

Relato Científico

Título: Alterações na microbiota fecal e perfil bioquímico decorrentes da obesidade aguda induzida em cães adultos.

Title: Changes in fecal microbiota and biochemical profile due to acute obesity induced in adult dogs.

Resumo: Atualmente, a obesidade é associada com a presença ou ausência de determinada população microbiana intestinal que afeta a utilização da energia alimentar, conseqüentemente, podendo influenciar no peso corporal e adiposidade. O Objetivo desta pesquisa foi investigar se o ganho e a posterior perda de peso são capazes de alterar o perfil bioquímico, hormonal e a proporção de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota fecal de cães adultos da raça Beagle. A pesquisa foi dividida em três fases: fase magra (FM), fase de ganho de peso (FGP) e fase de perda de peso (FPP). Os parâmetros séricos de glicose, colesterol, triglicerídios, albumina, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, proteína total, insulina e leptina foram acompanhados e amostras fecais foram analisadas usando a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real para identificar a quantidade de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Triglicerídios, colesterol, albumina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e proteína total foram maiores ($P < 0,05$) nos cães na FGP quando comparados à FM. A quantidade de *Bacteroidetes* foi mais elevada ($P < 0,001$) na FM e o filo *Firmicutes* não diferiu entre as fases ($P > 0,05$). Após a perda de peso, o nível de colesterol, proteína total e a quantidade de *Bacteroidetes* permaneceu inalterado. Esta pesquisa identificou que a obesidade, mesmo induzida de forma aguda, é capaz de promover alterações bioquímicas

sanguíneas e de microbiota fecal. Em curto prazo, a perda de peso reverte parte dessas mudanças, mas não a sua totalidade.

Palavras chave: microbiota intestinal, canino, obesidade, hormônios, perfil bioquímico

Abstract: Recently, obesity is associated with a presence or absence of certain gut microbial populations that affect a food energy use, consequently may influence body weight and adiposity. The aim of this research was to investigate whether gain and subsequent weight loss are able to alter the biochemical, hormonal profile and the proportion of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in the fecal microbiota of adult Beagle dogs. The research was divided into three phases: lean phase (LP), phase of weight gain (PWG) and phase of weight loss (PWL). The serum parameters of glucose, cholesterol, triglycerides, albumin, creatinine, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, total protein, insulin and leptin were monitored and fecal samples were analyzed using quantitative real-time polymerase chain reaction to identify the amount of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Triglycerides, cholesterol, albumin, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase and total protein were higher ($P < 0.05$) in dogs in PWG when compared to PWL. The quantity of *Bacteroidetes* was higher ($P < 0.001$) in LP and the *Firmicutes* phylum did not differ between phases ($P > 0.05$). After weight loss, cholesterol, total protein and the quantity of *Bacteroidetes* remained unchanged. This research identifies obesity, even if acutely induced, is able to promoting biochemical changes in blood and fecal microbiota. In the short-term, a weight loss reverses part of the changes, but not its entirety.

Key words: gut microbiota, canine, obesity, hormones, biochemical profile

Introdução

Como em humanos, a epidemia de obesidade em animais de companhia está crescendo e, em países industrializados, é a doença nutricional mais comum. Embora esteja sendo muito estudada, existem poucas pesquisas que relacionam o efeito da obesidade na microbiota intestinal de cães. Atualmente, a obesidade é associada com a presença ou ausência de determinada população microbiana intestinal que afeta a utilização da energia alimentar, consequentemente podendo influenciar no peso corporal e adiposidade. É relatado que indivíduos obesos têm uma maior população de *Firmicutes* e reduzida quantidade de *Bacteroidetes* comparado a controles magros (Ley et al., 2005). Em nosso conhecimento, existe um único estudo que comparou a microbiota intestinal em cães obesos e magros e não observou diferenças claras (Handl et al., 2013). A obesidade também está relacionada com modificações em parâmetros bioquímicos e hormonais como colesterol (Col), triglicerídeos (Tg), insulina (Ins) e leptina (Lep) respectivamente. Aumentadas concentrações séricas de Col e/ou Tg são observadas em cães obesos e a perda de peso foi capaz de diminuir estas concentrações (Bailhache et al., 2003; Jeusette et al., 2005a; Park et al., 2014). É hipotetizado que o ganho de peso resultará em alterações prejudiciais nos parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal, mas a redução do peso poderá reverter esses efeitos. O objetivo desta pesquisa foi investigar se o ganho e a posterior perda de peso são capazes de alterar o perfil bioquímico, hormonal e a proporção de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota fecal de cães adultos da raça Beagle.

Materiais e Métodos

O protocolo experimental deste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA–UFRGS) em concordância com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 2011).

Foram inclusos nesta pesquisa dez cães adultos não castrados da raça Beagle, sendo 5 machos e 5 fêmeas, residentes na Faculdade de Agronomia da UFRGS. A classificação do estado nutricional foi realizada conforme o sistema de Escore de Condição Corporal (ECC) de 9 pontos (Laflamme, 1997). Os cães foram separados em baias por sexo e expostos a ciclos alternados de luminosidade (14h luz/10h escuro), temperatura controlada (18-24°C) e atividade de socialização duas vezes ao dia. Foram alocados em baias individuais somente para receber a alimentação e realizar a coleta de sangue. Água fresca ficou disponível, exceto 2h antes da coleta de sangue. Todos os cães foram alimentados com dieta comercial de manutenção seca, extrusada, nutricionalmente completa e balanceada por 6 semanas antes de iniciar a pesquisa. Para não haver diferença de microbiota fecal em função de troca de ração, foi utilizada a mesma ração e lote, durante todo o período experimental. A composição nutricional da alimentação oferecida na matéria seca era 26% de proteína, 15% de gordura, 37% de carboidrato, 3% de fibra bruta, 7% de cinzas e energia metabolizável de 3.900Kcal/Kg.

Antes de iniciar a pesquisa, a saúde dos animais foi avaliada pela realização do exame físico, hematologia (dados não detalhados) e bioquímica sérica. O experimento foi dividido em 3 fases: fase magra (FM), fase de ganho de peso (FGP) e fase de perda de peso (FPP). Na FM os animais receberam alimentação por 6 semanas com as necessidades energéticas (NE) objetivando

manutenção de cães adultos (AAFCO, 2012), a ingestão alimentar e o peso corporal (PC) permaneceram estáveis; na FGP a dieta foi ofertada *ad libitum* por um período de 14 semanas com o objetivo de proporcionar ganho de peso e ECC 7, pelo menos; na FPP que durou 13 semanas, os cães foram alimentados com 60–70% da ingestão energética verificada na FGP, objetivando a redução do PC e ECC 5. A coleta de amostras de fezes frescas e sangue foi realizada ao final de cada fase. A verificação do PC e ECC foi realizada semanalmente.

Para análise das amostras sanguíneas, o soro foi separado do sangue total por centrifugação. Os marcadores analisados foram: glicose (Gli), Col, Tg, albumina (Alb), creatinina (Cr), fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), proteína total (PT), Ins e Lep. A técnica laboratorial de análise dos marcadores amostrados foi realizada conforme a orientação dos kits comerciais disponíveis. Os resultados de Col, Tg, Alb, Cr, FA, ALT e PT foram verificados pelo método enzimático-calorimétrico com equipamento automático. A Lep sérica foi medida de acordo com o protocolo indicado no kit comercial Canine Leptin ELISA[®]. A insulina foi dosada em um laboratório privado - PROVET. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e repetidas quando a variação foi maior que 5%.

Para a avaliação quantitativa do filo *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram coletadas amostras fecais de cada cão, uma vez ao dia por dois dias consecutivos e acondicionados em criotubos estéreis a temperatura de -80°C para posterior homogenização.

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi realizada com kit de isolamento fecal. O protocolo de extração seguiu as orientações do fabricante com o uso de 100mg de amostra fecal. A reação em cadeia da polimerase

quantitativa em tempo real (qPCR-RT) foi a técnica utilizada para determinar o número de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (células x μL^{-1}) excretados nas fezes. O controle positivo para cada reação foi sintetizado baseado no fragmento amplificado do respectivo primer. Todas as reações qPCR foram realizadas em triplicata. Para avaliar a eficiência da qPCR, precisão e sensibilidade de cada gene objetivado, diluições seriadas do DNA genômico (DNA *bacteroidetes* e DNA *firmicutes*) com concentração conhecida (curva padrão) de amplificação foi feita. O gráfico gerado pela concentração do DNA genômico e respectivo valor foi testado e o R^2 da equação de regressão calculado. A curva padrão foi construída e o valor da taxa de inclinação identificado, o que indica a sensibilidade do teste e possibilita o cálculo da eficiência. A curva padrão foi o log quantificado da amostra inicial multiplicado pelo número de ciclos da qPCR e foi calculado com auxílio do software Eco[®]TM Real Time.

A análise estatística foi realizada de forma randomizada em blocos com auxílio da análise de variância (ANOVA) e F-test. A média dos 3 grupos analisados foi comparada pelo teste Student-Newman-Keuls.

Resultados

A idade média dos animais foi de 3 anos e, no início do estudo, todos apresentavam ECC ideal e não apresentaram alterações clínicas durante o decorrer do experimento. Conforme descrito na tabela 1, o gênero apresentou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) nos parâmetros de ECC, Col, Tg e ALT. Os participantes apresentaram um aumento significativo ($P < 0,001$) no PC e ECC durante a FGP, mas após a restrição energética, o PC retornou ao basal conforme esperado. Não foi encontrada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os

grupos nos parâmetros de Gli, Cr, Lep e Ins, mas os Tg, Alb, FA e ALT apresentaram elevação ($P < 0,05$) após o ganho de peso. De acordo com a tabela 1, o Col e a PT foram maiores ($P < 0,05$) na FGP e permaneceram elevados na FPP.

No que se refere a microbiota fecal, o filo *Firmicutes* não mostrou diferença entre as fases ($P > 0,05$). Já a quantidade de *Bacteroidetes* foi maior ($P < 0,001$) na FM, conforme a tabela 2, com 282,9 cópias/ $\mu\text{L} \times 10^8$ detectadas. Após a FGP, este número diminuiu para 45,73 cópias/ $\mu\text{L} \times 10^8$ e após a FPP o número de cópias não mudou estatisticamente.

Discussão

Pesquisas têm identificado a prevalência da obesidade canina em aproximadamente 39% na França (Colliard et al., 2006), 50% no Reino Unido (Holmes et al., 2007), 34% na Áustria (Handl et al., 2009), 34% nos Estados Unidos (Lund et al., 2006) e 44% na China (Mao et al., 2013). A obesidade em cães é associada a diversos prejuízos à saúde, incluindo distúrbios hormonais (Martin et al., 2006), hiperlipidemia (Jeusette et al., 2005a), ruptura de ligamento cruzado cranial (Adams et al., 2011), distúrbio respiratório (Bach et al., 2007), doenças ortopédicas (Kealy et al., 2000) e doenças do trato urinário (Lund et al., 2006).

A hiperlipidemia está sendo cada vez mais reconhecida como clinicamente relevante em cães (Xenoulis & Steiner, 2010). Nesta pesquisa, aumento significativo nos Tg e Col total ocorreram nos animais obesos, em concordância com outros estudos (Bailhache et al., 2003; Jeusette et al., 2005a; Peña et al., 2008; Stone et al., 2009; Park et al., 2014; Okada et al., 2015), contudo o nível

médio de Tg e Col total não ultrapassou 500mg/dL e 750mg/dL respectivamente. Após a FPP, a concentração de Tg retornou ao valor basal como em outras pesquisas (Diez et al., 2004; Jeusette et al., 2005a) enquanto o nível de colesterol não diferiu estatisticamente. Este resultado pode ser consequente ao curto tempo da FPP, pois os valores encontrados sugerem uma tendência a diminuição no nível de Col, que poderia retornar ao valor basal se a FPP fosse prolongada.

Os resultados de Gli, Lep e Ins não diferiram estatisticamente entre as fases. Dois estudos recentes (Adolphe et al., 2014; Okada et al., 2015) avaliaram o efeito da obesidade e a perda de peso na glicemia, ambas pesquisas induziram o ganho de peso em cães com adequado ECC e observaram maior glicemia nos animais obesos. Em nossa pesquisa, era esperado que os parâmetros hormonais avaliados fossem mais elevados nos animais obesos, mas isso não foi observado. Jeusette et al. (2005b) observaram elevada concentração de Lep e Ins em cães obesos, com significativa diminuição em seus níveis durante a perda de peso. Como em humanos e roedores, a concentração de Lep plasmática em cães e gatos aumenta com o aumento da massa de gordura corporal e tamanho de adipócitos (Park et al., 2014; Park et al., 2015) e tende a diminuir após a perda de peso (Jeusette et al., 2005a; Jeusette et al., 2005b; Yamka et al., 2006).

Na presente pesquisa a FA e ALT foram mais elevadas nos animais obesos e retornaram ao valor de referência após a perda de peso, este resultado corrobora com outro protocolo de pesquisa recente e semelhante (Peña et al., 2014). Okada et al. (2015) superalimentou cães por 4 semanas e observou elevação significativa na FA após o ganho de peso agudo. Em contraste, Diez et al. (2004), não observou efeito da perda de peso na FA e ALT plasmática. Talvez, considerar a variabilidade de animais e um período maior de obesidade e

posterior perda de peso sejam necessários para alcançar alterações cardiovasculares e metabólicas, justificando a ausência de significância estatística em alguns resultados deste experimento

Como esperado, a quantidade de *Bacteroidetes* diminuiu após a FGP, mas os *Firmicutes* não apresentaram alteração após o ganho ou perda de peso. Em humanos e experimentos com ratos, tem sido sugerido que os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* podem ter um papel no aumento do PC e massa de gordura em seu hospedeiro, contribuindo para perpetuar o estado de obesidade (Ley et al., 2006), esta mesma população obesa apresenta uma maior quantidade de *Firmicutes* em relação ao filo *Bacteroidetes* quando comparados aos respectivos controles em adequado estado nutricional independentemente da quantidade de alimento consumido (Ley et al., 2005). Similar ao intestino humano, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* são a microbiota predominante no intestino canino e felino (Deng & Swanson, 2015), contudo a proporção encontrada varia entre as espécies. A variabilidade pode ser consequência a condições inerentes ao animal (ex. raça, alimentação e idade), meio-ambiente ou metodologias de pesquisa.

Em cães poucos estudos têm sido realizados e os resultados parecem diferir conforme a metodologia utilizada, sequenciamento de Sanger ou 454 pirosequenciamento: *Firmicutes* 47,7%, *Proteobacteria* 23,3%, *Fusobacteria* 16,6% e *Bacteroidetes* 12,4% (Suchodolski et al., 2008); *Fusobacteria*: 23–40%, *Firmicutes*: 14–28%, *Bacteroidetes*: 31–34%, *Actinobacteria*: 0,8–1,4% e *Proteobacteria*: 5–7% (Middelbos et al., 2010); *Bacteroidetes*: 37–38%, *Firmicutes*: 31–35%, *Proteobacteria*: 13–15%, *Fusobacteria*: 7–9% e

Actinobacteria: 1% (Swanson et al., 2011). Em nossa pesquisa foi utilizado qPCR-RT por esta razão é difícil de comparar os resultados.

Em nosso conhecimento, existe apenas uma pesquisa que comparou a microbiota intestinal de 21 cães obesos e 22 saudáveis utilizando ambas as técnicas de análise (qPCR e pirosequenciamento) e não observou diferenças (Handl et al., 2013). Na presente pesquisa foi encontrada menor quantidade de *Bacteroidetes* nos animais obesos, em comparação à FM, e a perda de peso não reverteu o efeito da obesidade. Kieler et al. (2012) demonstraram que felinos com excesso de peso e obesidade apresentaram diferença significativa na microbiota intestinal quando comparado a gatos em adequado estado nutricional. Contudo eles acharam menor quantidade de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nos obesos. Com poucos dados disponíveis é possível observar similaridades na microbiota intestinal humana e animal, embora exista discrepância de resultados em relação a quantidade do filo e espécie bacteriana.

Conclusão

A obesidade, mesmo induzida de forma aguda, é capaz de promover alterações bioquímicas sanguíneas e de microbiota fecal, observada pela diminuição na quantidade de *Bacteroidetes* nos animais superalimentados. Em curto prazo, a perda de peso pode reverter parte dessas mudanças, mas não a sua totalidade. São necessárias novas pesquisas para melhor compreensão sobre os efeitos do excesso de peso na microbiota intestinal de cães.

Referências

ADAMS, P. R.; et al., Influence of signalment on developing cranial cruciate rupture in dogs in the UK. **J Small Anim Pract.** v. 52, p. 347-352, 2011.

ADOLPHE, J. L.; et al., Short-term obesity results in detrimental metabolic and cardiovascular changes that may not be reversed with weight loss in an obese dog model. **Br J Nutr.** v. 112, n. 4, p. 647-656, 2014.

AMERICAN ASSOCIATION OF FEED CONTROL OFFICIALS – AAFCO.
Association of American Feed Control Officials. Oxford, 2012.

BACH, J. F.; et al., Association of expiratory airway dysfunction with marked obesity in health adult dogs. **Am J Vet Research.** v. 68, p. 670-675, 2007.

BAILHACHE, E.; et al., Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. **Metab Clin Exp.** v. 52, p. 559-564, 2003.

COLLIARD, L.; et al., Risk factors for obesity in dogs in France. **J Nutr.** v. 136, p. 1951-1954, 2006.

DENG, P.; SWANSON, K. S., Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **Brit J Nutr.** v. 113, p. 6-17, 2015.

DIEZ, M.; et al., Evolution of blood parameter during weight loss in experimental obese Beagle dogs. **J Anim Physiol Anim Nutr.** v. 88, p. 166-171, 2004.

HANDL, S.; et al., Risk factors for canine obesity in Austria. In: 13th European Society of Veterinary & Comparative Nutrition Congress, 2009, Italy. Disponível em: http://vetdoc.vu-wien.ac.at/vetdoc/suche.publikationen_mug_autoren?sprache_in=de&menue_id_in=&id_in=&publikation_id_in=65502

HANDL, S.; et al., Faecal microbiota in lean and obese dogs. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 84, p. 1-12, 2013.

HOLMES, K. L.; et al., Risk factors associated with excessive body weight in dogs in the UK. **J Anim Physiol Anim Nutr.** v. 91, p. 166-167, 2007.

JEUSETTE, I. C.; et al., Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. **Am J Vet Res.** v. 66, p. 81-86, 2005a.

JEUSETTE, I. C.; et al., Effects of chronic obesity and weight loss on plasma ghrelin and leptin concentrations in dogs. **Res Vet Sci.** v. 79, p. 169-175, 2005b.

KIELER, I. N.; et al., Gut microbiome and associations with overweight and obesity in cats. In 16th European Society of Veterinary & Comparative Nutrition Congress, **ESVCN**, Poland, 2012.

KEALY, R. D.; et al., Evaluation of the effects of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs. **J Am Vet Med Assoc.** v. 217, p. 1678-1680, 2000.

LAFLAMME, D. P., Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice.** v. 22, n. 3, p. 10-15, 1997.

LEY, R. E.; et al., Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci.** v. 102, p. 11070-11075, 2005.

LEY, R. E.; et al., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature.** v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LUND, E. M.; et al., Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. **Intern J Appl Res Vet Med.** v. 4, p. 177-186, 2006.

MAO, J.; et al., Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. **Prev Vet Med.** v. 112, p. 438-442, 2013.

MARTIN, L. J. M.; et al., Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. **J Anim Physiol Anim Nutr.** v. 90, p. 355-360, 2006.

MIDDELBOS, I. S.; et al., Phylo-genetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PLoS ONE.** v. 5, n. 3, p. e9768, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8 ed., Washington, DC, USA: National Academic Press, 2011. Disponível em: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>

OKADA, Y.; et al., Changes in malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and M/L ratio as energy metabolism markers of acute weight gain. **Asian J Anim Vet Adv**. v. 10, p. 132-140, 2015.

PARK, H. J. ; et al., Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs. **BMC Vet Res**. v. 10, p. 113, 2014.

PARK, H. J. ; et al., Association of obesity with serum leptina, adiponectin, and serotonin and gut microflora in Beagle dogs. **J Vet Intern Med**. v. 29, p. 43-50, 2015.

PEÑA, C.; et al., Effect of low-fat high-fibre diet and mitratapide on body weight reduction, blood pressure and metabolic parameters in obese dogs. **J Vet Med Sci**. v. 76, p. 1305-1308, 2014.

PEÑA, C.; et al., Relationship between analytic values and canine obesity. **J Anim Physiol Anim Nutr**. v. 92, p. 324-325, 2008.

STONE, R. C.; et al., Use of a bioelectric impedance device in obese and lean healthy dogs to estimate body fat percentage. **Vet Ther**. v. 10, p. 1-12, 2009.

SUCHODOLSKI, J. S.; CAMACHO, J.; STEINER, J. M., Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 66, p. 567-578, 2008.

SWANSON, K. S.; et al., Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. **ISME J**. v. 5, p. 639-649, 2011.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M., Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. **Vet J**. v. 183, p. 12-21, 2010.

YAMKA, R. M.; FRIESEN, K. G.; FRANTZ, N. Z., Identification of canine markers related to obesity and the effects os weight loss on the markers of interest. **Intern J Appl Res Vet Med**. v. 4, p. 282-292, 2006.

Tabela 1: Descrição do peso corporal, escore de condição corporal, perfil bioquímico e hormonal dos cães antes da fase de ganho de peso, durante a fase de ganho de peso e após a fase de perda de peso.

	FM ¹	FGP ²	FPP ³	EPM ⁴	P-valor		
					Gênero	Tratamento	Gênero x Tratamento
<i>Característica</i>							
Peso corporal (Kg)	11.8 ^b	15.0 ^a	12.1 ^b	1,2	0.073	0.001	0.452
ECC ⁵	4.9 ^b	7.4 ^a	5.3 ^b	0.7	0.016	0.001	0.437
<i>Perfil Bioquímico</i>							
Glicose (mg/dL)	98.7	99.9	89.5	9.4	0.861	0.081	0.163
Colesterol (mg/dL)	114.8 ^b	215.4 ^a	167.6 ^a	56.8	0.016	0.005	0.829
Triglicerídios (mg/dL)	37.3 ^b	61.3 ^a	45.0 ^b	11.3	0.008	0.001	0.326
Albumina (g/dL)	22.1 ^c	35.34 ^a	31.2 ^b	4.3	0.307	0.001	0.903
Creatinina (mg/dL)	0.6	0.7	0.7	0.1	0.559	0.601	0.986
Fosf Alcalina (IU/L)	60.9 ^b	130.1 ^a	59.5 ^b	58.2	0.440	0.059	0.344
Alan Aminot (IU/L)	35.5 ^b	65.8 ^a	40.2 ^b	12.2	0.049	0.001	0.269
Proteína Total (g/L)	45.4 ^b	70.6 ^a	68.2 ^a	7.9	0.126	0.001	0.451
<i>Perfil Hormonal</i>							
Insulina (uU/mL)	14.4	17.7	16.6	5.4	0.509	0.772	0.921
Leptina (ng/mL)	5.4	6.1	4.8	1.5	0.859	0.449	0.599

¹FM = Fase magra

²FGP = Fase de ganho de peso

³FPP = Fase de perda de peso

⁴EPM = Erro padrão da média

⁵ECC = Escore de Condição Corporal

^{a,b,c}

Média de valores com letras sobrescritas dentro da mesma linha tem diferença significativa (P<0.05).

Tabela 2: Caracterização por cão e gênero do número de cópias do filo *Bacteroidetes* e *Firmicutes* encontrado nas fezes durante as três fases da pesquisa.

Cão	Gênero	<i>Bacteroidetes</i> (cópias/ μ l x 10 ⁸)			<i>Firmicutes</i> (cópias/ μ l x 10 ⁸)		
		FM ¹	FGP ²	FPP ³	FM ¹	FGP ²	FPP ³
1	M	382.5	385.5	0.01	4.90	0.38	0.20
2	F	436.5	0.01	5.82	1.95	1.66	0.47
3	M	74.6	0.25	3.86	3.51	0.78	0.08
4	F	77.9	0.67	3.49	1.60	0.28	0.49
5	M	304.0	68.65	0.04	0.67	12.63	5.42
6	F	339.0	0.40	0.02	1.16	1.79	0.02
7	F	401.5	0.01	7.95	0.07	0.40	0.09
8	M	496.5	0.01	7.11	3.40	3.13	1.09
9	F	71.0	0.88	4.4	0.56	0.24	0.01
10	M	245.0	0.91	8.92	0.07	0.27	0.01
Média		282.9 ^a	45.73 ^b	4.16 ^b	1.79	2.15	0.79

¹FM = Fase magra

²FGP = Fase de ganho de peso

³FPP = Fase de perda de peso

^{a,b,c}

Média de valores com letras sobrescritas dentro da mesma linha tem diferença significativa (P<0.05).