

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/03/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA SOLUBILIDADE DA PAREDE CELULAR DE
Saccharomyces cerevisiae SOBRE A DIGESTIBILIDADE,
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO MICROBIANA E
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE CÃES ADULTOS**

Stephanie de Souza Theodoro

Médica Veterinária

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA SOLUBILIDADE DA PAREDE CELULAR DE
Saccharomyces cerevisiae SOBRE A DIGESTIBILIDADE,
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO MICROBIANA E
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE CÃES ADULTOS**

Stephanie de Souza Theodoro

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

Coorientadora: Prof. Dra. Thaila Cristina Putarov

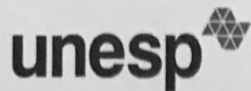
**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária. Área:
Clínica Médica Veterinária.**

2019

T388e	<p>Theodoro, Stephanie de Souza</p> <p>Efeito da solubilidade da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre a digestibilidade, produtos de fermentação microbiana e parâmetros imunológicos de cães adultos / Stephanie de Souza Theodoro. -- Jaboticabal, 2019</p> <p>45 p. : tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi</p> <p>Coorientadora: Thaila Cristina Putarov</p> <p>1. Imunidade. 2. Levedura. 3. Mananoligossacarídeos. 4. Prebiótico. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

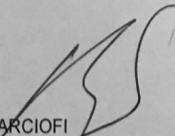


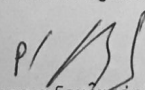
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

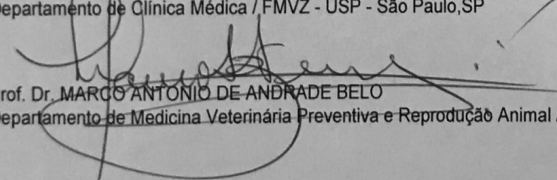
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA SOLUBILIDADE DA PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE A DIGESTIBILIDADE, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO MICROBIANA E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE CÃES ADULTOS

AUTORA: STEPHANIE DE SOUZA THEODORO
ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI
COORIENTADORA: THAILA CRISTINA PUTAROV

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal - UNESP


Prof. Dra. MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES (Videoconferência)
Departamento de Clínica Médica / FMVZ - USP - São Paulo, SP


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Stephanie de Souza Theodoro – nascida em 20 de Abril de 1990, filha de Paulo César de Almeida Theodoro e Katia de Souza, brasileira e natural de Guarulhos. Iniciou sua graduação em Março de 2009 na Universidade Federal de Pelotas – UFPel e concluiu em Março de 2014. No período de 1º março de 2015 a 28 de fevereiro 2017 foi residente do Programa de Residência em Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) UNESP – Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Em 2017, ingressou no mestrado na FCAV UNESP, no programa Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária) com ênfase em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos sob, também, orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

À **Família Theodoro** que nunca mediu esforços, amor e compreensão para a realização de mais este sonho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Força Superior que nunca me deixou em falta. Ele que soube entender minhas limitações e sempre me apresentou com o que há de melhor das pessoas.

À minha pequena, grande família, Pai, Mãe, Tia Silvia, Vó Edna, Vô Geraldo, minhas irmãs Sophia e Katherinie, Rose e Karen. Nestes dois anos fui ainda mais ausente e vocês mais pacientes. Muito obrigada por me apoiarem, comemorem cada passo, serem o meu colo e dividirem esse sonho comigo. Nada seria possível sem vocês! Amo vocês!

Tia Bel, mais uma conquista por você! Obrigada por me permitir ser sua filha e lutar a cada dia ao meu lado. Você é essencial em cada passo que dou. Eu te amo!

Tio Kojak, obrigada por ser essa fonte de inspiração em minha vida. Obrigada por me tornar quem eu sou hoje. Te amo muito!

Prima Michele, nós sabemos o quanto é bom poder dividir nossas conquistas. Isso também é por você! Te amo!

Aos meus filhos pets, Whisky e Beringela, por sempre demonstrarem a melhor forma de amor!

Ao professor Aulus por ser um exemplo de pessoa, humildade, inteligência e inspiração. Obrigada por me permitir fazer parte desse time e me permitir crescer cada dia mais.

A Thaila, minha coorientadora, amiga e melhor exemplo de pessoa e profissional que eu pude encontrar. Muito obrigada por toda a paciência, todo o ensinamento e toda dedicação. Esse título não seria capaz sem a sua ajuda. **MUITO OBRIGADA!**

À família Lab Nutri, **NADA** seria possível sem vocês. Obrigada por me ajudarem a cada etapa, acordar cedo, dormir tarde, todo o apoio, os momentos de descontração, de desespero, por **TUDO**. Cada um de vocês têm um papel excepcional nessa trajetória. Obrigada Fer, Cá, Mayara, Pet, Erico, Fran, Lara, Amanda, Carol, Lud, Leticia, Priscila, Pierina, Lucas e Helinho.

Aos funcionários, Claudinha, Elaine, Diego, Kelly, Roberta.. obrigada por dividirem os dias, as conversas, as risadas, os trabalhos e a vida. Tudo só dá certo porque vocês estão juntos. **OBRIGADA!**

Estagiários, obrigada por nos ajudarem a dividir esse trabalho. Vocês são mais importantes do que imaginam. Em especial a Carol Tiemi, minha IC, que não mediu esforços para tudo isso dar certo. Serei eternamente grata por toda a sua ajuda e dedicação.

Aos animais do Lab Nutri que são nossa fonte de estudo e de maior demonstração de afeto e carinho. Só vocês são capazes de me trazer a paz em momentos de estressantes.

À família Nutri Clínica que me permitiu continuar vivendo o que mais amo e sonho nessa vida. Nunca deixem essa essência morrer!

A Rep. Antro do HV, por me permitirem fazer parte dessa família. Obrigada pelos momentos alegres, ajuda nos estudos, desabafos e descontração. Em especial, aos dois melhores irmãos que a FCAV/UNESP me deu, Gilmar e Murillo, muito obrigada por juntos construirmos essa amizade. Obrigada por estarem sempre presente, sem pedir nada em troca e por tornarem a minha vida mais leve em Jaboticabal!

À Duda.. obrigada por sempre estar presente, pelas conversas, pelas broncas, pelas gordices, por dividir o sonho da Nutri Clínica comigo e por ser minha maior incentivadora, até quando eu mesma não acredito.

À Crossfit JBK que nessa fase tão exaustiva foi minha válvula de escape. Principalmente ao Paulo e a Ny que sempre conseguiram entender os dias mais cansativos e nos fizeram mais fortes.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP pela bolsa fornecida (2017/13623-7).

À Biorigin pelo suporte financeiro ao experimento.

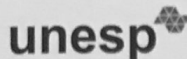
À Affinity PetCare pelo apoio ao Laboratório.

À Manzoni pela doação a extrusora.

E as todas as empresas parceiras do Lab Nutri, pelo incentivo a pesquisa em nutrição e ser nossa fonte de estudos.

SUMÁRIO

	Página
COMITÊ DE ÉTICA.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
CAPÍTULO 1.....	1
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	2
3 – HIPÓTESES.....	7
4 – OBJETIVOS.....	8
5 – REFERÊNCIAS.....	8
CAPÍTULO 2.....	12
ABSTRACT.....	13
1 - INTRODUCTION.....	14
2 – EXPERIMENTAL METHODS.....	15
3 – RESULTS.....	24
4 - DISCUSSION.....	29
5 - CONCLUSION.....	34
6 – REFERENCES.....	34



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



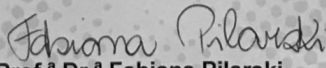
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Mananoligossacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a digestibilidade, produtos de fermentação microbiana e parâmetros imunológicos de cães adultos”**, protocolo nº 011937/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 11 de abril de 2019.

Vigência do Projeto	07/08/2017 a 28/02/2019
Espécie / Linhagem	Caninos/ Beagles
Nº de animais	24
Peso / Idade	13-15 kgs/ 2-6 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Laboratório de nutrição de cães e gatos

Jaboticabal, 11 de abril de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

EFEITO DA SOLUBILIDADE DA PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE A DIGESTIBILIDADE, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO MICROBIANA E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE CÃES ADULTOS

RESUMO - Derivados da parede celular de levedura têm sido estudados por seu efeito prebiótico. Recentemente, preparações purificadas e mais solúveis foram desenvolvidas, com vista a aumentar seu efeito fisiológico. Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da inclusão de dois diferentes extratos da parede celular de leveduras, um convencional (PCL) e outro com maior porcentagem de mananoligossacarídeos solúveis (PCLs) sobre a digestibilidade, produtos de fermentação nas fezes e alguns parâmetros imunológicos de cães adultos hígdos. Foi empregada uma única formulação, desdobrada em três tratamentos: CON – controle, sem adição de parede celular de levedura; PCL – adição de 0,3% de parede celular de levedura convencional; PCLs - adição de 0,3% de parede celular de levedura com elevada solubilidade de mananoligossacarídeos (MOS). Foram utilizados 24 cães beagle adultos, com oito repetições por ração, em delineamento em blocos casualizados. Cada bloco teve duração 30 dias, sendo avaliados no início e no final do período as concentrações séricas de fator de necrose tumoral alfa e interleucinas 6 e 10, produção *ex vivo* de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio por células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico, capacidade fagocítica de monócitos e neutrófilos e concentração de IgA nas fezes. Adicionalmente, foi avaliada a digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade das fezes, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, lactato, amônia, pH e aminas biogênicas nas fezes. Os resultados foram analisados por análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para os parâmetros imunológicos, os valores no tempo zero foram empregados como covariável. A inclusão de PCLs reduziu a digestibilidade da gordura da ração ($P < 0,05$), aumentou as concentrações de butirato e putrescina e reduziu a de lactato nas fezes dos cães ($P < 0,05$), demonstrando que a solubilização da fração de MOS resultou em maior fermentação do composto, alterando o metabolismo da microbiota intestinal de cães. Foi verificada redução da concentração sérica de IL-6 nos cães alimentados com PCLs ($P < 0,05$) e tendência de redução para os alimentados com PCL ($P = 0,095$), sugerindo redução da atividade inflamatória nos animais. Maior índice de fagocitose foi também observado após 30 dias de consumo da dieta PCL

($P < 0,03$), sugerindo estimulação da imunidade inata. Como conclusão, os dois compostos demonstraram feitos relevantes nos cães e a solubilização dos MOS da parede celular de levedura modificou sua interação com a microbiota e efeitos biológicos nos animais.

Palavras chave: imunidade, levedura, mananoligossacarídeos, prebiótico

EFFECTS OF THE SOLUBILITY OF YEAST CELL WALL OF *Saccharomyces cerevisiae* ON DIGESTIBILITY, FERMENTATION PRODUCTS ON FECES, AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF ADULT DOGS

ABSTRACT - Derivates of yeast cell wall have been studied by its prebiotic effect. Recently, more purified and soluble preparations were developed, attempting to increase their biological actions. This study evaluated the inclusion of two yeast cell wall preparations, one conventional (YCW), and another with higher solubility of the mannan oligosaccharide fraction (YCWs), on their effects on nutrient digestibility, fermentation products on feces, and some immunological parameters of dogs. A single food formulation was used, unfolded on the following treatments: CON – control, without yeast cell wall addition; YCW – addition of 0.3% of a conventional yeast cell wall extract; YCWs – addition of 0.3% of a yeast cell wall extraction with elevated mannan oligosaccharides solubility. Twenty-four adult beagle dogs were used, eight dogs per food, distributed on a randomized block design. Blocks lasted 30 days, and tumor necrosis factor alpha and interleukins 6 and 10, *ex vivo* production of hydrogen peroxide and nitric oxide by peripheral neutrophils and monocytes, phagocytic index, and fecal IgA were evaluated at the beginning and ending of each period. Additionally, nutrient digestibility, feces production and quality, and fermentation products, pH, and biogenic amines were quantified on feces. Results were evaluated by variance analysis and compared by Tukey test ($P < 0.05$). For the immunological parameters, the basal values were used as a covariate. The inclusion of YCWs reduced fat digestibility ($P < 0.05$), increased the concentration of butyrate and putrescine, and reduced the lactate on feces ($P < 0.05$), showing that mannan oligosaccharide solubilization resulted in higher fermentation of this compound, changing the metabolism of the microbiota of dogs. Lower IL-6 on serum was verified for dogs fed the YCWs diet ($P < 0.05$), and the concentration of this cytokine also tended to be lower in dogs fed the YCW than the control diet ($P = 0.095$), suggesting a reduction on the inflammatory activity of dogs. Higher phagocytic index was verified for peripheral monocytes after 30 days of the intake of the YCW food, indicating better innate immunity. In conclusion, both yeast cell wall derivates presented prebiotic effects on dogs, and the solubilization of the mannooligosaccharide fraction altered its interaction with the gut microbiota and biological effects on animals.

Keywords: immunity, yeast, mannan oligosaccharides, prebiotic

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK: Ammonium-Chloride-Potassium
BCFA: Branched-chain fatty acids
CaCl₂: Calcium chloride
CO₂: carbon oxide
CON: Controle / Control
DM: Dry matter
E. coli: *Escherichia coli*
EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid
FBS: Fetal bovine serum
FEDIAF: Fédération Européenne de L'industrie des Aliments pour Animaux Familiers
FOS: Frutoligosacarídeo
g: grama / gram
GALT: Gut-associated lymphoid tissue
GE: Gross energy
GOS: Glucoligosacarídeo
H / hr: Hora
H₂O₂: hydrogen peroxide
H₂O_d: distilled water
(IFN)- γ : Interferon gama / Interferon gamma
IL-2: Interleucina 2 / Interleukin 2
IL-6: Interleucina 6 / Interleukin 6
IL-10: Interleucina 10 / Interleukin 10
KCl: Potassium chloride
Kg: quilo
KH₂PO₄: Monopotassium phosphate
LPS: Lipopolysaccharide
M: molar
MgCl₂: Magnesium chloride
Min: minuto / minut
mL: mililitro / militer
mm: milímetro / milimeter
mM: micromolar
nM: nanomol
MOS: Mananoligosacarídeos
Na₂HPO₄: Disodium phosphate
NaCl: Sodium chloride
NaOH: Sodium hydroxide
NO: nitric oxide
PBS: phosphate buffered saline
PCL: parede celular de levedura

PCLs: parede celular de levedura solúvel

PMA: Phorbol myristate acetate

OD: optical density

OM: Organic matter

SCFA: Short chain fatty acid

Th1-helper: T helper 1

Th2-helper: T helper 2

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

VFA: Volatil fatty acids

YCW: standard yeast cell wall extract

YCWs: yeast cell wall extract with 20% soluble mannan oligosaccharides

μg : micrograma / microgram

μl : microlitro / microliter

μM : micromol

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1 – Characteristics of the yeast cell wall derivatives used on the study.	16
Table 2 – Ingredient and chemical composition of the food used on the study.	18
Table 3 – Body weight (kg), nutrient intake (g/dog/day) and coefficients of total tract apparent digestibility (%) of diets for dogs with the additions of different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean).	25
Table 4 – Feces production and characteristics of dogs fed diets with the addition of different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean).	25
Table 5 – Volatile fatty acids (mMol/g of dry matter), and ammonia and lactic acid (mMol/kg of dry matter) on the feces of dogs fed diets with the addition of different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean).	26
Table 6 - Biogenic amines concentration (mg/100 g of dry matter) on the feces of dogs fed diets with the addition of different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean).	27
Table 7 - Immunoglobulin A concentration (mg/g of dry matter) on the feces of dogs fed diets with the addition of different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean).	27
Table 8 - Serum cytokines concentrations (pg/mL) of dogs fed diets supplemented with different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean).	28
Table 9 - Hydrogen peroxide (H_2O_2 ; μM of $H_2O_2/2 \times 10^5$ cells) and nitrogen oxide (NO; μM of NO/ 2×10^5 cells) production in cell cultures of monocytes and neutrophils from the peripheral blood of dogs fed diets with the addition of different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean).	28

Table 10 - Monocyte and neutrophils phagocytic index (% of positive cells) from dogs fed diets with the addition of different yeast cell wall preparations (mean and standard error of the mean). **29**

CAPITULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior país do mundo em população de animais de estimação. Em consequência deste cenário, o mercado pet apresentou desenvolvimento expressivo nas últimas décadas. No ano de 2017, o Brasil alcançou a terceira posição mundial como maior produtor de artigos e serviços para cães e gatos, representando o setor de pet food 68,6% deste faturamento (Abinpet, 2018).

Devido ao fato de os proprietários de cães e gatos apresentarem-se mais conscientes quanto aos benefícios que a alimentação industrializada proporciona, adicionado ainda a um melhor custo/benefício e maior controle da saúde do animal, inúmeros produtos, ingredientes e empresas do setor de nutrição pet surgiram no mercado. Com isso, o foco da nutrição tem sido direcionado para a obtenção de uma dieta completa e balanceada que proporcione maior qualidade e expectativa de vida, com melhor bem-estar pela utilização de ingredientes que desenvolvam a capacidade de resistência as doenças e melhorem a saúde animal.

A utilização de ingredientes que possam melhorar a saúde do animal e prevenir a ocorrência de doenças está diretamente relacionado com o interesse humano, pois a relação próxima entre estas espécies fez com que ambos compartilhassem alterações significativas na qualidade da saúde, principalmente em relação a composição microbiológica, podendo haver facilidade de exposição à agentes patogênicos e influências ambientais nocivas (Grzékowiak et al., 2015). Assim, tem se procurado entender como a dieta pode influenciar os mecanismos de defesa do organismo e como esta ação é exercida por vários dos nutrientes essenciais e compostos adicionados ao alimento. Alimentos funcionais têm como objetivo melhorar algumas funções do organismo, sendo também usados como imunomoduladores. Essas substâncias podem agir tanto sobre a imunidade celular como humoral, ao aumentar o número de células, melhorar sua função e elevar a produção de anticorpos, dentre outros mecanismos (Zaine, 2010).

Dentre estas substâncias empregadas com o objetivo de promover a

saúde, destacam-se os prebióticos. Estes podem ser definidos como compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo do animal, mas que são seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal. Tais compostos podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem adicionados a ela por meio de fontes exógenas concentradas (Pelícia et al., 2004).

Os mananoligossacarídeos (MOS), compostos naturalmente presentes na parede celular de leveduras, são fermentados no intestino de cães gerando produtos de fermentação benéficos, como ácido butírico. Além disso, acredita-se que os MOS apresentam a capacidade de modular o sistema imunológico, a microbiota intestinal e preservar a integridade da superfície de absorção intestinal, ao bloquear a aderência das bactérias patogênicas às células epiteliais da mucosa do intestino.

Nova geração de prebiótico a base de parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) foi desenvolvida a partir de processo que resulta em elevada concentração da camada de mananoligossacarídeos solúveis em água no ingrediente. Estas características, elevada concentração e solubilidade, parecem conferir a este produto melhor potencial em modular o ambiente intestinal e a imunidade. Seu processo produtivo promove solubilização das camadas de mananoligossacarídeos da parede celular e reduz o tamanho das partículas. Devido a estes fatores, é possível que este ingrediente apresente atividade prebiótica aprimorada, mas este ainda não foi testado em cães.

5. CONCLUSION

Under the conditions of the present research, positive immunomodulatory effects were verified for both yeast cell wall preparations. The addition of YCWs to an extruded diet changed intestinal microbiota metabolism, as verified by increased butyrate and putrescine, and reduced lactate. It also reduced inflammatory response, verified by a reduction on serum IL-6 of dogs. The conventional YCW also tended to reduce IL-6, and stimulated the innate immunity verified by an increase on peripheral monocytes phagocytic activity.

6. REFERENCES

Abu-Elala N, Mohamed M, Mohamed M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 2013; 1: 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.05.001>

Aguilar-Uscanga B; François JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology. 2003, 37: 268–274.

Anderson RA, Water Absorption and Solubility and Amylograph Characteristics of Roll-Cooked Small Grain Products. Cereal Chem. 1981; 59(4): 265-269.

Ballesteros-Pomar MD, Arnaiz EG. Papel de los prebióticos y los probióticos en la funcionalidad de la microbiota del paciente con nutrición enteral. Nutr Hosp. 2018; 35(2): 18-26. doi: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.1956>.

Bibi, S., Navarre, D.A., Sun, X. et al. Beneficial Effect of Potato Consumption on Gut Microbiota and Intestinal Epithelial Health *Am. J. Potato Res.* 2019; <https://doi.org/10.1007/s12230-018-09706-3>.

Blount DG, Pritchard DI & Heaton PR. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 108, 399 – 407.

Calabrò S, Carciofi, AC, Musco N, Tudisco R, Gomes MOS, Cutrignelli MI. Fermentation characteristics of several carbohydrate sources for dog diets using the in vitro gas production technique. *Italian Journal of Animal Science.* 2013; 12(1): 21-27.

Carciofi, A. C.; Takakura, F. S.; De-Oliveira, L. D.; Teshima, E.; Jeremias, J. T.; Brunetto, M. A.; Prada, F. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and postprandial glucose and insulin response. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 98, p. 326-336, 2008.

Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sciences.* 2003; 73: 1683–1690. doi:10.1016/S0024-3205(03)00490-9.

Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Belà B, Gramenzi A, Orpianesi C, Cresci A, Silvi S. Probiotic characterization of *Lactobacillus* isolates from canine faeces. *J Appl Microbiol.* 2019. doi: 10.1111/jam.14197.

Chung WSF, Meijerink M, Zeuner B, Holck J, Louis P, Meyer A, Wells JM, Flint HJ, Duncan SH. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS Microbiology Ecology.* 2017; 93(11): 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix127>.

Delzenne N, Neyrinck A, Cani P. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *British Journal of Nutrition*, 2013; 109 (2): S81-S85. doi:10.1017/S0007114512004047.

Devi G, Harikrishnan R, Paray BA, Al-Sadoon MK, Hoseinifar SH, Balasundaram C. Comparative immunostimulatory effect of probiotics and prebiotics in *Channa punctatus* against *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2019; 86: 965-973, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.051>.

Diez M, Hornick JL, Baldwin P, Eenaeme CV, Istasse L. The influence of sugar-beet fiber, guar gum and inulin on nutrient digestibility, water consumption and plasma metabolites in healthy Beagle dogs. *Res. Vet. Sci.* 1998; 64: 91-96.

Erwin, E. S., Marco, G. J., Emery, E. M., 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, v. 44, p. 1768- 1771.

Esteban MA, Rodriguez A, Mesguer J. Glucan receptor but not mannose receptor is involved in the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by seabream (*Sparus auratus* L.) blood leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* 2004;16: 447–51.

FEDIAF - Fédération Européenne de L'industrie des Aliments pour Animaux Familiers. The European Pet Food Industry Federation. Nutritional Guidelines. 2017.

Fischer MM, Kessler AM, de Sá LR, Vasconcellos RS, Filho FO, Nogueira SP, Oliveira MC, Carciofi AC. Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. *J. Anim. Sci.* 2012; 90(7): 2233-45. doi: 10.2527/jas.2011-4334. Epub 2012 Jan 13.

Flickinger EA, Schreijen EMWC, Patil AR, Houssein HS, Grieshop CM, Merchen NR, Fahey JGC. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *Journal of Animal Science*. 2003; v.80: p.2008-2018.

Fowler J, Kakani R, Haq A, Byrd JA, Bailey CA. Growth promoting effects of prebiotic yeast cell wall products in starter broilers under an immune stress and *Clostridium perfringens* challenge. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2015; 24: 66–72. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv010>.

Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2015; 31:153 – 158. doi:10.1097/MOG.000000000000151.

Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004; 17:259-75; PMID:19079930; <http://dx.doi.org/10.1079/NRR200479>.

Gomes MOS, Beraldo MC, Putarov TC, Brunetto MA, Zaine L, Gloria MBA, Carciofi AC. Old beagle dogs have lower faecal concentrations of some fermentation products and lower peripheral lymphocyte counts than young adult beagles. *British Journal of Nutrition*. 2011; 106: S187–S190. doi:10.1017/S0007114511002960.

Gourbeyre P, Denery S, Bodinier M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011; 89: 685-695. doi: 10.1189/jlb.1109753.

Gouveia EMMF, Silva IS, Nakazato G, Onselem VJV, Corrêa RAC, Araujo FR, Chang MR. Action of phosphorylated mannanoligosaccharides on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013; 44 (2): 499-504.

Grenn LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982; 126: 131-138.

Hanfrey CC, Pearson BM, Hazeldine S, Lee J, Gaskin DJ, Woster PM, Phillips MA, Michael AJ. Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota, *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 43301–43312, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.307835>.

Heinrichs AJ, Heinrichs BS, Jones CM. Fecal and saliva IgA secretion when feeding a concentrated mannan oligosaccharide to neonatal dairy calves. *The Professional Animal Scientist*. 2013; 29: 457–462

HogenEsch H, Thompson S, Dunham A, et al. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004; 97, 77–85.

Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2017; 8(2): 172-184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>.

Hoyle L, Swann J. Influence of the Human Gut Microbiome on the Metabolic Phenotype. *The Handbook of Metabolic Phenotyping*. 2019; Elsevier Inc. Chapter 18: 535-560

Hussein HS; Flickinger EA; Fahey GCJr. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. *Journal of Nutrition*. 1999; 129:1454-1456.

Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard K, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*, 2000; 118(4): 724–34.

<https://doi.org/10.1053/gg.2000.5967>.

Jiminez JA, Uwiera TC, Abbott DW, Uwiera RRE, Inglis GD. Butyrate Supplementation at High Concentrations Alters Enteric Bacterial Communities and Reduces Intestinal Inflammation in Mice Infected with *Citrobacter rodentium*. *mSphere*. 2017. 2(4): 1–21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00243-17>.

Kaisar MMM, Pelgrom LR, van der Ham AJ, Yazdanbakhsh M and Everts B. Butyrate Conditions Human Dendritic Cells to Prime Type 1 Regulatory T Cells via both Histone Deacetylase Inhibition and G Protein-Coupled Receptor 109A Signaling. *Front. Immunol.* 2017; 8:1429. doi: 10.3389/fmmu.2017.01429.

Kalac P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*. 2014; 161: 27–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.102>.

Laflamme, DP. Development and validation of body condition score system for dogs. *Canine Practices*. 1997; 22: 10-15.

Lin CY, Alexander C, Steelman AJ, Warzecha CM, Godoy MRC, Swanson KS. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. *Journal of Animal Science*. 2019. <https://doi.org/10.1093/jas/skz064>.

Loser, C. et al. Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. **Gut**, v.44, p.12–16, 1999.

Loureiro BA, Sakomura NK, Vasconcellos RS, Sembenelli G, Gomes MOS. Insoluble fibres, satiety and food intake in cats fed kibble diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (In press.)* 2017; 101(5): 824-834. doi:10.1111/jpn.12468.

Lycke N, Erlandsson L, Ekman L, et al. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J Immunol* 1999;163:913–919.

Maria APJ, Ayane L, Putarov TC, Loureiro BA, Neto BP, Casagrande MF, Gomes MOS, Glória MBA, Carciofi AC. The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs. *J Anim Sci.* 2017; 95(6): 2452-2466. doi: 10.2527/jas.2016.1302.

Mayer, L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 30: S4–S12.

Middelbos IS, Fastinger ND, Fahey Jr GC. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: 3033–3044. doi:10.2527/jas.2007-0080

Milovic, V., and L. Turchanowa. Polyamines and colon cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 2003; 31: 381–383.

Moens F, Abbeele PV, Basit AW, Dodo C, Chatterjee R, Smith B, Gaisford S. A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production in vitro. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019. 555: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.020>.

Monti M, Gibson M, Loureiro BA, Sá FC, Putarov TC, Villaverde C, et al. Influence of dietary fiber on macrostructure and processing traits of extruded dog foods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016, 220: 93-102. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.07.009.

Neaga, A., Lefor, J., Lich, K. E., Liparoto, S. F., & Xiao, Y. Q. Development and validation of a flow cytometric method to evaluate phagocytosis of pHrodo™

BioParticles® by granulocytes in multiple species. *Journal of Immunological Methods*. 2013; 390(1-2): 9–17. doi:10.1016/j.jim.2011.06.027

Norris CR & Gershwin LJ. Evaluation of systemic and secretory IgA concentrations and immunohistochemical stains for IgA-containing B cells in mucosal tissues of an Irish setter with selective IgA deficiency. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2003; 39, 247–250.

Northcote DH; Horne RW. The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *Biochem J*. 1952; 51(2): 232–236.2.

NRC - National Research Council. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, DC: National Academy Press, 2006. <https://doi.org/10.17226/10668>.

de-Oliveira LD, Takakura FS, Kienzle E, Brunetto MA, Teshima E, Pereira GT, Vasconcellos RS, Carciofi AC. Fibre analysis and fibre digestibility in pet foods – a comparison of total dietary fibre, neutral and acid detergent fibre and crude fibre. *Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2012; 96: 895-906. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01203.x>

Oliveira CAF, Vetvicka V, Zanuzzo FS. β -Glucan successfully stimulated the immune system in different jawed vertebrate species. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2019; 62: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.006>

Park SH, Lee SI, Ricke SC. Microbial Populations in Naked Neck Chicken Ceca Raised on Pasture Flock Fed with Commercial Yeast Cell Wall Prebiotics via an Illumina MiSeq Platform. *PLOS ONE*. 2016; 11(3): e0151944. doi:10.1371/journal.pone.0151944

Park SH, Lee SI, Kim SA, Christensen K, Ricke SC. Comparison of antibiotic supplementation versus a yeast-based prebiotic on the cecal microbiome of commercial broilers. *PLOS ONE*. 2017; 12(8): e0182805.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182805>.

Peixoto MC, Ribeira EM, Maria APJ, Loureiro BA, di Santo LG, Putarov TC, Yoshitoshi FN, Pereira GT, Sá LRM, Carciofi AC. Effect of resistant starch on the intestinal health of old dogs: fermentation products and histological features of the intestinal mucosa. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2018;102:e111–e121.

Peters IR, Calvert EL, Hall EJ, Day MJ. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2004; 11(5): 841-848. doi:10.1128/CDLI.11.5.841-848.2004.

Pick E, Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. 1980; 38: 161-170.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*. 1981; 46: 211-226.

Posadas SJ, Caz V, Caballero I, Cendejas E, Quilez I, Largo C, et al. Effects of mannoprotein E1 in liquid diet on inflammatory response and TLR5 expression in the gut of rats infected by *Salmonella typhimurium*. *BMC Gastroenterology*. 2010; 10:58. doi: 10.1186/1471-230X-10-58.

Pryce, J. D. 1969. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *The Analyst*, v. 94, p. 1121-1151.

Propst EL, Flickinger EA, Bauer LL, Merchen NR, Fahey Jr. C. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. *J. Anim. Sci*. 2003. 81:3057–3066.

Ríos-Covían D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, et al. Intestinal short chain fatty

acids and their link with diet and human health. 2016. *Front. Microbiol.* 7, 185.

Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>.

Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition.* 2010; 104(S2): S1–S63. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>.

Rodriguez-Estrada U, Satoh S, Haga Y, Fushimi H, Sweetman J. Effects of inactivated *Enterococcus faecalis* and mannan oligosaccharide and their combination on growth, immunity, and disease protection in rainbow trout. *N. Am. J. Aquacult.* 2013; 75: 416–428. doi: 10.1080/15222055.2013.799620

Santos JPF, Aquino AAA, Glória MBA, Avila-CampoS MJ, Oba PM, Santos KM, Vendramini THA, Carciofi AC, Junior AR, Brunetto MA. Effects of dietary yeast cell wall on faecal bacteria and fermentation products in adult cats. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018;1–11. DOI: 10.1111/jpn.12918.

Schley PD; Field CJ. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition.* 2002; 87 (2): S221–S230. doi: 10.1079/BJN/2002541.

Schmitz S; Henrich M; Neiger R; Werling D; Allenspach K. Comparison of TNF α responses induced by Toll-like receptor ligands and probiotic *Enterococcus faecium* in whole blood and peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 153, p. 170-174, 2013.

Song SK; Beck BR; Kim D; Park J; Jungjoon K; Kim HD; Ringo E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology.* 2014; 40: 40-48.

Spring P, Wenk C, Connolly A, Kiers A. A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. *Journal of Applied Animal Nutrition*. 2015; 3 (7): 1-11. doi:10.1017/jan.2015.6.

Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Healy H-P, Dawson KA, Merchen NR, Fahey GC. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannan oligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial population in adult dogs. *Archives of Animal Nutrition*. 2002; 56: 309–318. <http://dx.doi.org/10.1080/00039420214344>.

Tan J, McKenzie C, Potamitis M, et al. 2014. Chapter Three – the role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol*. 121: 91–119.

Teng P-Y, Kim WK. Review: Roles of Prebiotics in Intestinal Ecosystem of Broilers. *Front. Vet. Sci*. 2018. 5: 245. doi: 10.3389/fvets.2018.00245.

Torrecillas S, Makol A, Caballero M, Montero D, Ginés R, Sweetman J, Izquierdo M. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*. 2011; 17: 223-233. doi:[10.1111/j.1365-2095.2009.00730.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00730.x)

Townsend GE, Han W, Schwalm ND, Raghavan V, Barry NA, Goodman AL, Groisman EA. Dietary sugar silences a colonization factor in a mammalian gut symbiont. *PNAS*. 2019; 116 (1): 233-238.

Vale SR, Gloria MB. Determination of biogenic amines in cheese. *J. AOAC Int*. 1997; 80(5): 1006-1012.

Vetvicka V, Vashishta A, Saraswat-ohri S, Vetvickova J. Immunological effects of yeast- and mushroom-derived beta-glucans. *Journal of medicinal food*. 2008; 11(4): 615-622. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0588>

Vetvicka V; Carlos Oliveira C. β -(1-3)(1-6)-D-glucans Modulate Immune Status and Blood Glucose Levels in Dogs. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 4(8): 981-991.

Yin L, Laevsky G, Giardina C. Butyrate Suppression of Colonocyte NF- κ B Activation and Cellular Proteasome Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(48): 44641–44646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105170200>.

Wang JY, Johnson LR. Luminal polyamines stimulate repair of gastric mucosal stress ulcers. *Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1990; 259(4): G584-G592. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.4.G584>

Wijburg OL, Uren TK, Simpfendorfer K, et al. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med*. 2006; 203: 21–26.

Zaine L, Ferreira C, Gomes MOS, Monti M, Tortola L, Vasconcellos RS, Carciofi AC. Faecal IgA concentration is influenced by age in dogs. *British Journal of Nutrition* (2011), 106, S183–S186. doi:10.1017/S0007114511000559