, F. (2003). Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *87*(11–12), 397–407. <https://doi.org/10.1046/j.0931-2439.2003.00451.x>
- Zishiri, O. (2018). *Prevalence of virulence genes in Enterococcus species isolated from companion animals and livestock*. 1–8.

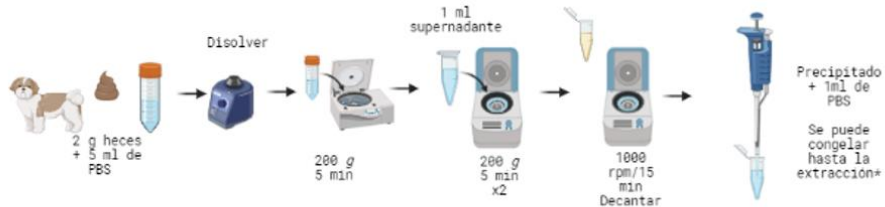
18. ANEXOS

18.1. ANEXO I. Lista de ingredientes de los alimentos empleados en el experimental.

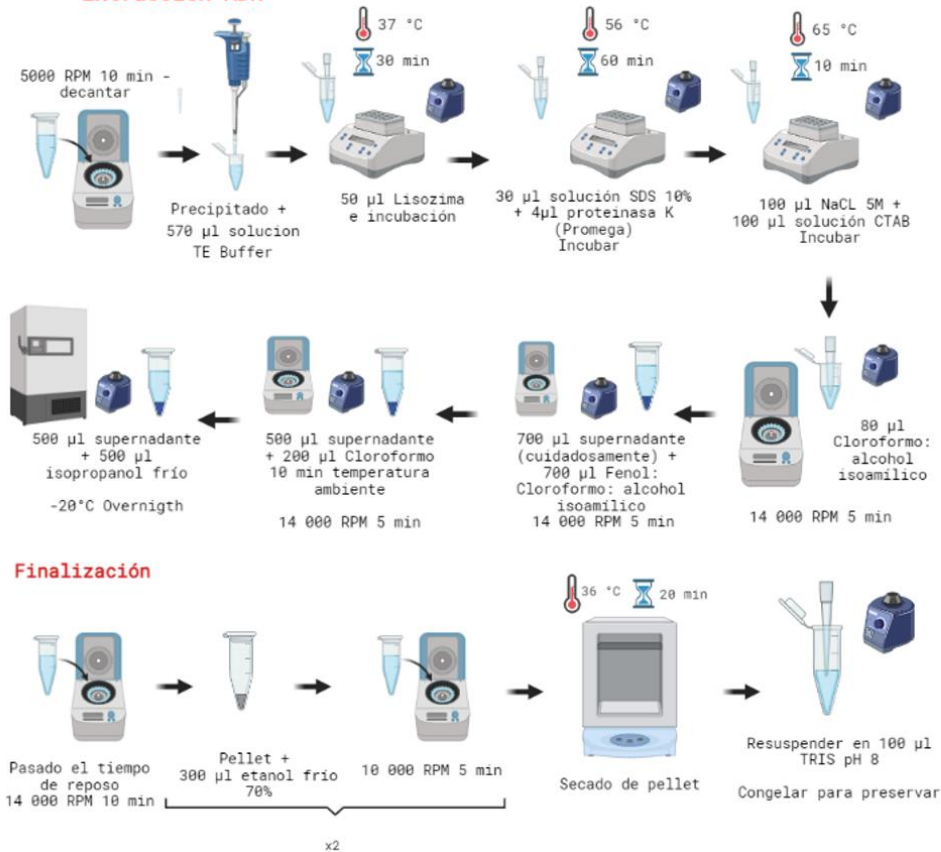
| Alimento 1 Alta digestibilidad | Alimento 2 Baja digestibilidad |
|--|--|
| <p>Carne de pollo, maíz, harina proteica de pollo, trigo, gluten de maíz, grasa animal (res y/o cerdo) preservada con tocoferoles (fuente de vitamina E y ácidos grasos omega 6), hidrolizado de pollo y/o cerdo, levadura seca de cervecera inactiva (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ssp.), pulpa de remolacha, ortofosfato y/o carbonato de calcio, arroz, cloruro de potasio, aminoácidos (lisina, metionina y taurina), zeolita, inulina, cloruro de sodio**, aceite de pescado y/o harina de alga (<i>Schizochytrium</i> sp.) fuente de EPA y ácido graso omega 3, vitaminas [A, C, D3, E, K3, mononitrato de tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), pantotenato de calcio (B5), hidrocloreto de piridoxina (B6), biotina (B7), ácido fólico (B9), cianocobalamina (B12)], BHT, sorbato de potasio, pirofosfato tetrasódico (TSPP), spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>), cloruro de colina, minerales , huevo.</p> | <p>Cereales y sus derivados, harina y/o subproductos (menudencias) de pollo y/o res y/o puerco y/o pastas de oleaginosas, grasas de res y/o puerco y/o pollo (conservada con BHA/BHT) y/o aceite vegetal, sabor natural y/o artificial de pollo y/o puerco y/o res, colorantes de origen natural y/o artificiales, sal yodatada, antioxidante (BHA/BHT). Vitaminas: suplementos de colina, vitamina E, riboflavina (B2), ácido pantoténico (B5), cobalamina (B12), vitamina A, vitamina D. Minerales: óxidos y/o sales de potasio, zinc, yodo y cobre.</p> |

18.2. ANEXO II. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN. TOMADO DE WILSON 2001, EDITADO GARCÍA 2019.

Preparación



Extracción ADN



18.3. ANEXO III. ARTÍCULO PUBLICADO.

High levels of dietary digestible protein transiently promote beneficial bacteria in adult dog feces

Karina Elizabeth Cosío-Carpintero¹

0000-0002-3908-0234

Carlos Gutiérrez Olvera¹

0000-0002-7089-7159

Claudia Cecilia Márquez-Mota¹

0000-0002-4310-389X

María Esther Ortega-Cerilla²

0000-0003-0971-5160

María Guadalupe Sánchez-González³

0000-0009-0253-0360

Lilia Gutiérrez Olvera⁴

0000-0002-4823-0388

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Inmunología y Nutrición Animal, Ciudad de México, México

²Instituto de Investigación en Alimentos y Productos Alimentarios, Colegio de Post-Graduados, Km. 36.5, México 865, Morelia, Michoacán, México

³Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Genética y Biología Celular, Ciudad de México, México

⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Patología y Farmacología, Ciudad de México, México

*Corresponding author

Email address:

lilago@unam.mx

Submitted: 2022-08-26

Accepted: 2022-09-09

Published: 2022-02-01

Additional information and declarations can be found on page 11

© Copyright 2022

Karina Elizabeth Cosío-Carpintero et al.

open access



Distributed under Creative Commons CC BY 4.0

Abstract

Nowadays, many commercial dog diets select the ingredients not only to meet the needs of the individual and maintain a balance between nutrition/microbiome/health; fiber and protein quality is known to be one of the most important factors in this balance. Diets high in low digestible protein tend to favor microorganisms that when fermenting amino acids generate substances that induce inflammation, while high digestible protein and fermentable fibers have been related to beneficial bacteria. The study's objective was to identify changes in the relative abundance of specific microorganisms (*Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius*, *Bacteroides fragilis* and *Fusobacterium varium*) by PCR (polymerase chain reaction), associated with two diets of different quality and digestibility. Twenty adult dogs were used, divided into two groups, the first one fed with a high digestibility diet (HD) (n = 10), the second one with a low digestibility diet (LD) (n = 10). After 3 days of adaptation to the diet, fecal samples were taken at days 15 and 30. The results showed that the high-quality diet promotes a transient increase (15 days) in the relative abundance of *F. varium* and *E. faecium*, as well as a persistent increase in that of *L. salivarius* and *B. fragilis* until day 30. Apparently, however, healthy adult dogs eventually balance their fecal microbiota, regardless of the dietary protein level and digestibility. Therefore, it is difficult to identify clear patterns of the ideal dietary profile in this species.

Keywords: dog; microbiota; diet; quality; protein-digestibility.

Cite this as:

Cosío-Carpintero KE, Gutiérrez Olvera C, Márquez Mota CC, Ortega-Cerilla ME, Sánchez-González MG, Gutiérrez Olvera L. High levels of dietary digestible protein transiently promote beneficial bacteria in adult dog feces. *Veterinaria México OA*. 2022;9. doi: [10.22201/vmex.24486760e.2022.985](https://doi.org/10.22201/vmex.24486760e.2022.985).

Study contribution

Intestinal microbiota is an important topic in gastroenteric human and veterinary health. This study shows that high levels of digestible protein transiently promote beneficial bacteria in dog feces. It also demonstrated that, at least in healthy dogs, a low digestibility diet does not increase the abundance of pathogenic bacteria. Therefore, healthy dogs on either high or low protein content and digestibility diets can standardize and balance their microbiota.

Introduction

Dog and cat nutrition is an area that has gained interest recently. Nowadays, processed animal feed is designed not only to nourish but also to offer health benefits through the ingredients used in their formulation.^(1,2) Macronutrients, such as carbohydrates, fats, and protein, have a great impact on the intestinal microbiome in cats and dogs.⁽³⁻⁴⁾ Hence, intense research has focused on studying the interactions between microorganisms, food, and host, both in healthy and diseased animals.⁽⁵⁾

Part of the main associations found, include the fermentation of non-digestible carbohydrates, such as fiber. This dietary component favors greater production of volatile fatty acids, specifically butyrate, which is a nutritional source for enterocytes and has antineoplastic properties, thus being a fundamental part of gastrointestinal health.^(6,3) Conversely, proteins and amino acids used by proteolytic bacteria tend to increase fecal pH and stimulate the production of harmful metabolites for the intestine, such as ammonia, indoles and phenols.^(3,7)

Key microorganisms that actively participate in fermentative processes, such as *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* have also been identified.⁽⁸⁾ Some of these microorganisms interact with each other modify the microenvironment, prevent the colonization of pathogens, intervene in the digestion of some nutrients, and stimulate the immune system.^(9,10) Others, such as *Clostridium perfringens*, increase the concentration of putrefaction compounds,^(11,8) as well as biogenic amines that generate possible inflammatory effects, associated with chronic diseases.⁽⁹⁾ These predominant microorganisms can maintain stability, which is undoubtedly altered positively or negatively depending mainly on the diet consumed by the animal.⁽¹¹⁾

Studies on how protein, fiber, carbohydrates, and other nutrients influence the microbiota have been increasing and have focused on comparing raw diets (BARF – Biologically Appropriate Raw Food) with commercial diets. It has been observed that food with high protein and fat, obtained from natural sources, reduce the proportion of genera such as *Lactobacillus* spp., *Paralactobacillus* spp., and *Prevotella* spp.,⁽¹²⁾ as well as *Proteobacteria*.⁽⁵⁾ Other studies that have evaluated the effect of protein and its sources (by-products) have determined that high concentrations of this macronutrient favor *Fusobacteria*.⁽¹³⁾ Other studies on functional fibers and prebiotics, such as inulin and fructans, have reported a reduction in the concentration of *Fusobacteria* as well as an increase in *Firmicutes*, although results may vary across individuals.⁽¹⁴⁾

The digestibility of the diet also plays an essential role in the microbiome. Everything that is not digested and absorbed in the small intestine by the animal represents a substrate available for bacteria in the colon.⁽⁴⁾ This study aimed to evaluate the effect of protein digestibility and the quality of two processed diets on the relative abundance of specific microorganisms.

Materials and methods

Ethical statement

This study was evaluated and approved by the Institutional Subcommittee for the Care and Use of Experimental Animals (SICUAE), Faculty of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico, with protocol number DC-2018/2-10.

Animals

Twenty clinically healthy, non-sterilized adult dogs, 15 females and 5 males, different breeds between 2 and 6 years old, with an average weight of 7 kg, were used in a completely randomized design. Two groups were randomly formed; the food selection was made considering the parameters established by AFTCO (2011) for dogs in maintenance. The first group was fed with high protein kibble (>22% CP in DM), high energy density (>3500 kcal/100 g) and protein digestibility greater than 75% (high quality-digestibility (HD)); the second group was fed a minimum level of protein (20% CP in DM), low energy density (<3200 kcal/100 g) and protein digestibility less than 75% low quality-low digestibility (LD).

A 3-day adaptation period to the new food was contemplated to avoid digestive problems. To determine the amounts to be offered, the energy requirement of the animals was calculated individually and based on the following formula:⁽¹⁵⁾

$$\text{Maintenance energy requirement (REM)} = (\text{live weight})^{0.75} \times 95 \text{ kcal}$$

All animals were kept in house conditions, without cage confinement, with access to the yard to reduce stress, without additional food and evaluated for the presence of undesirable behaviors such as coprophagia. At the beginning, middle and end of the experimental period, the body condition, muscle mass and weight of the animals were evaluated.

Food

The food was weighed for individual administration to each experimental subject, offered in a daily intake in which total consumption was guaranteed. The offered food was subjected to a bromatological study to determine moisture, crude protein (CP), crude fat, crude fiber, ashes, carbohydrates, as well as true protein (TP), indigestible protein (IP), *in vitro* protein digestibility (IVPD), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF). All these analyses were performed according to the reference methods of AOAC International,⁽¹⁶⁾ except for NDF and ADF⁽¹⁷⁾ (Table 1).

Table 1. Means and standard deviations of proximate chemical composition (n = 3) of the experimental diets (wet basis)

| Analyte (%) | Diet ¹ | |
|-------------------------|-------------------|-------------|
| | HD | LD |
| Moisture | 5.0 ± 0.87 | 7.5 ± 0.42 |
| Crude protein | 33.8 ± 0.28 | 20.1 ± 2.1 |
| Crude fat | 14.9 ± 0.01 | 7.1 ± 0.01 |
| Crude fiber | 1.5 ± 0.2 | 4.1 ± 0.01 |
| Ashes | 5.7 ± 0.01 | 9.0 ± 0.01 |
| Carbohydrates | 42.0 ± 1.25 | 53.0 ± 1.8 |
| True protein | 33.6 ± 0.07 | 19.1 ± 0.01 |
| Indigestible protein | 9.6 ± 0.01 | - |
| Protein digestibility | 71.8 ± 0.09 | 12.3 ± 0.28 |
| Neutral detergent fiber | 10.3 ± 0.32 | 8.5 ± 0.2 |
| Acid detergent fiber | 28.6 ± 0.36 | 31.5 ± 0.15 |

¹ HD: high quality and digestibility; LD: low quality and digestibility

Stool samples

Samples were collected on the day the transition was completed (0, 15, and 30) of the experimental period. Excreta were collected immediately after defecation, ensuring that they did not touch the ground. Hermetic bags were used to preserve them and kept in deep-freezing conditions (-70 °C).

DNA extraction

For DNA extraction, the bacterial pellet was first obtained using 2 g of samples and 5 mL of 1× PBS (1.57 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄). A modified centrifugation was performed at 200 × g for 5 min and 1 mL of the supernatant was recovered in a 2 mL Eppendorf tube. To obtain a cleaner pellet, two more centrifugation steps (200 × g for 5 min) were performed, decanting the liquid and recovering the pellet at each step, ending with a centrifugation at 10 000 rpm for 15 min and recovering the pellet in 1 mL of 1 × PBS.

In the final pellet, bacterial genomic (BG) DNA was extracted using a modified cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB, 10%) technique^(16, 17) that includes precipitation in isopropanol leaving the sample under refrigeration for at least 12 h. We used the following modifications of the technique: A) Re-suspend the pellet obtained from washing in 570 µL of TE buffer + 50 µL of lysozyme (10 mg/mL) incubating at 37 °C for 30 min. B) Incubate at 56 °C for 1 h after the addition of 30 µL sodium dodecyl sulfate + 4 µL proteinase K.

The integrity of the DNA was confirmed by agarose gel electrophoresis (0.8 % agarose) run at 70 V and 300 mA for 45 min. The DNA was visualized using a gel photodocumentation system (Figure 1). Subsequently, quantifications were performed in a Nanodrop® spectrophotometer.



Figure 1. Example of a visualized gel showing bacterial genomic DNA integrity

Real-time PCR

All samples were standardized at 4 ng/mL of DNA concentration, from which qPCR was performed using the KAPA SYBR® FAST for light cycler® 480 kit. The reaction volume was 12 µL (6µL KAPA SYBR® FAST + 3.4 µL nuclease-free molecular biology grade water + 0.6 µL forward and reverse primers + 2 µL sample). The following primers were used for detecting microorganisms targeting a fragment of the 16S gene. (Table 2) The samples were carried out in duplicate on the Rotor Gene® with an initial denaturation step (95° C/3 min), followed by 35 cycles of denaturation (95 °C/30 s), primer annealing (specific for each microorganism, see Table 2), amplification (72 °C/30 s), and final extension (72 °C/3 min).

The results were analyzed with the Qxpress® program. The obtained cycle time (Ct) threshold values were considered acceptable in replicates that differed by a maximum of one cycle from each other. Relative abundance was determined (Microsoft® Excel) by the $\Delta\Delta C_t$ method.⁽¹⁸⁾ The universal primer was used as reference Ct and the day zero sampling Ct as controls. We used the following formula to calculate the $\Delta\Delta C_t$:

$$\begin{aligned} \Delta C_t A &= C_t \text{ of the target microorganism} - \text{Average reference } C_t \\ \Delta C_t B &= \text{Day 0 } C_t \text{ (control) of the target microorganism} - \text{Average reference } C_t \\ \Delta\Delta C_t &= \text{Average } \Delta C_t B - \Delta C_t A \end{aligned}$$

The $\Delta\Delta C_t$ value was then used to calculate the relative abundance (RA):

$$RA = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Statistical analysis

The experiment had a completely randomized design with two treatments, each one with ten replicates. The results of relative abundance were analyzed with the IBM® SPSS® Statistics program, version 23. Normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Levene's test) were evaluated⁽¹⁹⁾; by not complying with

Table 2. Forward (F) and reverse (R) primers used to amplify a fragment of the 16S gene

| Microorganism | Sequence | Amplicon size (bp) | Annealing temperature (°C) |
|---------------------------------|--|--------------------|----------------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | F: CAGTTCGGCCATACAA R: GGATTCCTTCCGCTTGGAC | 131 | 57 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | F: TGA AAC TGG GAG ACT TGA GTG C R: CTT AGG TAA GGT TCT TCG CGT TGC | 100 | 55 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | F: GCAAGCCCGCACCTG R: GTTACTCTCATCCTTGTCTCTC | 160 | 54 |
| <i>Fusobacterium varium</i> | F: GGGATGTCAAACCGCTGG R: GGGGCTGAGGTTCCGAG | 143 | 57 |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | F: GTTCTCCTACGGCTACCTGTATCCG R: TTCTCAGTTCGGATTGATGGCTG | 225 | 57 |
| Universal | F: ACTCTACCGGAGGGCAGCAG R: ATTACCGGGCTGG | 136 | 60 |

the assumptions for parametric tests, non-parametric tests were used, working with ranges for the results.

We compared the bacterial abundance between diets over time by using the Mann Whitney U test (rank-sum). The Kruskal Wallis test was used to evaluate the differences between the relative abundance of each microorganism. Finally, to determine whether there was a difference in the relative bacterial abundance of the diets over time, the Friedman test was used as an alternative to ANOVA for paired samples. A P-value ($P < 0.05$) was considered a statistically significant difference. All the original values (relative abundance) were transformed into ranks for analysis.

Results

Main rank of relative abundance between diets

Table 3 shows the difference in the main rank of relative abundance of each microorganism between diets over time. We observed a higher abundance of the microorganisms *Fusobacterium varium* and *Enterococcus faecium* in the first 15 days of consumption and *Lactobacillus salivarius* and *Bifidobacterium animalis* after 30 days of consumption of the HD diet.

Main rank of relative abundance of populations

The main rank of relative abundances of the populations of microorganisms did not change significantly during the study period per diet offered (Figure 2).

Main rank of relative abundance between days 15 and 30

Fecal samples from animals on the HD diet had higher overall bacterial relative abundance ($P = 0.025$) on day 15 than on day 30 post administration: main rank 2 (range 1-2) and 1 (range 1-2), respectively. Conversely, overall bacterial relative abundance was similar ($P = 0.180$) at 15 and 30 days post administration in the

Table 3. Main rank of relative abundance of microorganisms in the feces of dogs*

| Microorganism | Day 15 | | P-value | Day 30 | | P-value |
|----------------------|------------------------------|----------------------------|----------|------------------------------|----------------------------|---------|
| | Diet | | | Diet | | |
| | HD | LD | | HD | LD | |
| <i>C. parvifrons</i> | 12.3 (4-20) | 8.7 (2-16) | 0.1900 | 10.5 (6-18) | 10.7 (2-20) | 0.9120 |
| <i>F. varium</i> | 14.7 ^a (10-20) | 6.3 ^b (3-14) | 0.0010 | 13.1 (8-20) | 7.9 (2-16) | 0.0520 |
| <i>L. salivarius</i> | 15.1 ^a (10-20) | 5.9 ^b (2-12) | < 0.0001 | 13.4 ^a (8-20) | 7.6 ^b (2-16) | 0.0280 |
| <i>E. faecium</i> | 14.7 ^a (10-20) | 6.3 ^b (3-14) | 0.0010 | 11.5 (4-20) | 9.5 (2-18) | 0.4810 |
| <i>B. fragilis</i> | 13.9 ^a (8-20) | 7.1 ^b (4-16) | 0.0090 | 13.5 ^a (10-18) | 7.5 ^b (2-20) | 0.0230 |

* Diets at 15 and 30 days post administration (n = 10)

¹ HD: high quality and digestibility; LD: low quality and digestibility

^{a,b} Different superscripts within the same row denote a statistically significant difference (P < 0.05) according to a Mann Whitney U test.

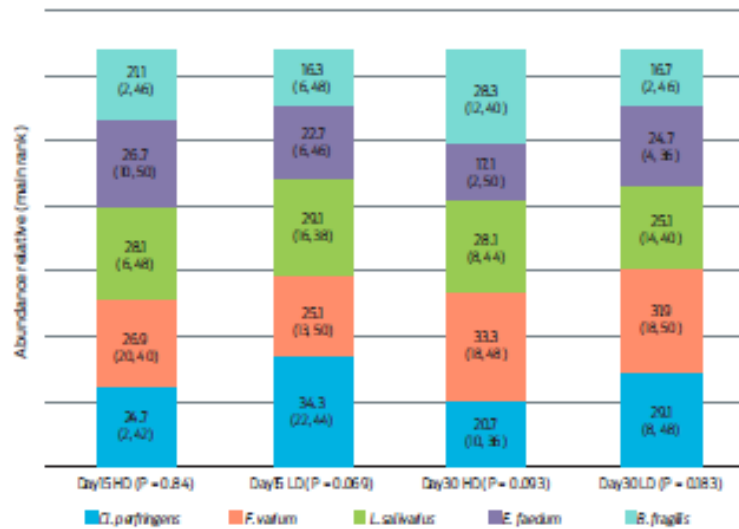


Figure 2. Main rank (range) of relative abundance of bacterial species under study in the feces of dogs (n = 10) fed either high (HD) or low (LD) protein and digestibility diets at 15 and 30 days post-administration.

feces of dogs fed the LD diet: main ranks 1.2 (range 1-2) and 1.8 (range 1-2) respectively.

Discussion

Current nutrition in dogs seeks to meet the physiological requirements of the animals and generate greater intestinal integrity and health, which is reflected in the health of the individual, ranging from the immune system to possible repercussions on mental health.⁽²⁰⁾ It is becoming increasingly evident how diet affects the intestinal microbiota, not only within an individual, since it differs between individuals.⁽³⁾

Given these facts, it is evident that in many cases it has not been possible to establish clear patterns for an ideal dietary profile. Still, it allows us to think of tailor-made or individual diet profiles that lead to this "healthy gut" balance. Several studies on microbiome, have established that the intestinal anatomophysiology differs between species or breeds as there is an evident individual variability.⁽²¹⁾ This situation is usually reflected in the results that show that even with changes in the diet, the microbiome tends to return to a balance.⁽⁵⁾

This "dietary" balance depends on multiple factors such as the use of antibiotics, stress, infectious processes, and chronic diseases. When the individual homeostasis is broken, generating alterations such as colitis, malabsorption syndromes, or persistent diarrhea can lead to the individual's death.⁽¹⁰⁾ The microorganism associated with this type of digestive disorder is *Clostridium perfringens*. Experimental evidence^(6,12,13) has shown that environments rich in protein and with high amounts of amino acids promote the growth of both *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*, microorganisms related to inflammatory processes.⁽²²⁾ For instance, a study reported an increase in the concentration of *C. perfringens* (from 3.3 to > 8 log(CFU/g feces) in dogs under high-protein diets (> 40 % CP) with low quality and digestibility.⁽²²⁾

Despite expecting a similar change, in this study, it was impossible to associate the protein digestibility of the diet with an increase in the relative abundance of *C. perfringens*. Thus, it appears that even if the diet has low digestibility and allows a colonic environment rich in amino acids, the microbiome can stabilize the growth of possible pathogens in response to the presence of other nutrients or intrinsic factors of a healthy dog.⁽²³⁾ In our study, the stool consistency was not evaluated, nor was the diet evaluated for more than 30 days.

The results of *Fusobacterium varium* obtained in our study are similar to those reported by Mori,⁽²⁴⁾ who compared the microbiome of healthy dogs fed with four prescription diets. In that study, high relative abundance of *Fusobacterium* was found when the animals consumed a diet with the highest level of crude protein (30 %) (abundances: 7.6 vs. 2.9, 1.4, and 0). Here, the higher crude protein diet (33.8 vs. 20.1 %) resulted in a higher relative abundance of *Fusobacterium* (14.7 vs. 6.3). However this effect was only significant for the first 15 days.

Moinard also reported an increase in *Fusobacterium* when the diet was high in protein (29.3 % CP).⁽²⁵⁾ *Fusobacterium* spp. is considered an amino acid fermenter, which is sometimes related to the presentation of digestive disorders. Hang⁽¹³⁾ observed a high relative abundance of this type when a very high protein diet (60 % CP) was administered. In that study, diarrhea and changes in the consistency

of the feces were also reported. Nevertheless, the tendency of *Fusobacterium* spp. to increase its relative abundance in high protein diets could also have a beneficial effect as this microorganism produces butyrate.⁽¹³⁾ This volatile fatty acid is used as an energy source for the intestine and is associated with antineoplastic properties.

The genus *Enterococcus* presents great ecological diversity. While *Enterococcus faecium* is a microorganism widely distributed in nature, some strains are considered causative of nosocomial diseases in humans and zoonotic.⁽²⁶⁾ Conversely, other strains have a probiotic potential effect.^(27,28) The identification and quantification of this microorganism has been documented in both healthy and diseased dogs.^(29,30)

In this study it was possible to identify a higher relative abundance of *E. faecium* in the high protein and high-quality diets (14.7 vs 6.3), the associations between the type of diet or substrates with the growth of this microorganism are few. However, according to previous studies, it has a high capacity to use carbohydrates.⁽²⁸⁾ In the case of the HD diet, it presented a lower concentration of carbohydrates than the LD (42 vs 53 %), which could explain the reported abundance of this microorganism. It is essential to consider that the primers used for the molecular identification of *E. faecium*, did not contemplate any particular strain. Therefore, it would be interesting to conduct further studies to determine whether the abundance associated with the diet belongs to potential zoonotic or innocuous strains.

Regarding *Lactobacillus salivarius*, its relative abundance remained high in the feces of dogs on HD diet during the 30 days of experimentation. These findings are consistent with observations of Middelboss,⁽³¹⁾ who found a higher relative abundance of this microorganism in the feces of dogs fed a diet supplemented with prebiotic fiber compared with controls fed unsupplemented feed (12.2 vs. 10). This effect is associated with the fact that *Lactobacillus* genera are microorganisms associated with the presence of functional fibers such as inulin, fructooligosaccharides, mannanoligosaccharides and beet pulp.

High quality and highly digestible feeds contain inulin among its ingredients, which could explain the behavior of this microorganism. In turn, Bermingham et al., 2017 diet-induced changes in faecal microbiota observed in humans and rodents have been extrapolated to pets in spite of their very different dietary and metabolic requirements. This lack of direct evidence means that the mechanisms by which microbiota influences health in dogs are poorly understood. We hypothesized that changes in faecal microbiota correlate with physiological parameters including apparent macronutrient digestibility. Methods. Fifteen adult dogs were assigned to two diet groups, exclusively fed either a premium kibbled diet (kibble; K; n = 8, also reported a correlation between the level of digestibility of the diet, and the growth of *Lactobacillary*, similar to the results of this.⁽³²⁾

Bacteroides is a gender in which important discrepancies have been detected. While some authors have reported high concentrations in patients with diarrhea,^(33, 34) others have reported it in lower concentrations when the patient presents with inflammatory bowel disease.⁽³⁵⁾ These possible differences are associated with issues such as the extraction technique used, the type of sample, species (dog or cat), as well as the type of diet.⁽³⁴⁾ Regarding this last factor, it has been possible to associate *Bacteroides* with diets high in protein and fat.^(24,36) Deusch et al.⁽³⁷⁾ found that cats fed a high-protein, low-carbohydrate diet (110 g crude protein and 49 g crude fat/1 000 kcal ME) had a higher relative abundance

of this microorganism compared to those fed moderate protein and carbohydrate diets (78 g crude protein and 44 g crude fat/1 000 kcal). This result is similar to that obtained in this experimental, considering that the high-quality diet has a profile of 91.2 g crude protein and 40.15 g crude fat/1 000 kcal. Swanson⁽³⁴⁾ also found a relationship between the type of fibers contained in the feed and growth of species belonging to the genus *Bacteroides*. Similar to what was mentioned with *L. solivorus*, the high quality-digestibility diet contains inulin among its ingredients, a component that could favor these two microorganisms during the 30 days of the experimental period.

Finally, it is possible to observe that the general relative abundance of microorganisms was modified over time in the HD diet. This effect may be associated with the ability of the intestinal microbiome to adapt quickly and regulate itself to transient changes intrinsically.⁽²³⁾ They offered two intercalated diets to Labrador dogs, and observed that after some time, the microorganisms recovered their initial stability or profile, with significant changes in certain bacteria, such as *Fusobacterium*, *Bacteroides* and *Bifidobacterium*. This effect has also been reported in humans,⁽³⁸⁾ where evaluating the microbiome of 98 individuals fed with two types of diets (with different levels of fat and fiber), significant changes were detected during the first 24 h, and a stabilization of the population after 10 days.

Conclusions

This study demonstrated that the diet's protein content, energy density, and digestibility significantly modify the relative abundance of some microorganisms commonly present in the dog's fecal microbiome, except for the pathogen *C. perfringens*. Apparently, this effect does not persist over time for some of the bacterial species under study.