

# Nutraceutici e variazione dell'asse microbioma/intestino/cervello nel cane

## Finanziamento PRID 2017

L'ipotesi in studio è stata di valutare l'azione di un estratto di polifenoli di uva standardizzato in proantocianidine sulla comunità microbica fecale nel cane, nota anche come microbioma, e sull'interazione che queste modifiche potevano avere con l'intestino e la comunicazione endocrina con il sistema nervoso centrale, definito come asse microbioma/intestino/cervello.

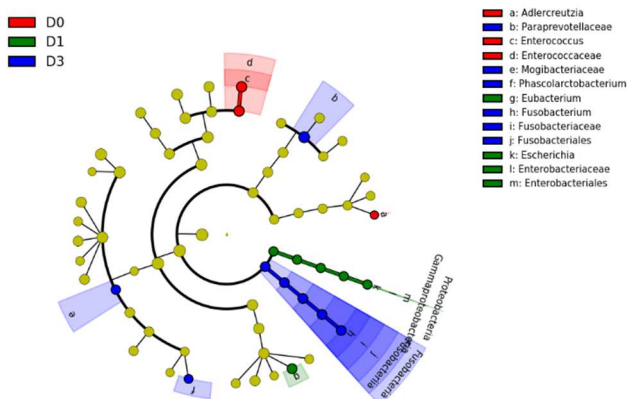
Per lo studio sono stati reclutati 24 cani clinicamente sani e adulti, ospiti di un rifugio. I soggetti, di varie razze e incroci, sia maschi che femmine, erano tenuti in box a coppie ed erano alimentati con uno stesso alimento completo che ricevevano di routine già prima dell'inizio dello studio. I soggetti sono stati suddivisi in 3 gruppi di 8 soggetti ciascuno, che sono stati costituiti per avere condizioni omogenee di peso, età e sesso. Un primo gruppo fungeva da controllo (D0) e riceveva una compressa placebo (D0), ovvero senza polifenoli e al secondo e al terzo gruppo veniva offerta una compressa in modo da ottenere un dosaggio di 1 mg/kg di peso vivo (D1) o di 3 mg/kg di peso vivo (D3). I polifenoli e il dosaggio sono previsti nell'alimentazione del cane e lo scopo dello studio era quindi di verificare se oltre alla nota attività antiossidante, questi composti erano in grado di migliorare il microbioma intestinale del cane e quindi avere degli effetti positivi sulla qualità di vita del cane.

Prima dell'inizio dello studio (T0) e dopo 14 (T14) e 28 (T28) giorni dall'inizio della somministrazione delle compresse, sono stati raccolti campioni di feci dal pavimento, subito dopo l'evacuazione, e un campione di saliva con un tampone adsorbente di materiale atossico, appositamente studiato per l'utilizzato anche nell'uomo. Dalle feci è stato estratto il DNA che è stato utilizzato per l'analisi del profilo tassonomico microbico, mediante amplificazione selettiva di regioni del gene 16S rRNA (V3 e V4), con una profondità di sequenziamento di 50000 reads di lunghezza di 300+300 paia di basi. Le reads sono state annotate seguendo il protocollo bioinformatico QIIME-2 e quindi è stato possibile ricostruire l'albero tassonomico batterico fino a livello di genere. I risultati sono stati espressi in termini di abbondanza relativa. Sui campioni di feci si è inoltre proceduto ad analizzare la concentrazione di acidi grassi volatili (acetico, propionici, butirrico, isobutirrico, valerico e isovalerico) e di acido lattico. I campioni di saliva sono stati analizzati con metodica ELISA per la determinazione della concentrazione di cortisolo e di serotonina, due ormoni che sono utilizzati per comprendere lo stato di risposta adattativa all'ambiente e all'alimentazione.

Un risultato molto interessante è stato l'aumento significativo della concentrazione di serotonina e del rapporto fra serotonina e cortisolo nel gruppo D3 in confronto con D0 e D1 ( $P < 0.05$ ) che ha confermato l'ipotesi in studio, ovvero di un'azione positiva dei polifenoli sull'asse microbioma/intestino/cervello.

Queste variazioni del profilo endocrino nella saliva sono risultate associate a variazioni delle abbondanze relative del microbioma a livello di genere, mentre di minore rilievo sono state le variazioni delle concentrazioni di acidi grassi volatili e di acido lattico. In particolare, come si può osservare nel cladogramma, è stata notata una variazione dei generi *Enterococcus*, *Adlercreutzia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* e *Phascolarctoacterium*.

I risultati indicano quindi che i polifenoli possono interferire con la comunità microbica intestinale, modificando positivamente la loro

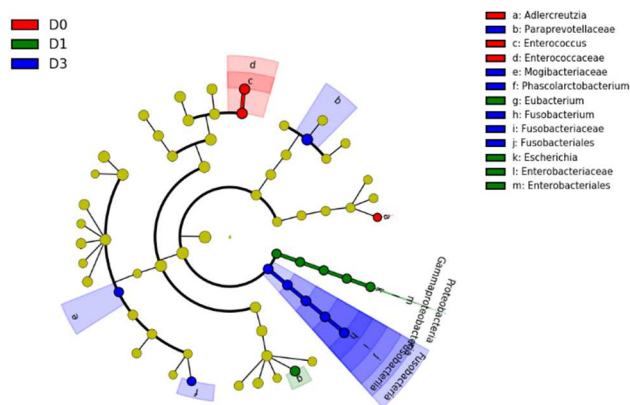


interazione con l'ospite, grazie alla modulazione della sintesi intestinale di serotonina a partire dal triptofano. Ulteriori studi sono tuttavia utili per confermare questi risultati.

## Modulation of microbiome-gut-brain axis with nutraceuticals in dog

### Grant PRID 2017

The study aimed at evaluating the role of a standardized polyphenol phytocomplex from grapes (GP) on the microbiome-gut-brain axis in dogs. For the trial, 24 dogs were recruited in a local shelter. The animals were housed in separated box and were adult, clinically healthy and of both sex and of mixed breed or different pure breeds. The dogs were assigned to 3 groups of 8 subject each, and fed the same commercial kibble diets since 2 months before the beginning of the study. One group (CTR) received a placebo tablet without GP, the second group (D20) and the third group (D60) was supplemented with tablets to achieve 20 or 60 mg/kg live weight of GP, respectively. At day 0 (T0), after 14 (T14) and 28 (T28) days, fecal and saliva samples were collected from each dog. Furthermore, at T0 and T28 the hair was also collected. The DNA of fecal samples were extracted with commercial kit and sequenced in 300 bp pair ends for V3 and V4 regions of the 16S rRNA using an Illumina platform. Reads were annotated using the QIIME bioinformatic pipeline and operational taxonomic units used to build the taxonomic tree. Fecal samples were also analyzed for short chain fatty acids (SCFA) and lactic acid (LA). The serotonin and cortisol concentrations of saliva and cortisol in hair were analyzed with ELISA. The



cortisol in hair were analyzed with ELISA. The supplementation of GP to the canine diet caused a significant increase ( $P < 0.05$ ) of serotonin and serotonin/cortisol ratio in the D60 group in comparison to CTR and D20 groups, confirming the hypothesis of the study and suggesting a positive interaction between microbiota and the host.

The endocrine variations were associated to some modifications of relative abundances of microbiota at a genus taxonomic level. In particular, the genera *Enterococcus*, *Adlercreutzia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* e *Phascolarctoacterium* varied among treatments,

as can be observed in the cladogram. Instead, minor differences were observed for the fecal concentrations of SCFA and LA.

The results suggest that GP interferes with gut microbial communities, modifying the interaction among them and with the host. If the observed variations of salivary serotonin are related to change in tryptophan metabolism in the gut deserves further evaluations.