

LUÍS NUNO DOMINGUES DUARTE SILVA

**A STUDY ON THE EFFICIENCY OF SYNBIOTICS
FOR PREVENTION AND CONTROL OF
DIARRHOEA IN 21 DOGS SUBMITTED TO
RADIOTHERAPY**

Orientador: Nuno Cardoso

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2013

LUÍS NUNO DOMINGUES DUARTE SILVA

**A STUDY ON THE EFFICIENCY OF SYNBIOTICS
FOR PREVENTION AND CONTROL OF
DIARRHOEA IN 21 DOGS SUBMITTED TO
RADIOTHERAPY**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária, no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Prof. Doutor Nuno Cardoso

Co-orientador: Prof. Doutor Pedro Almeida

Responsável Externo: Linda Matthewman

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

Este trabalho é dedicado aos meus pais e ao meu avô António Domingues.

Acknowledgments

Ao Doutor Nuno Cardoso, por ter aceitado a orientação científica desta dissertação, e por ter-se mostrado disponível para a resolução de problemas ou dúvidas que surgissem.

Ao Dr. Pedro Almeida, por ter sido o co-orientador e uma ajuda valiosa e indispensável na elaboração desta dissertação, e por ter tido sempre uma resposta célere aos meus pedidos e dúvidas na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Mauro Bragança, por toda a disponibilidade e tempo despendido para ajudar no tratamento de dados e estatística deste trabalho.

I would like to thank everyone at the VRCC: Dr. Susan North for allowing me to do my training there. The clinicians Dr. Henry L'Eplattenier, Laurent Findji, Andria Cauvin (who introduced me to this project), Mayank Seth, Jessica Grant, Beatriz Balañá, Jérôme Benoit and Miguel Solano, who all taught me so much and helped me improve my veterinary skills and knowledge. I would like to thank the nurses and the kennel assistants, who were a valuable help for this trial. Also, I would like to thank the interns, Tiago, Ana Liza, Lorenzo, Simona, Jan, Ben, Slavka, Evi and Humberto, for the teaching and companionship.

I would like to express my gratitude to Linda Matthewman, for giving me a project, for helping me during the course of the project and afterwards during the writing of the dissertation for providing me insight and so many papers and useful materials.

I would like to thank Probiotics International Ltd, for giving support and the necessary materials to develop this trial.

Especial agradecimento aos meus pais e ao meu irmão, que me deram uma oportunidade que provavelmente já não merecia, de poder tirar este curso e fazer algo na vida que me faz sentir realizado. Obrigado.

Ao meu avô, por ter sido a pessoa que foi. É com muita pena que não poderei partilhar o momento da graduação com ele, mas sei que consegui descansá-lo acerca do meu futuro antes da sua partida.

Aos meus companheiros de luta e amigos mais próximos: Assis Almeida, Valter Jordão, Vasco Frazão, Nuno Sobral, Odair Rodrigues, Duarte Raposo e Nuno Candeias. Pela força que sempre me deram, por tudo o que me ensinaram ao longo da vida e, essencialmente, pela vossa amizade.

Ao meu, agora, grande amigo João Figueira, que desde o primeiro dia do curso, e na altura sem me conhecer, se disponibilizou para me ensinar e pôs a sua clínica veterinária à disposição para que pudesse lá estagiar e aprender.

Aos meus colegas de curso e amigos Dário, Inácio, Moura, Nuno, Diogo, Beu, Tó, Bragança, Crespo por estes 6 anos juntos e por todos os bons momentos que passámos. Que o futuro nos cruze os caminhos novamente.

Abstract

A synbiotic is a formulation containing both probiotics and prebiotics. This study aims to evaluate the effect of supplementation with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* strain E1707 (NCIMB 10415) in preventing or controlling diarrhoea and other gastrointestinal signs in boarded canine radiotherapy patients. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial was carried out in 21 adult dogs undergoing radiotherapy and boarded for a duration period of 2 to 3 weeks to treat their cancers. Dogs were randomly divided between two groups: A and B, the synbiotic and placebo group, respectively. The content of the sachets was added to the food once daily. Faecal score was assessed daily, and dogs were also monitored for the development of diarrhoea and other gastrointestinal signs such as weight loss, reduced appetite and vomiting. The results from descriptive statistics seem to favour group B, however these findings were not validated with inferential statistics due to insufficient statistical sample power. Because of this, it is not possible to make conclusions about the benefits of synbiotic as supportive treatment for dogs undergoing radiotherapy. All results should be considered to be preliminary, until they are elucidated by further animal inclusion.

Key words: “Probiotics”, “*Enterococcus faecium*”, “radiotherapy”

Resumo

Simbióticos são formulações que contêm probióticos e prebióticos juntos. Esta dissertação teve como objectivo avaliar o efeito da suplementação com um simbiótico contendo *Enterococcus faecium* E1707 (NCIMB 10415) na prevenção e controlo de diarreia e outros sintomas gastrointestinais em cães internados para tratamentos de radioterapia. Este estudo foi concebido como um estudo randomizado, duplamente cego e controlado com um placebo, utilizando 21 cães adultos pacientes de radioterapia por um período entre 2 a 3 semanas. Os cães foram aleatoriamente divididos entre dois grupos: A e B, grupo do simbiótico e placebo, respectivamente. O conteúdo das saquetas foi adicionado diariamente à alimentação. Os animais foram monitorizados diariamente em relação à consistência das suas fezes e também sobre o aparecimento de diarreia ou outros sintomas gastrointestinais como perda de peso, anorexia e vômito. Os resultados da estatística descritiva parecem favorecer o grupo B, contudo estes não foram validados pela estatística inferencial devido a um insuficiente poder estatístico da amostra. Perante este facto, não é possível concluir que o uso de simbióticos não seja benéfico como tratamento de suporte em cães sujeitos a radioterapia. Todos os resultados devem ser considerados preliminares até que sejam esclarecidos pela inclusão de mais animais no estudo.

Palavras-chave: “Probióticos”, “*Enterococcus faecium*”, “radioterapia”

Introdução

Devido ao uso indiscriminado de antibióticos e aos seus efeitos adversos e resistências desenvolvidas, os médicos veterinários e também os proprietários dos animais procuram actualmente alternativas ao seu uso (Herstad, Nesheim, L'Abée-Lund, Larsen, & Skancke, 2010). Os probióticos e prebióticos apresentam-se como algumas das opções disponíveis mais utilizadas.

Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) definem os probióticos como “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”. Já os prebióticos são definidos pelas mesmas organizações como “ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam selectivamente o crescimento e actividade de bactérias específicas no tracto gastrointestinal e exercem efeitos benéficos no hospedeiro” (FAO and WHO, 2002). Os probióticos são na sua essência, então, bactérias que provocam efeitos benéficos directamente no hospedeiro, enquanto os prebióticos são substâncias que encorajam o crescimento de um determinado tipo de bactérias, pelo favorecimento dessas e suprimindo o crescimento de outros tipos.

O precursor do conceito de probióticos foi o professor Elie Metchnikoff, no início do século XX, quando observou que camponeses na Bulgária eram bastante saudáveis e tinham uma grande longevidade, ao que ele associou ao consumo regular de produtos lácteos fermentados contendo bactérias ácido lácticas (LAB), como o iogurte. Contudo, ele não reconheceu aos microorganismos intestinais propriedades benéficas para o hospedeiro. Para Metchnikoff, o benefício viria apenas da substituição dessas bactérias «prejudiciais» pelas bactérias benéficas presentes no iogurte (Holzapfel, Haberer, Snel, Schillinger, & Huis in't Veld, 1998).

Probióticos

O género de microorganismos usado como probiótico mais frequentemente são as LAB, como lactobacilli, bifidobacteria e enterococci. As LAB são bactérias gram-positivas produtoras de ácido láctico. São não esporuladas e normalmente sem mobilidade, sendo caracterizadas como anaeróbios facultativos (Prescott, Harley, & Klein, 1999).

Para serem consideradas um probiótico, as bactérias devem ter algumas propriedades pré-definidas. Basicamente, talvez necessitem de ser capazes de sobreviver à passagem pelo estômago e pelo intestino, e de proliferar e colonizar este último (Wynn, 2009). Por isso, devem resistir ao ácido gástrico e à bÍlis e ainda ter a capacidade para aderirem às células do epitélio intestinal, colonizar transitoriamente várias áreas do tracto gastrointestinal e permanecer lá tempo suficiente para exercer o seu efeito. Logicamente necessitam, também, de serem seguras para o hospedeiro e de manter a sua eficácia mesmo após o tempo de armazenamento (O'Mahony et al., 2009).

Prebióticos

Os prebióticos são não digeríveis para os mamíferos, uma vez que os mamíferos não têm a capacidade enzimática para digerir os oligossacáridos de cadeia curta ou cadeia longa que constituem os prebióticos. Contudo, estes compostos são fermentados pelos microrganismos presentes no colon e, uma vez que não são digeridos pelo hospedeiro, ficam totalmente à disposição para ser usado por esses mesmos microrganismos (Rastall & Gibson, 2006). Os prebióticos mais comumente usados são inulina e fructo-oligossacáridos. Os prebióticos estimulam o crescimento de determinados grupos de bactérias residentes benéficas no colon, como bifidobacteria, lactobacilli e eubactéria (Chen et al., 2013; Holzapfel & Schillinger, 2002). Devem resistir às enzimas digestivas mas ter a capacidade de ser fermentados pelos microrganismos presentes no colon. Devem ser capazes de diminuir o pH e de ser bifidogénicos, aumentando assim o número de bifidobacteria no intestino (de Vrese & Marteau, 2007).

Adicionalmente, existem formulações que consistem em probióticos e prebióticos juntos, às quais se dá o nome de simbióticos. Aparentemente, os prebióticos estimulam e aumentam o tempo de sobrevivência das bactérias probióticas, proporcionando-lhes um substrato imediato (Su, Henriksson, & Mitchell, 2007).

Modo de acção dos simbióticos

Embora os mecanismos pelos quais os probióticos exercem o seu efeito não sejam ainda completamente conhecidos, é reconhecido que eles conferem benefícios ao hospedeiro

pela introdução de bactérias benéficas no ambiente intestinal, consequentemente modulando a composição da microbiota (Kelley et al., 2009). Mais mecanismos de interação e sobrevivência das bactérias probióticas com outros microrganismos incluem a diminuição do pH intestinal (Asahara et al., 2004), competição por nutrientes que resulta na restrição de crescimento de bactérias patogênicas, produção de antitoxinas como a bacteriocina, que suprime o crescimento de outras bactérias (Heng et al., 2011; Todorov, Furtado, Saad, & Gombossy de Melo Franco, 2011), competição pela ligação a receptores específicos das células epiteliais do hospedeiro (Mukai et al., 2002) e também a capacidade de reduzir a aderência de bactérias patogênicas (Sun, Le, Shi, & Su, 2007). Os probióticos actuam na integridade da barreira intestinal e regulam a secreção de proteínas das tight junctions e de muco (Caballero-Franco, Keller, De Simone, & Chadee, 2007) e ainda produzem ácidos gordos de cadeia curta (SCFA), como o butirato, que são capazes de modular certas proteínas das tight junctions, melhorando consequentemente a integridade da barreira intestinal (Bordin, D'Atri, Guillemot, & Citi, 2004). Além disso, estudos mostraram que os probióticos têm efeitos anti-inflamatórios importantes: *Lactobacillus GG* teve efeitos preventivos e curativos em artrites induzidas em ratos, reduzindo a inflamação (Baharav, Mor, Halpern, & Weinberger, 2004), e num outro estudo induziu a maturação de células dendríticas (Elmadfa, Klein, & Meyer, 2010); probióticos reduziram a produção de citocinas por T helper tipo 2 (Th2) em pacientes alérgicos, diminuindo a secreção de interleuquina 4 (IL-4) e interleuquina 5 (IL-5) (Pochard et al., 2002). Outros efeitos em pacientes alérgicos foi a estimulação da resposta de linfócitos T e B e o aumento dos valores das imunoglobulinas A (IgA) e imunoglobulinas E (IgE) (Marschan et al., 2008).

Os prebióticos reduzem o pH no colon através da produção de SCFA como produtos do processo de fermentação (Marteau et al., 2004). Adicionalmente, os SCFA podem inibir o crescimento de bactérias potencialmente prejudiciais, como *Clostridium* e *Bacteroides* (Cummings & Macfarlane, 2002). SCFA também têm outros efeitos como o aumento da absorção de sódio, aumento do fluxo sanguíneo nas mucosas, regulação da proliferação celular, modulação das respostas imunes, diminuição dos valores sanguíneos de colesterol e efeitos na carcinogénese (Marteau et al., 2004).

Probióticos na diarreia

O tratamento da diarreia é provavelmente a utilização clínica mais frequente para administração de probióticos. O efeito de probióticos na prevenção e alívio de diarreia aguda

está bem documentado em medicina humana, especialmente em crianças, com muitos estudos clínicos convincentes. As crianças têm um sistema imune imaturo e uma microflora intestinal mais simples, quando comparada com a dos adultos, e essa pode ser a razão pela qual elas são particularmente responsivas aos probióticos (de Vrese & Marteau, 2007). Diminuição da frequência e da duração dos episódios de diarreia são alguns dos efeitos mais frequentemente observados nestes estudos (Pedone, Bernabeu, Postaire, Bouley, & Reinert, 1999; Saavedra, Bauman, Oung, Perman, & Yolken, 1994). Um estudo demonstrou a redução do tempo necessário para recuperar de diarreia aguda – 1,4 dias em crianças suplementadas com *Lactobacillus GG* contra 2.4 dias em crianças a receber o placebo (Isolauri, Juntunen, Rautanen, Sillanauke, & Koivula, 1991). Em adultos, as provas dos efeitos preventivos dos probióticos não são tão consistentes como nas crianças. Um estudo demonstrou a diminuição de diarreia do viajante em adultos (Black et al., 1989), no entanto outro não conseguiu identificar diferenças entre o grupo do probiótico e o grupo placebo no controlo de diarreia do viajante (Katelaris, Salam, & Farthing, 1995).

Em cães existem também estudos que suportam a eficácia dos probióticos na resolução de diarreia (Barlow, 2009; Herstad et al., 2010; (Kelley et al., 2009).

Barreira intestinal

É assim chamada à interface entre o conteúdo luminal do intestino, incluindo os microrganismos, e a mucosa intestinal com o seu sistema imunitário associado. As membranas mucosas ao longo do intestino e tracto respiratório são aproximadamente 200 vezes maiores do que a área de pele exposta. É nestes locais de exposição que os microrganismos invasores tentam passar pelas defesas e barreiras do hospedeiro e é também onde são largamente destruídos pelos mecanismos inatos e adquiridos de defesa. Em todas as membranas mucosas a microflora residente é muito importante como método de controlo dos patogéneos invasores, através da competição com estes e sua exclusão (Tizard, 2004). As membranas mucosas são constituídas por camadas simples ou múltiplas de células epiteliais, os enterócitos, que formam as tight junctions (Tizard, 2004). Estas junções formam um dos mecanismos de protecção presentes nos intestinos, rodeando cada célula completamente e fundindo-a com a célula adjacente. Deste modo selam o espaço intercelular. O objectivo das tight junctions é promover uma barreira que previna o movimento de materiais entre as células epiteliais, permitindo a difusão de iões e solutos de pequena dimensão e excluindo

macromoléculas tóxicas e microrganismos potencialmente patogénicos (Junqueira, & Carneiro, 2004). Adicionalmente, estas células estão frequentemente cobertas por uma camada de glicoproteínas solúveis, chamado muco, que forma a primeira linha de defesa no intestino (Junqueira, & Carneiro, 2004). Tem na sua composição imunoglobulinas IgA, que são sintetizadas pelos plasmócitos presentes na mucosa (Junqueira, & Carneiro, 2004). Além disso o muco também é rico em defensinas e lisozimas (Junqueira, & Carneiro, 2004). Finalmente, e sendo provavelmente a barreira protectora mais importante, o GALT tem um papel decisivo na imunidade (Junqueira, & Carneiro, 2004). A normal microflora intestinal e o epitélio intacto, juntamente com o GALT, representam uma barreira contra toxinas luminas, antígenos, bactérias e outras substâncias prejudiciais (Tizard, 2004). Foi demonstrado em estudos *in vitro* que os probióticos são capazes de prevenir o aumento da permeabilidade a pequenas moléculas e macromoléculas secundariamente a infecção por *Escherichia coli* enteroinvasiva (Resta-Lenert & Barrett, 2003). Yan and Polk (2002) provaram a capacidade dos probióticos de prevenir dano epitelial e apoptose induzidos por citocinas, e um outro estudo revelou um aumento da secreção de mucina luminal, o qual terá um efeito protector na superfície da mucosa intestinal (Caballero-Franco et al., 2007).

Adicionalmente, também existem estudos envolvendo modelos animais que provam o efeito dos probióticos no funcionamento da barreira intestinal. Eles diminuem a adesão bacteriana e previnem a translocação bacteriana, melhorando a função da barreira intestinal em ratos sujeitos a stress psicológico (Zareie et al., 2006) ou após cirurgia abdominal (Seehofer et al., 2004), ou até sépsis abdominal. Além disso, os probióticos aumentam a expressão de ocludinas na mucosa intestinal, que são vitais para o seu bom funcionamento (Qin et al., 2005).

Microbiota

Uma flora entérica estável é decisiva para manter a saúde intestinal e para estimular correctamente e desenvolver a imunidade. É composta por mais de 200 espécies, algumas delas são impossíveis de efectuar cultura, e por isso apenas podem ser detectadas e caracterizadas por fingerprinting molecular (Ettinger & Feldman, 2010a). O tracto gastrointestinal dos cães alberga uma colecção de microrganismos altamente complexa e resiliente, tais como bactérias, archaea, fungos, protozoários e vírus. Esta microbiota responde de modo diferente a tratamentos ou outras influências como a administração de probióticos (Garcia-Mazcorro et al., 2011). Existe uma grande variabilidade dentro da população canina

entre cada indivíduo, em termos da microflora intestinal (Biagi, Cipollini, Pompei, Zaghini, & Matteuzzi, 2007), a qual se desenvolve no início da vida, estabiliza na idade adulta e torna-se mais complexa na idade avançada, tornando a microbiota de cada indivíduo muito única (Mentula et al., 2005). Por vezes, também a resposta à administração de probióticos varia de indivíduo para indivíduo (Garcia-Mazcorro et al., 2011).

Adicionalmente, existem diferenças nos compartimentos do tracto gastrointestinal de cada indivíduo, em termos da composição e número total de bactérias, aumentando o número e a diversidade ao longo do intestino. Estas diferenças são o resultado da diferente disponibilidade de substrato, motilidade e secreções bactericidas e bacteriostáticas ao longo do tracto gastrointestinal. O ambiente adverso na porção proximal do tracto, devido a pH baixo, secreções pancreáticas e biliar, tornam o estômago e o duodeno locais com contagens baixas de número total de bactérias, quando comparado com compartimentos mais distais (Ettinger & Feldman, 2010). Um dos métodos para a caracterização da microbiota intestinal é a cultura bacteriana. Contudo, esta técnica tem limitações e falha na representação da diversidade presente no intestino, estimando-se que apenas menos de 5% das bactérias intestinais podem ser cultivadas. Muita da informação publicada sobre a composição da microbiota de cães é baseada em técnicas de cultura. Para estas técnicas, os valores variam entre 10^1 e 10^6 CFU/g no estômago (Benno, Nakao, Uchida, & Mitsuoka, 1992; Johnston, 1999) e menos de 10^3 CFU/g no duodeno; embora possa atingir até 10^9 CFU/g em alguns cães (Johnston, 1999). A contagem total de bactérias no jejuno pode variar entre 10^2 to 10^6 CFU/g (Mentula et al., 2005), enquanto o íleo pode conter 10^7 CFU/g (Suchodolski, 2011). Contagens bacterianas mais elevadas podem ser encontradas no colon, com valores entre 10^8 to 10^{11} CFU/g. A microbiota do colon é mais estável e similar entre os diversos cães do que quando comparada com a microbiota presente no intestino delgado (Mentula et al., 2005).

Devido às limitações das técnicas de cultura, as ferramentas moleculares começaram a ser usadas como as técnicas *standard* para o estudo da microflora gastrointestinal. Através do uso destas, foi possível detectar números elevados de espécies até então desconhecidas no interior do tracto gastrointestinal (Handl, Dowd, Garcia-Mazcorro, Steiner, & Suchodolski, 2011; Suchodolski et al., 2009). Suchodolski et al., (2009), recorrendo a pirosequenciação 454 com base no gene 16S rRNA estimaram que o número de bactérias residentes no jejuno canino pode ser de cerca de 200 espécies e 900 estirpes bacterianas. Também estas técnicas revelaram a mesma tendência mostrada pelas técnicas de cultura relativamente às variações ao

longo do tracto gastrointestinal. Elas mostram também que a diversidade bacteriana aumenta gradualmente ao longo do intestino (Suchodolski, Camacho, & Steiner, 2008).

Enterococcus spp.

Enterococcus são bactérias Gram-positivas do tipo cocos, que pertencem ao filo Firmicutes. São LAB que pertencem à flora entérica normal, existindo pelo menos 12 espécies reconhecidas. Têm a capacidade para crescerem na presença de bÍlis, e a sua resistência a esta é maior do que a resistência dos Lactobacilos. Os enterococcus são mais capazes de aderir ao muco intestinal do que os Lactobacilos, sendo que o *E. faecium* é a estirpe com as melhores capacidades de aderência (Strompfova, Laukova, & Ouwehand, 2004a) e maior tolerância a baixo pH (Strompfova, Laukova, & Ouwehand, 2004b).

E. faecium mostrou ser metabolicamente activo no tracto gastrointestinal de cães (Vahjen & Manner, 2003) e ter a capacidade para sobreviver à passagem pelo mesmo, persistindo neste por um período de até 3 meses após o término da administração de probióticos (Marcinakova, Simonova, Strompfova, & Laukova, 2006), embora num outro estudo não tenha sido possível detectá-lo em gatinhos uma semana após ter sido suspensa a suplementação (Veir et al., 2007). A aplicação de *E. faecium* enriquece a microflora colónica e induz efeitos mais ou menos pronunciados na microflora gastrointestinal (Vahjen & Manner, 2003), levando a um aumento da concentração de LAB e diminuição de bactérias Pseudomonas-like, Staphylococcus e *Clostridium spp* (Marcinakova et al., 2006). Adicionalmente, as evidências sugerem que o seu uso é seguro, não levando a quaisquer efeitos secundários mensuráveis (Benyacoub et al., 2003; Veir et al., 2007) ou toxicidade ou ainda infecção (Bybee, Scorza, & Lappin, 2011).

Mais, esta espécie demonstrou melhorar a função imunitária a longo prazo em cães em crescimento, através do aumento de IgG específico de CDV e IgA. A sua imunogenicidade foi confirmada pela resposta transitória de IgA contra *E. faecium* após a sua administração (Benyacoub et al., 2003). Contudo, num outro estudo não ocorreram diferenças entre as IgG e IgA de dois grupos de gatinhos aos quais foram administrados *E. faecium* (Veir et al., 2007).

Segurança na administração de probióticos

Existem obviamente algumas preocupações sobre a segurança do uso de probióticos e a possível translocação de bactérias que potencialmente leve a sepsis. Foram reportados

alguns casos isolados de bacteriemia em medicina humana, embora espécies como *Lactobacillus acidophilus* venham a ser utilizados desde há muitas décadas, desde que os produtos provenientes de leite fermentado começaram a fazer parte da dieta humana (S. Salminen et al., 1998). Numa revisão de 89 casos de pacientes sofrendo de bacteriemia com lactobacillus, foram encontradas 23 espécies probióticas de *Lactobacillus*. Contudo, esses pacientes estavam já hospitalizados por um período longo de tempo e/ou eram indivíduos imunodeprimidos, ou tinham tido cirurgias previamente (M. K. Salminen et al., 2004). Outro estudo com pacientes críticos sugeriu que a suplementação com probióticos não tornou os doentes mais susceptíveis de terem efeitos secundários, e além disso aumentou as concentrações séricas de IgA e IgG e diminuiu também a permeabilidade intestinal destes indivíduos (Alberda et al., 2007).

Não existem casos relatados de septicemia secundária à administração de probióticos em animais de companhia (Wynn, 2009) e, adicionalmente, não foram observados efeitos prejudiciais em estudos clínicos com Lactobacilli e Bifidobacteria (Delia et al., 2007; Kelley, Park, O'Mahony, Minikhiem, & Fix, 2010; Saxelin, Rautelin, Salminen, & Mäkelä, 1996). Contudo, alguns autores aconselham cautela quando se administram probióticos com animais severamente imunossuprimidos ou em doentes em estado crítico (Wynn, 2009). Embora membros do género *Enterococcus* e *Streptococcus* contenham alguns organismos patogénicos oportunistas, diversos estudos mostram a segurança de *Enterococcus* como bactéria probiótica (Benyacoub et al., 2003; Veir et al., 2007). Um outro estudo mostrou que *E. faecium* não desregulou o sistema imunitário, não levando a um aumento do risco de desenvolvimento de alergias, doenças auto-imunes ou inflamação (Benyacoub et al., 2003). Também foi considerado não ser uma causa de preocupação em termos de factores de virulência, estando livre da maioria desses factores (EFSA, 2004). Contudo, existem diversos relatos de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina, o que levanta algumas preocupações sobre o uso destas espécies como probióticos (Leclercq, Derlot, Duval, & Courvalin, 1988; Leclercq, Derlot, Weber, Duval, & Courvalin, 1989).

Radioterapia em Medicina Veterinária

Radioterapia é um tipo de tratamento oncológico bastante utilizado em medicina humana. Em medicina veterinária o seu uso é um pouco mais restrito, devido aos custos do equipamento e sua manutenção, estando ainda limitado a centros de referência importantes.

Os tipos de radiação utilizados são raios-X, raios gama e electrões. A radiação causa a excitação e ionização das células, originando danos no seu DNA que podem levar à morte celular. A radiosensibilidade é maior em tecidos com grande proporção de células em divisão, como é o caso dos tumores.

A radioterapia pode ser usada com efeitos curativos ou como uma abordagem paliativa, em casos de cancro incuráveis, com o objectivo de melhorar a qualidade de vida pelo máximo tempo possível. A radioterapia é mais eficaz em células cancerígenas microscópicas, sendo que estas têm a maior probabilidade de cura ou remissão por longos períodos de tempo. Além disso, pode ser utilizada em conjunto com cirurgia, especialmente quando não se conseguem atingir margens livres de tumor ou se existem dúvidas acerca da completa excisão deste. Nesses casos, a radioterapia pode ser administrada pré ou pós-cirúrgica, dependendo do tipo de tumor, tamanho e localização. Também quando o tumor não pode ser removido cirurgicamente, devido à sua localização anatómica como em casos de tumores intranasais ou intracranianos, é utilizada radioterapia.

Contudo, a radiação não é selectiva e destrói as células normais juntamente com as células cancerígenas, originando então efeitos secundários, que podem ser agudos ou tardios. Os efeitos agudos ocorrem durante ou imediatamente após o final dos tratamentos, como resultado da morte de células de multiplicação activa, como mucosas e epitélio da pele. Pode ocorrer eritema, descamação e dermative esfoliativa severa da pele e mucosa. Também pode ocorrer perda de pêlo – usualmente estes sintomas resolvem-se assim que as células se regeneram. Os efeitos tardios são mais graves e imprevisíveis, sendo normalmente progressivos e irreversíveis. Estas lesões demorarão meses ou anos a expressarem-se após a exposição à radiação.

Diarreia em pacientes de radioterapia

Podem ocorrer complicações como gastrite e diarreia secundariamente à radioterapia (Hall & Giaccia, 2012). Diarreia é um efeito secundário comum presente em quase todos os regimes de radioterapia, especialmente em abdominal e pélvica, onde pode atingir cerca de 50 a 90% dos pacientes, de acordo com estudos em medicina humana (Khalid et al., 2006). A irradiação pélvica e abdominal causa efeitos prejudiciais importantes na microflora e na mucosa intestinal, ocorrendo atrofia das vilosidades intestinais 2 a 4 dias pós-radiação (Hall &

Giaccia, 2012). A radiação causa a destruição da barreira intestinal, promovendo a perda de integridade do epitélio e o aumento da permeabilidade (McGough et al., 2008).

Uma preparação de probióticos, contendo 4 espécies de lactobacilos, 3 espécies de bifidobactérias e *Streptococcus salivarius termophilus* demonstrou reduzir a incidência de enterite e colite induzida por radiação em pacientes de radioterapia. Foi também demonstrada que esta preparação diminuiu a severidade da diarreia, quando comparada com o grupo placebo, com menos animais a necessitarem de intervenção com metronidazole durante o estudo (Delia et al., 2007).

Nem só causas físicas, como a radiação, podem ter um impacto na integridade da barreira intestinal. Cada vez mais, o *stress* está a ser reconhecido como uma causa e influência em doenças intestinais (Soderholm & Perdue, 2001), e é aceite que a integridade da barreira intestinal pode ser afectada por diversos tipos de *stress*. Muitas situações stressantes, como *stress* físico, *stress* do confinamento no canil, *stress* do transporte, ansiedade de separação, alterações na dieta, estão relacionadas com alterações na absorção de água, balanço osmótico e permeabilidade intestinal, levando a diarreias agudas em cães (Soderholm & Perdue, 2001).

Os mecanismos pelos quais o *stress* influencia a permeabilidade gastrointestinal não são ainda claros, mas foi demonstrado que a administração de CRH pode mimetizar a perda de função da barreira intestinal em ratos stressados. Como tal, pensa-se que os glucocorticóides possam ser responsáveis pelo aumento da permeabilidade (Santos et al., 1999). Adicionalmente, o *stress* pode também alterar a composição da microbiota, diminuindo o número de bactérias benéficas e permitindo aos microrganismos patogénicos crescer, aderir e colonizar a mucosa intestinal (Lutgendorff, Akkermans, & Soderholm, 2008). O *stress* também induz uma diminuição na produção de IgA, que é uma das primeiras linhas de defesas do organismo, responsável por aglutinar bactérias e impedi-las de se ligarem às células epiteliais intestinais (Caso et al., 2009). Estudos mostraram a importância dos probióticos ao contrariar as alterações na microbiota e barreira intestinal causadas pelo *stress* (Meddings & Swain, 2000).

Objectivos

- 1 - Confirmar se o uso de simbióticos tem os benefícios descritos anteriormente por outros autores, neste caso aplicado a cães sujeitos a radioterapia por um período de 2 a 3 semanas.
- 2 - Verificar se os efeitos secundários da radioterapia referidos na literatura se verificam nesta amostra.
- 3 - Verificar se existem diferenças na atitude, apetite, vômito e ocorrência de diarreia entre o grupo que recebeu a suplementação com o simbiótico contendo *Enterococcus faecium* E1707 (NCIMB 10415) e o grupo que recebeu o placebo.

Materiais e métodos

Tipo de estudo

O estudo foi concebido como um estudo randomizado, duplamente cego e controlado com um placebo, com o intuito de avaliar o efeito de um simbiótico em cães pacientes oncológicos e sujeitos a radioterapia. O produto era Pro-Kolin Enterogenic (Protexin Veterinary, Lopen Head, Somerset, UK), um simbiótico contendo as bactérias probióticas *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415) E1707. Adicionalmente continha:

- Alpha-glucan butyrogenic, que é fermentado pela microflora residente para produzir butirato, a fonte de energia preferencial dos colonócitos.
- MPS Protect, um mucopolissacárido que reforça a mucina intestinal.
- Preplex, um prebiótico contendo fructo-oligossacárido e goma-arábica.
- Mananoligosacarídeo.
- Beta-glucanos.

Os proprietários dos animais receberam uma descrição escrita detalhada do protocolo e um formulário de consentimento que teria que ser assinada antes que os seus cães entrassem no estudo. O protocolo foi aprovado por uma comissão de ética e bem-estar animal.

Local do estudo

VRCC, no 1 Bramston Way, West Mayne, Southfields Industrial Estate, Essex, SS15 6TP

Crêterios de admissão

Os animais em estudo foram cães aos quais foram diagnosticados tumores malignos e que foram admitidos como pacientes no hospital de referência oncológica VRCC para protocolos diários de radioterapia, por um período entre duas a três semanas. Não foram tidos em conta a idade, tamanho, raça, g nero, dieta e tipo de tumor dos animais aquando da inclusão no estudo. Foram incluídos cães sujeitos a radioterapia da região pélvica.

Randomiza o

Randomiza o simples com 2 grupos potenciais de tratamento, o grupo do simbiótico e o do placebo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente pelos grupos A ou B, e o conteúdo das saquetas respectivas foi adicionado diariamente   sua alimenta o.

Blinding

Todas as pessoas envolvidas no estudo ignoravam quais dos cães estavam a receber o probiótico e quais recebiam o placebo. O conteúdo das saquetas era adicionado uma vez por dia ao alimento, tal como recomendado pelo fabricante:   saqueta para cães com menos de 5 kg, 1 saqueta para cães com peso entre 5 e 15 kg, 2 saquetas para cães com peso entre 15 e 35 kg e 3 saquetas para cães com mais de 35 kg. A aparência das saquetas era idêntica, diferindo apenas na sua rotulagem com A ou B. O produto estava em forma de p , e também era idêntico nos dois tipos de saquetas.

Desenho do estudo

Ao serem admitidos para radioterapia os cães eram aleatoriamente designados para um de dois grupos. Um grupo recebia o produto em estudo e o outro grupo recebia o placebo. O fabricante forneceu saquetas identificadas com as letras A e B. Até ao final do estudo, foi ignorado por todos os envolvidos quais saquetas continham o produto e quais continham o placebo.

Os cães foram alimentados com uma marca comercial (Chappie), ao não ser que fosse pedido pelos proprietários uma altera o, quer para uma alternativa de comida caseira ou então para uma dieta mais selectiva, em cujos casos Royal Canin  Sensitivity Control (Sensitivity Control Diet , Royal Canin SA, Aimargues, France) era a dieta de primeira

escolha. O conteúdo das saquetas era adicionado uma vez por dia ao alimento. Depois, os animais foram monitorizados diariamente em relação à consistência das suas fezes ou ao desenvolvimento de diarreia, assim como ao aparecimento de outros sintomas gastrointestinais como perda de peso, redução de apetite ou vômito. Os animais que desenvolveram diarreia não foram medicados, a não ser que os clínicos sentissem que era necessária uma intervenção. Nestes casos o antibiótico de primeira escolha administrado seria metronidazole. Caso fosse necessário, seria feita antibioterapia, analgesia e seriam utilizados AINE's para combater dor ou outras complicações relacionados com o local de incidência da radioterapia.

Recolha de dados

Tabela 1 – Sistema de pontuação modificado CIBDAI utilizado neste estudo

<u>Sistema de pontuação modificado CIBDAI utilizado neste estudo</u>					
Atitude	0 Normal	-1 Deprimido	1 Excitado		
Apetite	0 Normal	1 Diminuído	2 Ausente		
Vômito	0 Não	1 Sim			
Consistência das fezes	0 Normal	1 Fezes ligeiramente moles	2 Fezes muito moles	3 Fezes aquosas	1 Fezes sangüinolentas

*Categorias de pontuação das fezes: 0 – ideal, fezes firmes; 1 – fezes ligeiramente moles, amorfas, mantendo ainda a maioria da forma; 2 – fezes viscosas e líquidas, com perda da maioria da forma; 3 – fezes aquosas, líquidas, sem matéria firme.

A pontuação da atitude foi feita através da observação do comportamento dos animais no canil. Um cão calmo, responsivo, alerta e pronto a interagir seria considerado como tendo uma atitude «normal»; um cão «deprimido» seria um que não prestasse atenção ao que o rodeava, dormindo ou estando deitado a maior parte do tempo, não demonstrando muito interesse na comida, pouco responsivo a estímulos; animais que estivessem em pé a maior parte do tempo, vocalizassem excessivamente, arranhassem as portas do canil ou tentassem insistentemente sair de lá, ou até que se tornassem agressivos seria considerados como «excitados».

Para o parâmetro apetite foi observado como reagiam os cães ao alimento. Um cão que estivesse interessado e terminasse a sua comida seria considerado como tendo o apetite «normal»; «diminuído» seria utilizado para animais que não comessem toda o alimento fornecido, como normalmente fariam. Por vezes estes animais comeriam um pouco mais se lhes fosse oferecido outro tipo de alimento mais palatável; um cão que não mostrasse interesse na comida, mesmo após alterá-la para algo mais palatável seria considerado como tendo o apetite «ausente».

O parâmetro vômito foi categorizado simplesmente como «presente» ou «ausente».

A consistência das fezes foi avaliada diariamente pelas mesmas pessoas, utilizando um sistema de pontuação que tinha os caracteres «Normais», «Ligeiramente moles», «Muito moles», «Aquosas» e «Sanguinolentas», como sugeridas por Kelley et al., (2009). Adicionalmente, foi registado cada vez que os animais defecaram, para que fosse possível avaliar um aumento na frequência. Também o apetite, atitude, peso e ocorrência de vômito de cada cão foram registados diariamente. Efectuaram-se medições de temperatura, frequência cardíaca e respiratória todos os dias, para avaliar o estado geral de saúde. Os animais estavam internados de segunda a sexta-feira para tratamento, mas a maioria era levada para casa durante o fim-de-semana. Como tal, foi pedido aos proprietários dos animais que adicionassem o conteúdo das saquetas ao alimento durante o fim-de-semana e que preenchessem as folhas de registo. Foi utilizado um sistema de pontuação modificado canine inflammatory bowel disease activity index (CIBDAI) para todos os animais acerca dos parâmetros de interesse (Jergens, Moore, Haynes, & Miles, 1992).

Para calcular se existia frequência de defecação aumentada, foi determinada a média do número de defecações para cada cão. De cada vez que o número de defecações diárias excedeu este valor médio foi dada a pontuação de 1. Devido ao facto de alguns cães terem tido constipação intestinal durante alguns dias durante o estudo, o número médio de defecações diárias nestes casos seria inferior a 1. Isto significaria que para esses cães, cada dia em que defecassem seria considerado que tinham frequência aumentada, o que não corresponderia à verdade. Para obter resultados mais fidedignos, o método foi ajustado e foram apagados todos os valores nulos aquando do cálculo da média. Também, todas as médias que fossem $\geq .5$ foram arredondadas para o número inteiro seguinte.

O parâmetro «Dias de diarreia» foi determinado adicionando o número de vezes que cada cão teve fezes de consistência alterada ao número de dias que esse mesmo cão teve uma frequência aumentada.

Processamento de dados

Os dados obtidos foram inseridos numa folha de cálculo, recorrendo ao software *Microsoft Office Excel 2010*®. Cada animal foi identificado juntamente com a sua idade, raça, género, grupo de estudo, tipo de tumor, local de tratamento, dieta no hospital e o resultado do teste de flutuação fecal realizado a todos os animais no início do período de internamento. Depois, toda a informação referente à atitude, apetite, vômito, consistência das fezes, frequência de defecação, alterações de dieta, peso diário e dias de tratamento foi adicionado à folha de cálculo. Cada fila representava um paciente e cada coluna representava uma das variáveis atrás referidas. Toda a informação foi depois inserida no software *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* IBM versão 20, onde as variáveis foram processadas.

Análise das fezes

Para excluir diarreias devido a parasitismo, foi efectuado um exame de flutuação fecal a todos os cães aquando da sua admissão, utilizando uma solução de sulfato de zinco. A amostra depois foi examinada microscopicamente para pesquisa de ovos, quistos e oocistos de parasitas, com uma ampliação de 100 x.

Avaliação estatística

Recorrendo ao programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* IBM versão 20, foram analisados os dados. Foi efectuada uma análise descritiva da informação recolhida. Foram computorizadas percentagens, percentagens cumulativas e frequências no software, para melhor descrever a distribuição dos valores das variáveis entre os dois grupos de estudo.

Também foi realizada estatística inferencial, embora limitada pelo poder estatístico da amostra. Neste estudo, a maioria das categorias falharam em ter contagens esperadas acima de 5 em pelo menos 80% das células nas tabelas de contingência. Este é um pré-requisito para

poder utilizar o teste chi-quadrado de Pearson, que avalia a relação entre duas variáveis categóricas, e como tal não foi aplicada esta metodologia.

Para os parâmetros «diarreia» e «vômito» (presença ou ausência) e a sua relação com o grupo A ou B, foi possível aplicar o teste exacto de Fisher, uma vez que ambos produzem uma tabela de contingência 2 por 2.

Para a análise das pontuações, o teste adequado para avaliar diferenças entre as pontuações dos grupos A e B foi o teste de Mann-Whitney.

A dimensão da amostra para comparar os grupos foi definida segundo a fórmula de Snedecor and Cochran (p. 102-105, 1989):

$$n = \left(\frac{(Z(a) + Z(b)) \cdot SD}{m1 - m2} \right)^2$$

Onde:

Z(a) é o valor do nível de confiança t do estudo em 95%.

Z(B) é o valor t do estudo de poder de 80%.

SD é o desvio padrão expectável (SDe= 4).

m1 - m2 é a diferença esperada entre os grupos de intervenção A e B (m1 - m2 = 2 pontos de diferença na pontuação de diarreia).

Esta fórmula foi concebida para definir a dimensão necessária da amostra para comparar médias. O tamanho da amostra, n, são 35 amostras emparelhadas ou 65 amostras independentes.

O estudo efectuado tem um total de 21 cães. Como tal, a estatística inferencial está comprometida, uma vez que falta poder estatístico necessário para calcular o mínimo efeito que será provável de ser detectado. Todos os resultados devem portanto ser considerados preliminares.

Resultados

Caracterização da amostra

Foram inicialmente incluídos no estudo 22 cães. Um deles foi removido do estudo por estar claramente doente e terem-lhe sido administrados múltiplos antibióticos durante o internamento. Adicionalmente, não lhe foi administrado o conteúdo das saquetas durante 4 dias seguidos. Como tal, foi removido do estudo e a análise final ficou com 21 animais, 10 no grupo A e 11 no grupo B.

Os animais foram internados por um período similar, com uma média de 20 dias para o grupo A e 19 dias para o grupo B.

Género

No grupo A 40% dos cães ($n = 4$) eram fêmeas esterilizadas e 60% eram machos castrados. O grupo B tinha uma distribuição diferente: 27,3% ($n = 3$) fêmeas esterilizadas, 36,4% ($n = 4$) machos castrados, 27,3 ($n = 3$) machos inteiros e uma fêmea inteira.

Idade

A idade variou de 2 até 11 anos. A média de idades da amostra total foi 7,62 anos e a mediana foi de 8 anos. A média do grupo A foi 6,7 anos e a média do grupo B foi 8,45 anos.

Raça

A raça mais predominante neste estudo foi o Labrador Retriever, com um total de 8 animais (38%). A segunda raça mais representativa foi o Boxer, com 3 animais (14%), seguido por 2 Golden Retrievers e 2 Staffordshire bull terriers. O resto da amostra foi composto por 1 Husky siberiano, 1 cruzado de Jack Russel, 1 Schnauzer gigante, 1 Spinone italiano, 1 Pastor maremano abruzês e 1 Flat-coated retriever.

Tipo de tumor

O tipo mais comum foi o sarcoma de tecidos moles, com 8 casos (38%). 3 meningiomas e mastocitomas foram o segundo tipo de tumor mais representativo (14% cada).

2 carcinomas de células escamosas, 1 sarcoma de baixo grau, 1 condrossarcoma, 1 hemangiossarcoma, 1 glioma e 1 sarcoma de células fusiformes completam a amostra.

Estatística descritiva

Em termos da pontuação da atitude dos animais, no grupo A, 30% (n = 3) teve pontuação negativa, enquanto 30% (n = 3) teve um resultado nulo e 40% (n = 4) teve resultado positivo. A propensão para ter resultados positivos (uma característica negativa, porque corresponde a excitação do animal) foi ligeiramente mais baixa no grupo B, com cerca de 37%. O resultado nulo, o resultado desejado num comportamento normal dos cães, foi 15,5% mais elevado no grupo B. Contudo, os cães com as pontuações mais baixas (-6) e mais altas (11) eram ambos do grupo B. O somatório das pontuações foi 18 para o grupo A e 8 para o grupo B.

Em relação às pontuações do apetite, 40% (n = 4) dos cães no grupo A teve uma pontuação nula, contra 45,5% (n = 5) no grupo B. O número de animais a ter pontuações diferentes do nulo foi de 6 em cada um dos grupos. As pontuações mais altas foram feitas por dois indivíduos no grupo B, com valores de 7 e 8. O somatório das pontuações do apetite foi de 17 para o grupo A e 23 para o grupo B.

Durante o estudo houve 3 animais que tiveram episódios de vômito, 2 do grupo A e 1 do grupo B. Um dos animais do grupo A teve 3 episódios de vômito. Os restantes apenas 1 episódio.

Dois cães no grupo A e dois no grupo B não desenvolveram diarreia durante todo o estudo. O cão com a pontuação de diarreia mais elevada estava no grupo B, com pontuação de 17. Um cão no grupo A (10%) teve apenas 1 dia de diarreia, enquanto o número de cães apenas com 1 dia de diarreia no grupo B foi de 4, correspondendo a 36,4%. Não se observaram tendências óbvias em relação a este parâmetro em ambos os grupos.

Em relação à frequência de defecação, 1 cão no grupo A e 4 cães no grupo B (36.4%) tiveram valores nulos. Foi considerado que todos os restantes animais tiveram uma frequência de defecação aumentada a dada altura durante o estudo. O cão com pontuação mais elevada estava no grupo A, teve pontuação 7. O somatório para a frequência de defecação foi 29 para o grupo A e 25 para o grupo B.

Estatística inferencial

O teste exacto de Fisher sugere que não existe relação entre a presença ou ausência de diarreia e o grupo de intervenção ($p = 0,476$). Sugere também que não existe relação entre a presença ou ausência de vômito e o grupo em que estavam inseridos no estudo ($p = 0,586$).

O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar diferenças estatísticas entre os dois grupos de intervenção. Pontuações de parâmetros como a atitude ($p = 0,863$), apetite ($p = 1,000$) e variação de peso ($p = 0,426$) não mostraram diferenças estatísticas significativas. Também foram comparados o vômito ($p = 0,654$), diarreia ($p = 0,863$), dias de diarreia ($p = 0,605$) e frequência de defecação ($p = 0,557$), novamente sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos A e B.

Discussão

A amostra foi reduzida ($n = 21$) para poder proceder a estatística inferencial. Os resultados da estatística descritiva não foram conclusivos, mas aparentam ser melhores para o grupo B, o grupo do placebo.

Os resultados da atitude revelam que a pontuação nula foi 15.5% mais elevada no grupo B do que no grupo A, e ainda que o somatório da pontuação foi mais baixo no grupo B – 8 pontos contra 18 do grupo A. Talvez este parâmetro possa ser considerado o mais difícil de interpretar e ser medido neste estudo, uma vez que é subjectivo e depende de factores externos. Alguns cães eram naturalmente mais excitáveis e nervosos; outros eram mais calmos e até deprimidos. Talvez seja mais razoável pensar que a atitude de cada um dos cães influenciou o desenvolvimento de diarreia relacionada com *stress* (Soderholm & Perdue, 2001), em vez de pensar que a atitude que os cães apresentavam era um reflexo desse indivíduo não estar bem de saúde e consequentemente assumir-se que os probióticos ou o placebo não estavam a ser eficazes. Como foi referido, foi diariamente medido a temperatura e frequências respiratórias e cardíacas de cada animal, sem serem encontradas alterações como febre ou frequências cardíacas aumentadas que pudessem sugerir que os cães estavam doentes. Em primeiro lugar, isto ajuda a evidenciar a segurança deste produto. Além disso, sugere que as atitudes dos animais se deviam não a estarem doentes, mas mais algo relacionado com o carácter de cada um deles.

Também os resultados para o apetite foram ligeiramente melhores para o grupo B em relação às pontuações nulas, 45,5% contra 40% no grupo A. Contudo, neste parâmetro o somatório das pontuações de apetites foi mais elevado para o grupo B – 23 contra 17 no grupo A.

Dois animais vomitaram no grupo A e um animal vomitou no grupo B. Um dos animais pertencentes ao grupo A que vomitou teve 3 episódios de vômito, sendo que 2 desses 3 ocorreram quando foi a casa passar o fim-de-semana. Uma vez que o vômito foi raro durante este estudo, é possível pensar que estes episódios se possam ter devido a algo que foi dado a comer pelos donos ou até pelo *stress* da viagem, ao invés de pensar que seja um efeito secundário da radioterapia. O outro cão pertencente ao grupo A que vomitou fê-lo no primeiro dia de internamento, por isso é improvável que tenha sido relacionado com o tratamento.

O mesmo número de cães em ambos os grupos não desenvolveu diarreia durante todo o estudo, 2 animais em cada grupo. Um cão no grupo A desenvolveu diarreia durante apenas 1 dia, enquanto o número de cães no grupo B com apenas 1 dia de diarreia foi melhor – 4 animais, o que corresponde a 36,4%. Em termos da frequência de defecação, apenas 1 cão no grupo A teve uma pontuação nula (10%), ocorrendo em 4 cães no grupo B (36,4%) esse mesmo resultado desejado. O somatório das frequências de defecação foi mais elevado para o grupo A – 29 contra 25 no grupo B. O cão com a pontuação de frequência mais elevada estava no grupo A, com 7 dias de frequência aumentada. Estes resultados contrariam alguma literatura, que suporta a eficácia dos probióticos na prevenção e resolução de diarreia em cães (Barlow, 2009; Kelley et al., 2009). Contudo, outros resultados encontrados neste estudo confirmam essa mesma literatura, uma vez que não parecem apoiar a ideia de que o produto B melhorava a saúde dos cães e diminuía os sintomas gastrointestinais, quando comparado com o produto A. Por exemplo, os cães com as pontuações mais elevadas e mais baixas no parâmetro «atitude» estavam ambos no grupo B. Também as pontuações mais elevadas no parâmetro «apetite» foram feitas por 2 cães no grupo B. Finalmente, o cão com a pontuação mais elevada de diarreia também era do grupo B.

Khalid et al., (2008) referem que em humanos 50 a 90 % dos pacientes sujeitos a radioterapia abdominal ou pélvica desenvolvem diarreia. Houve apenas 1 cão (grupo A) sujeito a radioterapia pélvica neste estudo. De acordo com a literatura, pode assumir-se que estava em maior risco de desenvolver diarreia do que os restantes. Os resultados confirmaram o que está descrito na literatura, tendo tido esse cão pontuações de diarreia elevadas e tendo

sido o animal com mais dias de diarreia. Isto pode distorcer os resultados comparativos finais e fazer o grupo A parecer ter piores resultados do que o grupo B. Seria interessante comparar apenas animais sujeitos a radioterapia abdominal ou pélvica, mas a casuística não o permitiu.

Soderholm & Perdue (2001) referem a importância do stress como uma influência para o desenvolvimento de doenças intestinais. Durante este estudo, vários cães desenvolveram diarreia quando foram a casa durante o fim-de-semana ou no dia imediatamente a seguir a terem regressado. Isto pode dever-se ao stress de transporte, excitação por estarem novamente com os seus proprietários, ansiedade por tornar a deixar a sua casa, e ainda alterações na dieta ou «guloseimas» dadas pelos proprietários. Além disso, foi pedido aos proprietários dos vários animais que adicionassem o conteúdo das saquetas ao alimento dos seus cães durante o fim-de-semana, que monitorizassem as fezes e ainda que preenchessem as folhas de pontuação o mais completo e preciso possível. É impossível saber se os proprietários realmente deram as saquetas aos seus animais, ou até se não lhes deram «guloseimas» que possam ter causado diarreia. Obviamente, é improvável que a pontuação e monitorização das fezes feitas pelos proprietários seja tão precisa como as que foram feitas por nós investigadores. Alguns proprietários nem preencheram as folhas de registo, originando assim informação que não nunca foi conhecida. Todos estes factores podem dar-nos resultados tendenciosos e distorcer os resultados. Idealmente, o estudo deveria proceder-se sem que os animais abandonassem as instalações onde este decorreu. Deste modo evitar-se-iam alguns dados erróneos e falta de informação.

Este estudo apresenta resultados preliminares e está inserido num estudo mais alargado que vai ter continuidade. Espera-se com isto obter resultados que nos permitam outro tratamento estatístico. Este estudo apenas teve 21 cães, por isso os resultados são facilmente distorcidos.

Conclusão

Neste estudo não foi provada a eficácia de um simbiótico na prevenção e controlo de diarreia e outros sinais gastrointestinais em cães internados para tratamento com radioterapia. No entanto não se pode excluir os benefícios do uso deste produto, à luz dos efeitos descritos na literatura. Os sinais gastrointestinais foram comuns nos animais que fizeram parte deste estudo, sendo que, para o único caso de radioterapia pélvica, os resultados estiveram entre os

mais severos. Neste estudo não se verificaram diferenças óbvias para os diversos parâmetros entre os animais suplementados com o simbiótico e os animais suplementados com o placebo.

Uma vez que estes resultados não foram validados pela estatística inferência, talvez sejam elucidados pela inclusão de um maior número de animais, que permita atingir um tamanho de amostra adequado.

List of abbreviates and symbols

CDV – Canine Distemper Virus

CFU/g – Colony-Forming Units per Gram

CRH – Corticotropin-releasing Hormone

CT – Computerized Tomography

DC – Dendritic cells

DNA – Deoxyribonucleic acid

FAO – Food and Agriculture Organization

GALT – Gut-Associated Lymphoid Tissue

GI – Gastrointestinal

Gy - Gray

IgA – Immunoglobulin A

IgE – Immunoglobulin E

IgG – Immunoglobulin G

IL-10 – Interleukin 10

IL-4 – Interleukin 4

IL-5 – Interleukin 5

LAB – Lactic acid bacteria

NFkB – Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK cells – Natural killer cells

NSAID – Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction

rRNA – Ribosomal Ribonucleic Acid

SCFA – Short-chain fatty acids

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

Th2 – T helper cell type 2

TLR – Toll-like receptors

TNF α – Tumour necrosis factor alpha

TPR – Temperature, Pulse and Respiration

VRCC – Veterinary Referrals for Cancer and Critical Care

WHO – World Health Organization

INDEX

1 – Introduction	34
1.1 General introduction.....	34
1.2 Probiotics.....	34
1.3 Prebiotics.....	35
1.4 Mode of action of synbiotics	36
1.5 Probiotics in diarrhoea	37
1.6 The intestine and immunity	38
1.6.1 Intestinal barrier	40
1.7 Microbiota	41
1.7.1 Enterococcus spp.....	43
1.8 Safety of probiotic administration.....	44
1.9 Radiotherapy in Veterinary Medicine	45
1.10 Diarrhoea in Radiotherapy patients.....	46
1.11 Vomiting and anorexia in Radiotherapy patients	47
1.12 Objectives.....	49
2 Materials and methods	50
2.1 Study type.....	50
2.2 Study site	50
2.3 Admission criteria	50
2.4 Randomization	51
2.5 Blinding.....	51
2.6 Experimental design.....	51
2.7 Variables in study.....	52
2.8 Data Processing	54
2.9 Stool analysis	54
2.10 Statistical evaluation	55
3 Results.....	57
3.1 Sample.....	57
3.1.1 Gender	57
3.1.2 Age	57
3.1.3 Breed	57
3.1.4 Type of tumour.....	57
3.2 Descriptive statistics.....	58
3.3 Inferential statistics	66

4	Discussion	68
5	Conclusion.....	71
	References.....	72

Tables Index

Table 1 Modified CIBDAI scoring system used in this study.....	51
Table 2 Attitude scores for both groups.....	58
Table 3 Appetite scores for both groups.....	60
Table 4 Vomiting scores for both groups.....	61
Table 5 Diarrhoea scores for both groups.....	62
Table 6 Total days of diarrhoea scores for both groups.....	64
Table 7 Presence or absence of diarrhoea for both groups.....	65
Table 8 Presence of absence of vomiting for both groups.....	65
Table 9 Comparison in all parameters between both groups.....	66

1 – Introduction

1.1 General introduction

More and more, veterinarians and pet owners are looking for alternatives to the indiscriminate use of antimicrobials, in view of their possible adverse effects in gastrointestinal diseases and the growing antibiotic resistances (Herstad et al., 2010). Therefore, nutrition-based health products are becoming increasingly popular, and the food components benefits are being taken more into account (Adams, 2010). There are mainly two types of products used as nutrition-based health strategy: probiotics and prebiotics.

Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) currently define probiotics as “Live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host”. As for prebiotics, they are defined by the same organizations as “Nondigestible food ingredients that selectively stimulate the growth and activities of specific bacteria in the gastrointestinal tract and exert beneficial effects on the host” (FAO and WHO, 2002). In essence, probiotics are bacteria that have beneficial effects directly on the host, whilst prebiotics are substances that encourage the growth of certain bacteria and potentially suppress the growth of other types of bacteria.

The idea of probiotics started in the beginning of the twentieth century, when Professor Elie Metchnikoff observed that peasants from Bulgaria had enhanced health and longevity associated with the regular consumption of fermented dairy products containing Lactic acid bacteria (LAB), such as yogurt. However, he did not recognize the gut flora as beneficial, he thought them to be harmful and he suggested that the benefits could only come from substitution by yoghurt bacteria (Holzapfel, Haberer, Snel, Schillinger, & Huis in't Veld, 1998). Nowadays, most of the viable strains of probiotics are available in the market as lyophilized products or as fermented food products, such as paste or biscuits in the case of dogs (Holzapfel & Schillinger, 2002).

1.2 Probiotics

LAB such as lactobacilli, bifidobacteria and enterococci are the genera of microorganisms most frequently used as probiotics (Black et al., 1989; Kelley et al., 2009).

LAB are gram-positive bacteria that produce lactic acid as fermentation product. They are nonspore forming and usually nonmotile, and are categorized as facultative anaerobes (Prescott et al., 1999). These microorganisms do not necessarily need to be usual inhabitants of the gastrointestinal (GI) tract of a specific species to exert beneficial effects on the general health of a target animal (Fuller, 1989), or even to be live cells, since it appears that the metabolites from dead probiotic cells can also generate a beneficial biological response (Sashihara, Sueki, & Ikegami, 2006). Historically, strains of *L. acidophilus* and *L. casei Shirota* are among the bacterial strains used since early times in search of health benefits (Holzapfel et al., 1998). In order to be considered probiotics, bacteria must have some predefined properties: mainly they may need to be able to survive the passage through the intestine and be capable of proliferating and colonizing the gut (Wynn, 2009). To do this, first of all, they need to resist gastric acid and bile. Furthermore they need to have the ability to adhere to intestinal epithelial cells and transiently colonize various areas within the GI tract and persist there long enough to exert their effect. Obviously, in order to be considered probiotics they need to be safe, and they should maintain effectiveness for the duration of the product's shelf life (O'Mahony et al., 2009).

1.3 Prebiotics

Prebiotics are short or long chain oligosaccharides, which are indigestible for mammals because they do not possess specific digestive enzymes to break the prebiotics down into molecules that can be absorbed. However, these oligosaccharides are fermented by the microorganisms present in the colon, and since they are nondigestible food ingredients, they remain entirely available to be used by these bacteria (Vernazza, Rabiou, & Gibson, 2006). The most commonly used prebiotics are inulin and fructo-oligosaccharides. Prebiotics stimulate the growth of certain groups of beneficial resident bacteria in the colon, such as bifidobacteria, lactobacilli and eubacteria (Chen et al., 2013; Holzapfel & Schillinger, 2002). Prebiotics stimulate the growth of certain microorganisms, but simultaneously leave other bacteria groups unaffected, thus shifting the composition of microflora in the gut (Vernazza et al., 2006). A prebiotic should have: resistance to host digestive enzymes but be fermented by the colonic microorganisms, lower the intestinal pH and be bifidogenic, meaning that it should increase the number of bifidobacteria in the intestine (de Vrese & Marteau, 2007).

Additionally, there are formulations consisting of both probiotics and prebiotics, called synbiotics, which apparently can stimulate the growth and increase the survival time for the probiotic bacteria by providing them with an immediate substrate (Su, Henriksson, & Mitchell, 2007).

1.4 Mode of action of synbiotics

Although the mechanisms by which probiotics work are not fully understood yet, it is recognized that they confer benefit to the host by introducing beneficial bacteria into the intestinal environment, consequently modulating the composition of the microbiota (Kelley et al., 2009). More mechanisms of interaction and survival against other microorganisms include lowering the luminal pH (Asahara et al., 2004), competition for nutrients that result in growth restrictions for pathogenic bacteria, production of antitoxins like bacteriocin that suppress the growth of other bacteria (Heng et al., 2011; Todorov et al., 2011), competition for binding to specific receptors on host epithelial cells (Mukai et al., 2002), and also the ability to reduce adherence of pathogenic bacteria (Sun et al., 2007). Probiotics act on the integrity of the intestinal epithelial cell barrier and regulate tight junction proteins and mucus secretion (Caballero-Franco et al., 2007) and they also produce Short-chain fatty acids (SCFA), like butyrate, which can modulate certain tight junctions proteins, consequently improving the epithelial barrier integrity (Bordin, D'Atri, Guillemot, & Citi, 2004). Furthermore, studies show that probiotics have important anti-inflammatory effects: *Lactobacillus GG* had preventive and curative effects in induced arthritis in rats, reducing inflammation (Baharav et al., 2004), and in another study induced maturation of dendritic cells (Elmadfa et al., 2010); *Lactobacillus acidophilus* decreased gastric inflammation by regulating Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFkB) activity (Yang, Chuang, Yang, Lu, & Sheu, 2012); probiotics reduced the T helper type 2 (Th2) cytokine production in allergic patients, lowering Interleukin 4 (IL-4) and Interleukin 5 (IL-5) secretion (Pochard et al., 2002). Other effects in allergic patients were stimulation of allergen-specific B and T cells responses and increasing total immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin E (IgE) levels (Marschan et al., 2008).

Prebiotics reduce the pH in the colon through the production of SCFA as by-products of the fermentation process (Marteau et al., 2004). Furthermore, the SCFA may inhibit the

growth of potentially harmful bacteria, such as *Clostridium* and *Bacteroides* (Cummings & Macfarlane, 2002). Also, SCFA have other effects like increasing sodium absorption, increasing mucosal blood flow, regulating cellular proliferation, modulating immune responses, decreasing blood cholesterol levels, and influencing carcinogenesis (Marteau et al., 2004).

1.5 Probiotics in diarrhoea

The treatment of diarrhoea is probably the most usual clinical application of probiotics. The effect of probiotics in prevention and alleviation of acute diarrhoea is well documented in people, especially in children, with many convincing clinical trials (Isolauri et al., 1991; Nixon, Cunningham, Cohen, & Crain, 2012; Saavedra, Bauman, Oung, Perman, & Yolken, 1994). Children have an immature immune system and a simpler intestinal microflora when compared to adults, and that may be the reason why they are particularly responsive to probiotics (de Vrese & Marteau, 2007). Decrease of frequency and duration of diarrhoea episodes are some of the most frequently observed effects in those studies. One study has showed a reduction of time when recovering from acute diarrhoea. The results showed 1.4 [0.8] days of diarrhoea in children receiving *Lactobacillus* GG versus 2.4 [1.1] days in children receiving the placebo (Isolauri et al., 1991). This is supported by a study comparing jellied milk, conventional yoghurt, and probiotic yoghurt, where the mean duration of diarrhoea was found to be shorter with the probiotic yoghurt (Pedone, Bernabeu, Postaire, Bouley, & Reinert, 1999). Other study showed a reduction in the incidence of diarrhoea in children, as well as a difference of 10% in the treatment group versus 39% in the placebo group of infants shedding rotavirus during the study (Saavedra et al., 1994). *Lactobacillus* strains have been shown to ameliorate and decrease the duration of diarrhoea in acute infections in children, and they seemed to have beneficial effects against rotavirus (Rosenfeldt et al., 2002). In adults, evidences of the preventative effects on diarrhoea are not as consistent as in children. One study showed that travellers' diarrhoea in adults was decreased by the consumption of probiotic capsules containing a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria bifidum*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (Black et al., 1989). Another study showed no differences in travellers' diarrhoea between adults consuming the probiotics or the placebo (Katelaris et al., 1995). In spite of those contradictory results, a meta-analysis of 34 randomized placebo-controlled trials suggested acute diarrhoea

(-26%) and travellers' diarrhoea (- 8%) to be reduced in adults consuming probiotics (Sazawal et al., 2006).

In dogs, there are studies supporting the efficacy of probiotics in the resolution of diarrhoea (Barlow, 2009; Kelley et al., 2009). In a study with adult dogs with acute diarrhoea receiving either *Bifidobacterium animalis* or a placebo, it was found that dogs in the probiotic group reduced the mean number of days to resolve the diarrhoea when compared to the placebo group (3.9 [2.3] versus 6.6 [2.7] days). Furthermore, the dogs in the probiotic group did not require treatment with metronidazole as frequently as the dogs in the placebo group (Kelley et al., 2009). Another study involving adult dogs in a re-homing centre showed the placebo group to have more diarrhoea episodes than the probiotic group throughout the study, almost double the incidence. This study used a symbiotic containing *Enterococcus faecium* (Barlow, 2009). A probiotic cocktail containing thermo-stabilized *Lactobacillus acidophilus* and live strains of *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus farciminis* was effective in shortening the period of diarrhoea when compared to the placebo group, 1.3 days (95% CI: 0.5 to 2.1) for the probiotic group and 2.2 days (95% CI: 1.3 to 3.1) for the placebo group (Herstad et al., 2010).

1.6 The intestine and immunity

The main interaction site between the host and microbiota is the intestine, and the interaction starts immediately after birth, when the GI tract is colonized with up to 10^{12} microorganisms per gram of intestinal content (Artis, 2008). Along with its digestive and absorptive function, the small intestine is the most complex and largest immunologic organ in the body, containing large amounts of lymphoid tissue. The collection of lymphoid nodules, Peyer's patches, and individual lymphocytes in the intestinal walls are called GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), which have the ability to initiate an immune response as a result of possessing T cells, B cells, and dendritic cells. Peyer's patches are masses of lymphocytes structured in follicles and covered with an epithelium containing specialized cells, called M cells. Dendritic cells (DC) and M cells are two routes by which macromolecules and microorganisms can pass through the intact intestinal wall and be presented to the lymphoid tissues, to stimulate the innate and adaptive immune systems. Dendritic cells act by extending their cytoplasmic processes between the epithelial cells, by

transporting organisms and macromolecules within their cytoplasm and by presenting them to naïve T cells. M cells take up antigens from the lumen directly and present them to nearby lymphocytes (Tizard, 2004). There are receptors for microbial molecules in the intestinal epithelial cells. Some of those receptors are toll-like receptors (TLR). TLR stimulate the transcription of antimicrobial proteins, pro-inflammatory cytokines and chemokines via NF- κ B pathway, regulating in this way part of intestinal immunity (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010). DC recognize pathogens essentially via TLR and translate those signals into factors that polarize Th1 and Th2 cells.

Phagocytic cells, such as neutrophils, monocytes, macrophages and natural killer cells (NK) are cells of innate immunity. They are not very specific in recognizing their targets, but they function as the first line of defence against pathogens. As for cells of adaptive immunity, T cells do not respond to free antigens, only to antigens that were previously presented by antigen presenting cells (APC). Because of this, DC, macrophages, and monocytes act as APC and present those antigens to T cells (Gourbeyre, Denery, & Bodinier, 2011).

It is well known that the intestinal microbiota interacts and has important functions in the gastrointestinal tract. Intestinal microorganisms have a crucial role in host health, acting as a defending barrier against invading pathogens, helping in digestion of nutrients and giving nutritional support to the enterocytes (Lenoir-Wijnkoop et al., 2007). Besides, this microbiota stimulates the development and maintenance of an effective immune system (Toh, Anzela, Tang, & Licciardi, 2012). Several studies have shown that probiotic bacteria are able to modulate both innate and adaptive immunity. An immune response can be initiated by activation of TLR by the bacteria. Probiotic bacteria stimulated the activity of natural NK (Haller, Blum, Bode, Hammes, & Schiffrin, 2000), increased the expressions of TLRs, and also enhanced the production of TNF α and IL-10 in the Peyer's patches of healthy mice (Castillo, Perdigon, & de Moreno de Leblanc, 2011). Another study corroborated the production of Tumour necrosis factor alpha (TNF α) by probiotics, and the release of interleukin 10 (IL-10) and interleukin 6 (IL-6) (Miettinen, Vuopio-Varkila, & Varkila, 1996). Probiotics enhance intestinal barrier integrity, reduce colonic permeability and decrease inflammation in cases of colitis (Ewaschuk et al., 2008), and they may also increase the survival of epithelial cells by preventing cytokine-induced epithelial damage (Yan & Polk, 2002). Moreover, LAB bacteria have been shown to induce proliferation of immune cells and antibodies (Majamaa, Isolauri, Saxelin, & Vesikari, 1995).

1.6.1 Intestinal barrier

The interface between the luminal contents of the gut, commensal microorganisms included, and the intestinal mucosa and its associated immune system is called the intestinal barrier.

The mucous membranes along the intestine and respiratory tracts are approximately 200 times larger than the area of skin exposed. Along with the skin, these are sites that have contact with the exterior. It is at these sites of exposure that invading microorganisms try to pass through the host's barrier and it is where they are largely destroyed by both innate and acquired protective mechanisms. In all mucous membranes the resident microflora is very important acting as a control for the invasive pathogens, by competing with and excluding them (Tizard, 2004). Mucous membranes are constituted by single or multiple layers of tightly packed epithelial cells, the enterocytes, which form intercellular tight junctions (Tizard, 2004). These junctions form one of the protective mechanisms present in the intestines, since they are the most apical junctions in the cell, surrounding each cell completely and fusing with adjacent cells membranes. In this way, they seal the intercellular space. The main purpose of tight junctions is to promote a barrier that prevents the movement of materials between epithelial cells, allowing the diffusion of ions and small solutes and excluding toxic macromolecules and potentially pathogenic microorganisms (Junqueira, & Carneiro, 2004, p. 70). Additionally, these cells are frequently covered with a layer of soluble glycoproteins, called *mucus*, which forms the first line of defence in the gut (Junqueira, & Carneiro, 2004, p. 258). The mucus acts as a physical barrier preventing the harmful microorganisms to reach the enterocytes, and traps and expels these pathogens as well (Tizard, 2004). It has in its composition IgA which are synthesized by plasma cells on the mucosa (Junqueira, & Carneiro, 2004, p. 258), and it is also rich in defensins and lysozymes. It is suggested that mucus IgA content may be important in preventing bacterial adherence and translocation (Bai, Liu, & Su, 2000).

The most important protective barrier, the GALT has a decisive role in immunity (Junqueira, & Carneiro, 2004, p. 302). All together, the normal intestinal microflora and the intact epithelium, and its gut-associated immune system, represent a barrier against luminal toxins, antigens, bacteria and other noxious substances (Tizard, 2004). It has been shown from *in vitro* studies that probiotics are capable of preventing the increase of epithelial

permeability to small molecules and macromolecules secondary to enteroinvasive *Escherichia coli* infection (Resta-Lenert & Barrett, 2003). Yan and Polk (2002) found probiotics to prevent cytokine-induced epithelial damage and apoptosis, and another study found an increase in luminal mucin secretion, which will have a protective effect on the mucosal surface (Caballero-Franco et al., 2007).

Additionally, the effect of probiotics on intestinal barrier function is also proven by several studies involving animal models. They decreased bacterial adhesion and prevented translocation of bacteria, enhancing barrier function in psychologically stressed rats (Zareie et al., 2006) or following major abdominal surgery (Seehofer et al., 2004), or even abdominal sepsis. Furthermore, probiotics increase the expression of occludins in the gut mucosa, which is vital in functional capacity (Qin et al., 2005).

1.7 Microbiota

A stable enteric flora is essential to maintain intestinal health, and for the correct stimulation and development of immunity. It is composed of more than 200 species, some of which cannot be cultured, and so they can only be found and characterized by molecular fingerprinting (Ettinger & Feldman, 2010). The GI tract of dogs harbours a highly complex and resilient collection of microorganisms such as bacteria, archaea, fungi, protozoa, and viruses, and this microbiota responds differently to treatments or other influences such as probiotics administration (Garcia-Mazcorro et al., 2011). There is a very high variability within the canine population between every individual in terms of intestinal microflora (Biagi, Cipollini, Pompei, Zaghini, & Matteuzzi, 2007), which develops in early life, stabilizes in adulthood and becomes more complex in old age, making each individual's microbiota very unique (Mentula et al., 2005). Also, after probiotic administration the inter-individual host response often varies (Garcia-Mazcorro et al., 2011).

Furthermore, there are differences in each animal's GI tract compartments in terms of composition and total numbers of bacteria, with increasing total bacteria counts and species diversity along its length. These differences are the result of the differences in substrate availability, motility, and bactericidal and bacteriostatic secretions along the GI tract. The adverse environment in the proximal GI tract, due to low pH, pancreatic secretions and bile,

makes the stomach and the duodenum sites with low counts of total bacteria when compared to more distal compartments (Ettinger & Feldman, 2010). One of the methods for characterization of the intestinal microbiome is bacterial culture. However, this technique has some limitations and it fails to reflect the diversity present in the intestine. It is estimated that less than 5% of the intestinal bacteria can be cultivated. Currently, there is insufficient knowledge and expertise available to provide growth conditions for cultivation of these extremely fastidious organisms and many are destroyed during collection techniques and by exposure to air (Greetham, Giffard, Hutson, Collins, & Gibson, 2002). Much of the published data about the composition of the microbiota of dogs is based on bacterial cultivation techniques. For these techniques, values range between 10^1 and 10^6 Colony-Forming Units per Gram (CFU/g) in the stomach (Benno et al., 1992; Johnston, 1999) and less than 10^3 CFU/g in the duodenum; although they can reach up to 10^9 CFU/g in some dogs (Johnston, 1999). The total bacterial counts in the jejunum can range from 10^2 to 10^6 CFU/g (Mentula et al., 2005) whilst the ileum can harbour 10^7 CFU/g (Suchodolski, 2011). Higher bacterial counts can be found in the colon, with values ranging from 10^8 to 10^{11} . The colonic microbiota was found to be more stable and similar between the dogs than when compared to the one present in the small intestine (Mentula et al., 2005).

The limitations of culture techniques have led to molecular tools becoming the standard techniques used to study GI microbial ecology. Through the use of molecular tools it has been possible to detect high numbers of previously unrecognized species inside the GI tract (Handl et al., 2011; Suchodolski et al., 2009). Suchodolski et al. (2009), using high-throughput sequencing studies based on 454 pyrosequencing of the 16S rRNA gene, estimated the resident bacteria in the canine jejunum to be around 200 species and 900 bacterial strains. The molecular tools report the same tendency as data collected using bacterial culture in terms of variations along the GI tract and they show that bacterial diversity increases gradually along the intestinal tract (Suchodolski et al., 2008). *Helicobacter spp* were found to be the predominant bacteria in the stomach: 98.6% of the population with the remaining consisting of *Lactobacillus spp*. In terms of phyla, Proteobacteria (including the genus *Helicobacter*), was the most important group at 99.6%, followed by Firmicutes, at 0.3% of the population. As for the duodenum, endoscopic biopsies showed a predominance of the phyla Firmicutes, 46.9%, especially the order Clostridiales, Proteobacteria, 21.2%, and Bacteroidetes, 6.9% (Garcia-Mazcorro et al., 2012). Suchodolski et al., (2009) identified the

major phyla present in the jejunum as Proteobacteria, 46.7%, Firmicutes, 15.0%, Actinobacteria, 11.2%, Spirochaetes, 14.2%, Bacteroidetes, 6.2%, and Fusobacterium, 5.4%. Furthermore, they also found four previously unreported phyla in dogs, Tenericutes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, and Chloroflexi, all together accounting for < 0.1% of all obtained sequences. In the ileum, the most abundant phyla are Fusobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes, with the class Fusobacteriales as the most abundant bacterial group at 32.6% of the population. *Lactobacillus spp* were observed in the ileum but at a very low fraction, 1.4%. Fusobacteria, Bacteroidetes, and Firmicutes were the most prevalent phyla found in the colon. *Proteobacteria*, including *E. coli*-like organisms, were only 1.4% of the organisms in the colon. The order Clostridiales was also abundant, with around 18% of the individuals present in the colon, with the predominance of Clostridium cluster XIVa (Suchodolski et al., 2008).

1.7.1 Enterococcus spp.

Enterococci are Gram-positive cocci that belong to the phylum Firmicutes. These LAB are part of the normal enteric flora, with at least 12 recognized species. They have the ability to grow in the presence of bile, and this resistance to bile is higher than *Lactobacillus* species. Furthermore, Enterococci are more capable of adhering to the intestinal mucus than *Lactobacilli*, with *E. faecium* being the strain with the best adherence ability (Strompfova et al., 2004a) and the best tolerance to low pH (Strompfova et al., 2004b). *E. faecium* has been shown to be metabolically active in the dog gastrointestinal tract (Vahjen & Manner, 2003) and to be able to survive transit through the digestive tract, persisting in the digestive tract for up to 3 months after the final probiotics administration (Marcinakova, Simonova, Strompfova, & Laukova, 2006). However, in other study *E. faecium* could not be detected 1 week after stopping the supplementation in kittens (Veir et al., 2007). The application of *E. faecium* enriches the colonic microflora and induces more or less pronounced effects on the gastrointestinal microflora (Vahjen & Manner, 2003), leading to an increase of LAB concentration, and a decrease in *Pseudomonas*-like bacteria, Staphylococci and *Clostridium spp* (Marcinakova et al., 2006). In addition, evidence shows that its use is safe, leading to no measurable side effects (Benyacoub et al., 2003; Veir et al., 2007), toxicity or infection (Bybee, Scorza, & Lappin, 2011).

Furthermore, *E. faecium* was shown to enhance long-term immune functions in growing dogs, by increasing Canine Distemper Virus (CDV) -specific IgG and IgA. Its immunogenicity could be confirmed by the transient IgA response against *E. faecium* after administration (Benyacoub et al., 2003). However, in another study, differences were not shown in total serum IgG and IgA concentrations between 2 groups of kittens who were administered *E. faecium* (Veir et al., 2007).

1.8 Safety of probiotic administration

There are obviously some concerns about the safety of probiotics and possible translocation of bacteria potentially leading to sepsis. Some isolated cases of bacteraemia have been reported in human medicine, although species like *Lactobacillus acidophilus* have been used safely for many decades, since fermented milk products began to be part of human diet (S. Salminen et al., 1998). In one review of 89 severely ill human patients suffering from lactobacilli bacteraemia, 23 probiotic species of *Lactobacillus* were found. However, those patients had been hospitalized for a long period, and/or were immunosuppressed, or had prior surgeries (M. K. Salminen et al., 2004). Another controlled trial with critically ill human patients, suggested that the supplementation with probiotics did not make the patients more likely to have adverse effects, and furthermore, they increased systemic IgA and IgG concentrations and their intestinal permeability was decreased (Alberda et al., 2007).

There are no reported cases of septicaemia following probiotics supplementation in companion animals (Wynn, 2009) and furthermore no harmful effects have been observed in controlled clinic studies with *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* (Delia et al., 2007; Kelley et al., 2010; Saxelin et al., 1996). However, some authors advise caution when using probiotics with severely immunosuppressed or critically ill animals (Wynn, 2009).

Although LAB members of the genera *Enterococcus* and *Streptococcus* contain some opportunistic pathogens, several studies have shown the safety of *Enterococcus spp.* as a probiotic (Benyacoub et al., 2003; Veir et al., 2007). Moreover, *E. faecium* did not suppress the immune system, and there was no increased risk of developing allergy, autoimmune diseases or inflammation (Benyacoub et al., 2003). *E. faecium* was also considered not to be a cause of concern in terms of virulence factors, being free from most virulence factors (European Food

and Safety Authority [EFSA], 2004). However, there are several reports on vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* species which may raise some concerns about their use as probiotics (Leclercq et al., 1988; Leclercq et al., 1989).

1.9 Radiotherapy in Veterinary Medicine

Radiotherapy is a type of cancer treatment and management widely used in human medicine. Because the facilities and equipment are expensive to install and maintain, the use of radiotherapy in veterinary medicine is not as common as it is in human medicine, and it is restricted to larger referral centres (Morris & Dobson, 2001).

The types of radiation used for radiotherapy are X-rays, Gamma rays and electrons. Radiation is a form of energy which causes excitation and ionization of the cells. It produces chemical damage in their Deoxyribonucleic acid (DNA) potentially leading to cell death. The radiosensitivity and the applied dose of radiation will influence the response of living cells and tissues. The radiosensitivity is higher for tissues with high proportion of dividing cells, like tumours (Morris & Dobson, 2001).

Radiotherapy can either be used with curative purposes, or as a palliative therapy in cases of incurable cancers where the goal is to improve the animal's quality of life for as long as possible. The use of radiation therapy is more effective when used for localized microscopic cancer cells, and this type of disease has the best chances of cure or long-term remission. Furthermore, radiotherapy may be used in combination with surgery, mostly when it is not possible to have tumour-free margins or there are some concerns about the complete excision of the tumour. In those cases, radiotherapy can be administered preoperatively or postoperatively, depending on tumour size, type and location. Other indication for radiotherapy is when the tumour is not possible to be excised due to its anatomical location, e.g. intranasal or intracranial tumours. However, because solid tumours do not respond well to radiotherapy, it is likely that this will not provide long-term tumour control (Pruitt & Thrall, 2011). The types of tumours most commonly treated with radiotherapy are:

- nasal cavity and paranasal sinuses adenocarcinomas, squamous cell carcinoma and chondrosarcoma;

- oral cavity squamous cell carcinoma, fibrosarcoma and other sarcoma, and malignant melanoma;
- mast cell tumours of skin and soft tissues
- head, neck and limbs soft tissue sarcoma
- thyroid carcinoma in dogs
- brain glioma and meningioma (Morris & Dobson, 2001).

However, the radiation is not selective and it also destroys normal cells along with the tumour cells, consequently leading to potential side effects, which can be acute or late. Acute effects occur during or shortly after conclusion of radiotherapy. They are the result of death of actively dividing tissues, like mucosae and skin epithelium. Erythema, desquamation, and severe exfoliative dermatitis of skin and mucosa may develop, which normally resolve once the normal cell population regenerates. Hair loss may also occur; As for the late effects, they are more difficult to predict and they are more serious, often being progressive and irreversible. They tend to occur in slowly proliferation tissues, like bone, brain and connective tissues. Wound healing difficulties can be one of the late effects after skin radiotherapy; cataracts develop sometimes after radiation to the eye; radiation on the brain and spinal cord can cause infarction, necrosis, ultimately leading to paralysis; bone radiation could cause osteonecrosis (Morris & Dobson, 2001). All these tissues will not express radiation injury until many months or years later (Pruitt & Thrall, 2011).

1.10 Diarrhoea in Radiotherapy patients

Early and late complications, such as gastritis or diarrhoea, are observed in the gastrointestinal tract secondary to radiation therapy (Hall & Giaccia, 2012). Diarrhoea is a common side effect present in almost all regimens of radiotherapy, especially in abdominal or pelvic radiotherapy, where it can range from 50% to 90% of patients, according to studies in human patients (Khalid et al., 2006). Abdominal and pelvic radiation have important prejudicial effects on the intestinal microflora and mucosa, with atrophy of the villi occurring within 2 to 4 days postirradiation, leading to epithelial denudation and consequent acute gut reactions (Hall & Giaccia, 2012). The radiation causes a breakdown of the gastrointestinal mucosal barrier, promoting loss of the epithelial integrity and increasing permeability

(McGough et al., 2008). A preparation of probiotics containing 4 strains of lactobacilli, 3 strains of bifidobacteria, and *Streptococcus salivarius termophilus* was demonstrated to reduce the number of patients suffering from radiation-induced enteritis and colitis. Additionally, it was shown to clearly decrease the severity of diarrhoea when compared to placebo-treated animals with fewer animals receiving metronidazole as an anti-infective drug during the study (Delia et al., 2007).

Not only physical causes, such as radiation, can have an impact on the integrity of the intestinal barrier. More and more, stress is being recognized as a cause and influence in intestinal diseases (Soderholm & Perdue, 2001), and it is accepted that the integrity of the intestinal barrier can be affected by several types of stress. As such, many stressful conditions as physical stress, kennel stress, transportation stress, separation anxiety and changes in diet, are associated with changes in water absorption, osmotic balance, and intestinal permeability, leading to acute diarrhoea in dogs (Soderholm & Perdue, 2001). The mechanisms by which stress influences the GI permeability are not clearly understood yet, but it has been shown that the administration of Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) can mimic the reduced colonic barrier function found in stressed rats, and so it is thought that glucocorticoids could be responsible for the increased permeability (Santos et al., 1999). Furthermore, stress can alter the composition of gut microbiota, decreasing the number of beneficial bacteria and allowing the pathogens to grow, and to adhere and colonize the intestinal mucosa, which will lead to GI disease signs such as diarrhoea, vomit, or anorexia (Lutgendorff et al., 2008). Stress also induces significant decreases in IgA production, which is one of the first lines of defences, responsible for agglutinating bacteria and preventing them from binding to intestinal epithelial cells (Caso et al., 2009). Studies show the importance of probiotics in counteracting stress-induced changes in the gut microbiota and in intestinal barrier function (Meddings & Swain, 2000).

1.11 Vomiting and anorexia in Radiotherapy patients

Although vomiting is usually associated with gastrointestinal diseases, it can occur with many other conditions. Vomiting is a complex reflex which is integrated and coordinated in the brainstem, more precisely in the medulla oblongata. There, lie a group of nuclei referred to as the emetic centre. Specific emetic receptors located in several sites along the

body send neural and humoral signs directly to the emetic centre, where the act of vomiting is then initiated. Among the most important receptors are the mechanoreceptors in the pharynx, and the tension and chemoreceptors in the gastric and duodenal mucosae. So, when those receptors are stimulated they send impulses to the emetic centre. However, the irritation of gastrointestinal structures is not the only stimulus that can cause vomiting, because the emetic centre receives afferent impulses from a variety of organs. One important structure that sends afferent impulses to the emetic centre is the chemoreceptor trigger zone. It is located in the brainstem, next to the third ventricle. The chemoreceptor trigger zone is sensitive to some drugs, toxins and some inflammation by-products. This is the reason why conditions external to the GI tract, such as inflammatory diseases or cancers, can cause vomiting to occur (Ettinger & Feldman, 2010). Other causes can be systemic and metabolic diseases (e.g. liver disease, pancreatitis, renal disease, septicaemia, hyper and hypocalcaemia, hyper and hypokalaemia), central nervous system diseases, vestibular diseases, and many drugs and toxins (Cunningham, 2003).

It is common for radiotherapy patients to suffer gastrointestinal symptoms such as nausea and vomiting when they are exposed to doses of radiation greater than 1 gray (Gy), especially in abdominal and pelvic radiation (Yamamoto, Takeda, & Yamatodani, 2002). Cancers cause pain because they can infiltrate and reach pain-sensitive structures, or they can injure nerves, bones and soft tissues and activate pain receptors; they also can provoke vascular occlusion, leading to pain (Ogilvie & Moore, 1995). Furthermore, the radiation itself will cause acute side effects and consequently lead to local pain and possible infection (Morris & Dobson, 2001). Pain and infection are among the most common causes of anorexia and vomiting in small animals (Gough, 2007).

1.12 Objectives

This randomized, double blind, placebo controlled trial aimed to:

1 - Validate the previously attested benefits of synbiotics associated to dogs submitted to radiotherapy for 2 to 3 week.

2 - Confirm that the GI side effects of radiotherapy described in the literature were reproduced in the sample used.

3 - Evaluate significant differences in attitude, appetite, vomiting and episodes of diarrhea between the group that was supplemented with a symbiotic containing *Enterococcus faecium* E1707 (NCIMB 10415) and the control group that received a placebo.

2 Materials and methods

2.1 Study type

A single-centre, double blind, randomized, placebo-controlled clinical trial was devised to evaluate the effect of a synbiotic on dogs receiving radiation therapy to treat their cancers. General admission criteria were dogs admitted to VRCC and undergoing radiotherapy protocols for 2 to 3 weeks duration.

The product used was Pro-Kolin Enterogenic (Protexin Veterinary, Lopen Head, Somerset, UK), a synbiotic containing the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415) E1707. It also contained prebiotics:

- Alpha-glucan butyrogenic, which is fermented by the resident microflora to produce butyrate, the preferred energy source for colonocytes.
- MPS Protect, a mucopolysaccharide that reinforces the intestinal mucin.
- Preplex, a prebiotic containing fructo-oligosaccharide and gum arabic.
- Mannan-oligosaccharide.
- Beta-glucans.

All owners received a detailed written description of the protocol and written consent was obtained before their dogs were included in the study. The protocol was approved by an institutional ethics and animal welfare committee: CEBEA (The University Lusófona de Humanidades e Tecnologias Animal Welfare and Ethics Committee).

2.2 Study site

VRCC, 1 Bramston Way, West Mayne, Southfields Industrial Estate, Essex, SS15 6TP, United Kingdom.

2.3 Admission criteria

The subject groups were dogs diagnosed with cancer and admitted for radiotherapy treatment at the VRCC for a duration period of 2 to 3 weeks. Additionally no pairing or selection was considered regarding dog's age, size, breed, gender, regular home diet and

cancer type and treatment. Dogs receiving radiotherapy to their pelvic region, and so more at risk of radiotherapy induced gastrointestinal injury were included.

2.4 Randomization

A simple randomization into 2 potential treatment groups: the synbiotics or the placebo group. The dogs were allocated to either group A or group B, and the contents of the respective sachets were added to their food, once daily.

2.5 Blinding

All study personnel and the owners were unaware of whether the dog was receiving the product or the placebo. The content of the sachets was added to the food once daily as recommended by the manufacturer i.e. $\frac{1}{2}$ sachet for dogs under 5 kg, 1 sachet for dogs between 5 and 15 kg, 2 sachets for dogs between 15 and 35 kg and 3 sachets for dogs over 35 kg. The packaging of both types of sachets was identical, differing only in the A or B labelling. The powder present in both types of sachets had identical appearance. The placebo was maltodextrin. Only after the data analysis was disclosed that A was the synbiotic group and B was the placebo group.

2.6 Experimental design

On admission to the radiotherapy unit dogs were randomly assigned to one of two groups: one to receive the product and the other to receive the placebo. The study was unblinded once the results of the clinical trial had been analysed.

A faecal sample was collected on each animal's first boarding day, before the content of the sachets was given to them, and then 2 other faecal samples were collected on the 10th day of treatment and again on the last day of the boarding period. An additional sample was collected if they developed diarrhoea. Dogs were fed a commercial dog food (Chappie) unless requested by their owners to follow an alternative home diet or, if they had a history of a sensitive gastrointestinal tract, in which case Royal Canin® Sensitivity Control (Sensitivity Control Diet™, Royal Canin SA, Aimargues, France) was given; this diet was also used for dogs that were not very keen on eating Chappie. In all cases the diet was

recorded. The content of the sachets was added to the food once daily. They were then monitored daily for stool consistency or the development of diarrhoea and other gastrointestinal signs such as weight loss, reduced appetite, and vomiting. The dogs which developed diarrhoea during the study were not medicated unless it was felt necessary based on clinical grounds. Metronidazole was the antibiotic of choice if antibiotic therapy was administered. If needed, antibiotics, analgesia, steroids, and Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) were used to relieve pain and complications related to the radiotherapy site. All interventions were recorded.

2.7 Variables in study

A modified Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI) scoring system (Jergens et al., 1992) was used to give all dogs a clinical score on some of the recorded parameters.

Table 1 – Modified CIBDAI scoring system used in this study

<u>Modified canine inflammatory bowel disease activity index</u>					
Attitude/Activity	0 Normal	-1 Depressed	1 Excited		
Appetite	0 Normal	1 Decreased	2 Absent		
Vomiting	0 No	1 Yes			
Stool Consistency	0 Normal	1 Slightly soft stools	2 Very soft stools	3 Watery diarrhoea	1 Blood in faeces

*Stool scores categories: 0 – ideal, firm stool; 1 – slightly soft, amorphous stool, maintaining most of its shape/evidence of fresh blood on the stool; 2 – viscous liquid with most of its shape lost; 3 – watery, liquid stool with little or no particulate matter.

Attitude

The attitude scoring was made by observing how the dogs behaved in the kennels. A quiet, calm, responsive, alert and ready to interact dog would be considered as having a normal behaviour, and thus it was scored as «Normal»; a «depressed» dog would be a dog not

paying much attention to things and people around him, sleeping or lying down most of the time, not showing much interest in food, not very responsive to stimuli; finally, dogs which were standing most of the time, vocalizing, scratching the kennel doors, trying to escape from the kennel, even being aggressive sometimes were considered to be «excited».

Appetite

Appetite scoring was made by observing how the dogs reacted to food. A dog that was interested in and finished all his food was considered to have a «normal» appetite; «decreased» would be the score for a dog who had not eaten all his food, as he usually would do. Sometimes those dogs would eat a bit more if they were offered chicken, for example; «absent» would be the score given to a dog not interested in food, even after switching his food for something more palatable, as chicken or other canned diet.

Vomiting

Vomiting was simply scored as «present» or «absent», depending on if the dogs vomited or not.

Stools

The consistency of stools was evaluated every day by the same team of people, using a stool scoring system that had the characters “Normal”, “Slightly soft”, “Very soft”, “Watery” and “Bloody” as suggested and characterized by Kelley et al., (2009). Furthermore, stool frequency was recorder so that increased frequency was detected.

The dogs’ appetite, attitude, weight, and the occurrence of vomiting were recorded on the diarrhoea assessment score sheet every day. Moreover, daily temperature, pulse, respiration (TPR’s) measurements were performed to evaluate the general health, and anaesthetic parameters were recorded. The dogs on this study were boarded from Monday to Friday but most of them went home for the weekends. Therefore the owners were asked to give the sachets during the weekends, and to fill in the score sheets.

To calculate the occurrence of increased frequency of defecation throughout this study, we established the average number of defecations by day for each dog. When the number of daily defecations exceeded that average, a score of 1 was given. Due to some dogs having experienced constipation, the average number of daily defecations in those cases was

less than 1 per day. This meant that for these dogs, every day with stools passed would be considered a 1. In order to obtain accurate results, we adjusted the method and erased every null value when calculating the mean value. Also, all averages $\geq .5$ were rounded accordingly.

The parameter “Days of diarrhoea” was determined by adding the number of times that each dog passed stools of altered consistency to the number of days that the same dog presented increased frequency of defecation.

2.8 Data Processing

The obtained data was inserted into a spreadsheet using the *Microsoft Office Excel 2010*® software. Each animal was identified along with its age, breed, gender, group of study, type of cancer being treated, site of the tumour, diet in the hospital, and the result of the faecal floatation test performed at the beginning of the boarding period. Then, using the daily score sheet data, all the information relative to individual daily attitude, appetite, occurrence of vomiting, stools consistency, stool frequency, diet alterations, daily weight, and days of treatment was added to the spreadsheet. Each row represented a patient, and each column represented one of the previously mentioned variables.

2.9 Stool analysis

To rule out enteric parasitism, a faecal floatation test was performed on the stool samples collected on admission, using zinc sulphate solution. The sample was then examined microscopically at 100 X for the presence of parasite eggs, oocysts, or cysts.

As previously mentioned, at least 3 faecal samples were collected from each dog and a possible fourth one if the dog developed diarrhoea. In severe cases of diarrhoea, faecal analysis and culture were performed in addition. Part of the faecal samples was submitted for bacterial culture and the rest were stored at -20° C for future analysis of the microbiome. At a later date, the stored faecal samples will be analysed for SCFA levels prior to, during and at the end of treatment with the symbiotic or placebo. The microbiome of the faeces before, during and after treatment with the symbiotic or placebo will be assessed by 454 pyrosequencing and qPCR analysis.

2.10 Statistical evaluation

To analyse data, the *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* IBM version 20 software was used. Descriptive analysis was applied to explore the dataset. Percentages, cumulative percentages and frequencies were computed to better describe variables values distribution among the two intervention groups.

Inferential statistics, although limited by the statistical sample power were also performed.

The evaluation of the relation between two categorical variables is performed by Pearson Chi-square test. In our study most of the categories fail to have expected counts above 5 in at least 80% of the cells in contingency tables, a pre-requisite to a valid application of this methodology. For diarrhoea and vomiting (present or absent) and their relation to intervention group (A or B), since each produce a 2 by 2 contingency table, it was possible to apply the Fisher's exact test.

For score analysis the Mann-Whitney test was adequate to evaluate differences in scores between the interventions groups A and B. The t-test for independent samples was depreciated after failing Shapiro-Wilk normality tests based on the relatively small sample size.

Sample size to compare intervention groups was defined according to Snedecor and Cochran formula (p. 102-105, 1989):

$$n = \left(\frac{(Z(a) + Z(b)) \cdot SD}{m1 - m2} \right)^2$$

Where:

Z(a) is the t Student's value at the specified 95% confidence level

Z(B) is the t Student's value at the specified 80% power

SD is the expected standard deviation (SDe= 4)

m1 - m2 is the expected difference between the intervention groups A and B (m1 - m2 = 2 point difference in diarrhoea score).

The above formula is conceived to define the necessary sample size for comparing means (mean scores). Formula parameters were based in preliminary descriptive analysis of intervention groups. The n, sample size, computed (two-tailed) is 35 paired samples or 65 independent samples.

The on-going evaluation of intervention groups has 21 dogs in total. The inferential statistics are therefore compromised since they will lack statistical power necessary to calculate the minimum effect size that is likely to be detected in a study using a given sample size. All results should therefore be considered to be preliminary.

3 Results

3.1 Sample

Twenty two dogs were originally included in the trial. One dog failed to meet inclusion criteria after being obviously sick and having multiple antibiotics during the boarding period. He also failed to have the contents of the sachets for 4 days in a row. Therefore, only 21 dogs were included in the final analysis, 10 in group A, and 11 in group B.

The animals were treated over similar periods of time, with an average of 20 days for group A and 19 days for group B.

3.1.1 Gender

In group A 40% of dogs ($n = 4$) were neutered females and 60% were neutered males. Group B showed a different distribution: 27.3% ($n = 3$) were neutered females, 36.4% ($n = 4$) neutered males, 27.3% ($n = 3$) entire males, and one entire female.

3.1.2 Age

The age ranged from 2 to 11 years old. The mean age in the total sample was 7.62 and the median was 8. As for groups, group A's mean was 6.7 and group B had a mean of 8.45.

3.1.3 Breed

The most predominant breed in the trial was the Labrador retriever with a total of 8 animals (38%). The second most represented breed was the Boxer with a total of 3 (14%), followed by 2 Golden retrievers and 2 Staffordshire bull terriers. The rest of the sample was composed of 1 Siberian Husky, 1 crossed-Jack Russel terrier, 1 Giant Schnauzer, 1 Italian Spinone, 1 Maremma sheepdog, and 1 Flat-coated retriever.

3.1.4 Type of tumour

The most common type of tumour was a soft tissue sarcoma with 8 cases (38%). 3 meningiomas and 3 mast cell tumours were the second most represented type of tumour (14% each). 2 squamous cell carcinomas, 1 low grade sarcoma, 1 chondrosarcoma, 1 hemangiosarcoma, 1 glioma, and 1 spindle cell sarcoma completed the sample.

3.2 Descriptive statistics

In terms of attitude scores, in intervention group A, 30% ($n = 3$) had a negative attitude score, while 30% ($n = 3$) presented a null score, and 40% ($n = 4$) presented a positive score. The propensity for positive scores (a negative feature because of excitement) is slightly lower in group B with circa 37% of positive scores. Whilst there are similarities in positive scores, the null score, an important characteristic for normal dog behaviour, is 15.5% higher in group B. However, the dogs with the lowest (-6) and highest (11) scores are both in group B. The sum of attitude scores was 18 for group A and 8 for group B.

Table 2 – Attitude scores for both groups

		Group		Total
		A	B	
Attitude score	-6	Count	0	1
		% within Group	0,0%	4,8%
	-4	Count	0	1
		% within Group	0,0%	4,8%
	-2	Count	2	2
		% within Group	20,0%	9,5%
	-1	Count	1	1
		% within Group	10,0%	4,8%
	0	Count	3	8
		% within Group	30,0%	38,1%
	1	Count	1	3
		% within Group	10,0%	14,3%
	5	Count	0	1
		% within Group	0,0%	4,8%
	6	Count	1	1
		% within Group	10,0%	4,8%
	7	Count	1	1
		% within Group	10,0%	4,8%
	9	Count	1	1
		% within Group	10,0%	4,8%
	11	Count	0	1
		% within Group	0,0%	4,8%
Total		Count	10	21
		% within Group	100,0%	100,0%

Regarding appetite scores, 40.0% ($n = 4$) of dogs in group A had a null score, against 45.5% ($n = 5$) in group B. In both groups A and B, the number of dogs with scores different from null was 6. The highest scores (a negative feature) were made by two individuals in group B, with scores of 7 and 8. The sum of appetite scores was 17 for group A and 23 for group B.

Table 3 – Appetite scores for both groups

			Group		Total
			A	B	
Appetite score	0	Count	4	5	9
		% within Appetite score	44,4%	55,6%	100,0%
		% within Group	40,0%	45,5%	42,9%
	1	Count	3	2	5
		% within Appetite score	60,0%	40,0%	100,0%
		% within Group	30,0%	18,2%	23,8%
	3	Count	0	2	2
		% within Appetite score	0,0%	100,0%	100,0%
		% within Group	0,0%	18,2%	9,5%
	4	Count	2	0	2
		% within Appetite score	100,0%	0,0%	100,0%
		% within Group	20,0%	0,0%	9,5%
	6	Count	1	0	1
		% within Appetite score	100,0%	0,0%	100,0%
		% within Group	10,0%	0,0%	4,8%
	7	Count	0	1	1
		% within Appetite score	0,0%	100,0%	100,0%
		% within Group	0,0%	9,1%	4,8%
	8	Count	0	1	1
		% within Appetite score	0,0%	100,0%	100,0%
		% within Group	0,0%	9,1%	4,8%
Total		Count	10	11	21
		% within Appetite score	47,6%	52,4%	100,0%
		% within Group	100,0%	100,0%	100,0%

Vomiting occurred only in 3 animals throughout the study, 2 being from group A and 1 from group B. One of the animals in group A had 3 episodes of vomiting. The remaining only had 1 episode.

Table 4 – Vomiting scores for both groups

		Group			
		A	B	Total	
Vomiting score	0	Count	8	10	18
		% within Vomiting score	44,4%	55,6%	100,0%
		% within Group	80,0%	90,9%	85,7%
	1	Count	1	1	2
		% within Vomiting score	50,0%	50,0%	100,0%
		% within Group	10,0%	9,1%	9,5%
	3	Count	1	0	1
		% within Vomiting score	100,0%	0,0%	100,0%
		% within Group	10,0%	0,0%	4,8%
Total		Count	10	11	21
		% within Vomiting score	47,6%	52,4%	100,0%
		% within Group	100,0%	100,0%	100,0%

Two dogs in group A and another two in group B did not develop diarrhoea throughout the study. The dog with the highest diarrhoea score was in group B, with a score of 17. There were no tendencies or obvious differences about the scores in both groups.

Table 5 – Diarrhoea scores for both groups

		Group		Total
		A	B	
Diarrhoea score	0	Count	2	2
		% within Group	20,0%	18,2%
	1	Count	1	2
		% within Group	10,0%	18,2%
	2	Count	2	2
		% within Group	20,0%	18,2%
	4	Count	0	1
		% within Group	0,0%	9,1%
	5	Count	1	0
		% within Group	10,0%	0,0%
	6	Count	1	1
		% within Group	10,0%	9,1%
	7	Count	1	0
		% within Group	10,0%	0,0%
	10	Count	0	1
		% within Group	0,0%	9,1%
	12	Count	0	1
		% within Group	0,0%	9,1%
	13	Count	1	0
		% within Group	10,0%	0,0%
	16	Count	1	0
		% within Group	10,0%	0,0%
	17	Count	0	1
		% within Group	0,0%	9,1%
Total		Count	10	11
		% within Group	100,0%	100,0%

In terms of increased frequency of defecation, 1 dog in group A and 4 dogs in group B (36.4%) had a null score. It was considered that all other dogs had at some point increased frequency during the trial. The dog with the most increased frequency score was in group A, with a score of 7. The sum of scores for frequency of defecation was 29 for group A and 25 for group B.

In both groups A and B, the number of dogs with no days of diarrhoea was the same: 2 in each group. One dog in group A (10%) had only 1 day of diarrhoea during the boarding period, whilst in group B the number of dogs with only 1 day of diarrhoea was 4, corresponding to 36.4%. The rest of the count for days of diarrhoea did not show a trend, with dogs from both groups randomly having the counts up to 11 days of diarrhoea.

Table 6 – Total days of diarrhoea for both groups

		Group		Total
		A	B	
Total days of diarrhoea	0	Count	2	2
		% within Group	20,0%	18,2%
1		Count	1	4
		% within Group	10,0%	36,4%
2		Count	2	0
		% within Group	20,0%	0,0%
3		Count	0	1
		% within Group	0,0%	9,1%
4		Count	2	1
		% within Group	20,0%	9,1%
6		Count	0	1
		% within Group	0,0%	9,1%
7		Count	1	0
		% within Group	10,0%	0,0%
8		Count	1	1
		% within Group	10,0%	9,1%
10		Count	0	1
		% within Group	0,0%	9,1%
11		Count	1	0
		% within Group	10,0%	0,0%
Total		Count	10	11
		% within Group	100,0%	100,0%

3.3 Inferential statistics

Table 7 – Presence or absence of diarrhoea for both groups

		Group		Total
		A	B	
Diarrhoea	N	Count	0	2
		% within Diarrhoea	0,0%	100,0%
		% within Group	0,0%	18,2%
	Y	Count	10	19
		% within Diarrhoea	52,6%	100,0%
		% within Group	100,0%	81,8%
Total	Count		10	11
	% within Diarrhoea		47,6%	52,4%
	% within Group		100,0%	100,0%

Fishers Exact Test suggest there is no relationship between diarrhoea (presence and absence) and intervention groups ($p = 0,476$).

Table 8 – Presence or absence of vomiting for both groups

		Group		Total
		A	B	
Vomiting	N	Count	8	10
		% within Vomiting	44,4%	55,6%
		% within Group	80,0%	90,9%
	Y	Count	2	3
		% within Vomiting	66,7%	33,3%
		% within Group	20,0%	9,1%
Total	Count		10	11
	% within Vomiting		47,6%	52,4%
	% within Group		100,0%	100,0%

Fishers Exact Test suggest there is no relationship between vomit (presence and absence) and intervention groups ($p = 0,586$).

The Mann-Whitney U test was used to evaluate statistical differences between the two intervention groups. Scores for parameters such as attitude ($p=0.863$), appetite ($p=1.000$) and weight variation ($p=0.426$) showed no significant statistical differences. Vomiting ($p=0.654$), diarrhoea ($p=0.863$), days of diarrhoea ($p=0.605$) and defecation ($p=0.557$) scores were also compared, once again suggesting the absence of statistical differences between group A and B.

Table 9 – Comparison in all parameters between both groups

Parameter	A	B
<u>Attitude:</u>		
Positive	4	5
Negative	3	2
Null	3	4
Total score	18	8
<u>Appetite:</u>		
Null	4	5
Total score	17	23
<u>Vomiting events:</u>		
	4	1
<u>Diarrhoea:</u>		
Dogs with diarrhoea	8	9
No diarrhoea	2	2
1 day of diarrhoea	1	4
<u>Frequency score:</u>		
Null	1	4
Total score	29	25

4 Discussion

As it was said before, the sample was too small ($n=21$) to be able to perform inferential statistics. The results from descriptive statistics were not conclusive, but they seem to favour group B, the placebo group.

The attitude scores showed the null score to be 15.5% higher in group B than in group A, and also the sum of attitude scores was lower in group B – 8 against 18 in group A. Perhaps this is the most difficult parameter to interpret and to be measured in this study, because of its subjectivity and for depending on external factors. Some dogs were naturally excitable or nervous; some other dogs were calmer or even more depressed. Maybe it is more reasonable to think that their attitude could influence the development of stress related diarrhoea (Soderholm & Perdue, 2001) rather than thinking that their attitude was a result of not being well and consequently the assumption that probiotics or the placebo were not being effective. As said before, daily TPR's were performed to every dog, and abnormalities as fever or increased heart rates that could suggest the dogs were ill were not found. First of all, this can attest the safety of this product. Secondly, this suggests that the dogs' attitudes were not a result of feeling sick, but it was rather something related to a particular dog's character.

The appetite scores were also slightly better for group B in terms of null scores, 45.5% against 40% in group A. However, in this parameter the sum of appetite scores was higher for group B – 23 against 17 in group A.

Vomiting occurred in 2 animals in group A and in 1 animal in group B, and one of those dogs in group A had 3 episodes of vomiting. Two out of those 3 episodes of vomiting occurred when the dog went home for the weekend. Because vomiting was very rare during this trial it is possible to think that vomiting might have come from something that was fed by the owners or even from the stress of traveling rather than being a complication or a side effect from radiation therapy. The other dog in group A vomited on the first day of treatment, so it is also unlikely that it was related to the treatment.

The same number of dogs in both groups did not develop diarrhoea at all during the study, 2 animals for each group. One dog in group A developed diarrhoea for only 1 day,

whilst the number of dogs in group B with only 1 day of diarrhoea was better – 4 animals, corresponding to 36.4%. In terms of frequency of defecation, only 1 dog in group A had a null score (10%), and there were 4 dogs in group B (36.4%) having that same desirable score. The sum of scores for frequency of defecation was higher for animals in group A – 29 against 25 in group B. The dog with the highest frequency score was in group A, with 7 days of increased frequency. These results contradict some literature, which support the efficacy of probiotics in the prevention and resolution of diarrhoea in dogs (Barlow, 2009; Kelley et al., 2009). However, some other results found during this study confirm that same literature, because they do not seem to support the idea that the product B was enhancing dogs' health and decreasing gastrointestinal signs when compared to animals in group A. For example, the dogs with the lowest and highest attitude scores were both in group B. Also, the highest appetite scores were made by 2 dogs in group B. And furthermore, the dog with the highest diarrhoea score was in group B.

Khalid et al., (2008) refer that in humans 50% to 90% of patients having abdominal or pelvic radiotherapy develop diarrhoea. There was only 1 dog (group A) having pelvic radiotherapy in this trial. So, according to literature, we can assume this dog was more at risk of developing diarrhoea. The results confirmed the literature, and that dog had high diarrhoea scores and was the patient with more days of diarrhoea during the trial. This can skew the final comparative results and look worst for the group A. It would be interesting to compare only animals having abdominal or pelvic radiotherapy, but the case load did not allow it.

Approximately 80% of all animals in this study had at least one day of diarrhoea; 57% of them had at least one episode of decreased appetite; 61% had attitude scores different from normal at some point during the trial. Thus, it is fair to conclude that GI side effects were common during this trial.

Soderholm & Perdue (2001) refer the importance of stress as an influence to develop intestinal diseases. During this trial, several dogs developed diarrhoea when they went home for the weekend or on the immediate day after going back to being boarded. This can be due to transportation stress, excitement of seeing the owners again, anxiety for leaving home again, and changes in diet or even treats given by the owners. Furthermore, the owners were asked to add the content of the sachets to the food during the weekend, to monitor stools and

to fill in the score sheets as complete and accurate as possible. It is impossible to know if the owners gave them the sachets every day, or even if they did not give them treats that could cause diarrhoea. Obviously, the scoring and monitoring of stools made by the owners is unlikely to be as accurate as the observations made by us investigators, and some owners did not fill in the scoring sheets at all. Because of this, some data remained unknown. All these factors can give us bias information and again skew the results. Ideally, the trial should go on with dogs being boarded for the entire course of it, so that it would be easier to control every external factor and avoid outliers and data loss.

It could be interesting to compare survival time or the period of remission for animals between both groups, to see if there was any immune modulation from the synbiotic, which could have effects on the tumour shrinkage. Also, it could be compared the tumour response to radiation using CT scan after the radiotherapy protocol was finished.

The study present preliminary results and it is part of a larger study. It is expected at the end of the following study to obtain conclusive results that will allow inferential statistics. This study only had 21 dogs, and because of this the results are easily distorted.

5 Conclusion

This study could not prove the effectiveness of the synbiotic in preventing or controlling diarrhoea and other GI signs in boarded canine radiotherapy patients. However, we could not exclude the benefits from supplementation of this product, because of all the supportive literature. GI signs were common in this study, and for the only pelvic radiotherapy patient, the results were amongst the most severe in the trial. Furthermore, no obvious differences on the different parameters were found between animals supplemented with the synbiotic and the ones supplemented with the placebo.

Whilst these findings were not validated with inferential statistics, they might be elucidated by further animal inclusion in intervention cohorts (to match adequate sample size).

References

- Adams, C. A. (2010). *The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers*. Nutr Res Rev, 23(1), 37-46. doi: 10.1017/s0954422410000090
- Alberda, C., Gramlich, L., Meddings, J., Field, C., McCargar, L., Kutsogiannis, D., Madsen, K. (2007). *Effects of probiotic therapy in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Am J Clin Nutr, 85(3), 816-823.
- Artis, D. (2008). *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 8(6), 411-420. doi: 10.1038/nri2316
- Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., & Takeda, Y. (2004). *Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7*. Infect Immun, 72(4), 2240-2247.
- Baharav, E., Mor, F., Halpern, M., & Weinberger, A. (2004). *Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats*. J Nutr, 134(8), 1964-1969.
- Bai, X., Liu, X., & Su, Y. (2000). *Inhibitory effects of intestinal mucus on bacterial adherence to cultured intestinal epithelial cells after surface burns*. Chin Med J (Engl), 113(5), 449-450.
- Barlow J. 2009. The effect of Protexin Synbiotic on the incidence of diarrhoea in dogs in a rehoming centre. In: *The role of Probiotics in veterinary practice*. Ed McNae JC. Probiotics International Ltd, United Kingdom.
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., & Mitsuoka, T. (1992). *Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs*. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science, 54(4), 703-706.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G. L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J., & von der Weid, T. (2003). *Supplementation of food with Enterococcus faecium (SF68) stimulates immune functions in young dogs*. J Nutr, 133(4), 1158-1162.
- Biagi, G., Cipollini, I., Pompei, A., Zaghini, G., & Matteuzzi, D. (2007). *Effect of a Lactobacillus animalis strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs*. Vet Microbiol, 124(1-2), 160-165. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.013
- Black, F. T., Andersen, P. L., Ørskov, J., Ørskov, F., Gaarslev, K., & Laulund, S. (1989). *Prophylactic Efficacy of Lactobacilli on Traveler's Diarrhea*. In R. Steffen, H. Lobel, J. Haworth & D. Bradley (Eds.), Travel Medicine (pp. 333-335): Springer Berlin Heidelberg.
- Bordin, M., D'Atri, F., Guillemot, L., & Citi, S. (2004). *Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins*. Mol Cancer Res, 2(12), 692-701.

- Bybee, S. N., Scorza, A. V., & Lappin, M. R. (2011). *Effect of the probiotic Enterococcus faecium SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter*. J Vet Intern Med, 25(4), 856-860. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007). *The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292(1), G315-322. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2006
- Caso, J. R., Hurtado, O., Pereira, M. P., Garcia-Bueno, B., Menchen, L., Alou, L., Leza, J. C. (2009). *Colonic bacterial translocation as a possible factor in stress-worsening experimental stroke outcome*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 296(4), R979-985. doi: 10.1152/ajpregu.90825.2008
- Castillo, N. A., Perdigon, G., & de Moreno de Leblanc, A. (2011). *Oral administration of a probiotic Lactobacillus modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice*. BMC Microbiol, 11, 177. doi: 10.1186/1471-2180-11-177
- Cerf-Bensussan, N., & Gaboriau-Routhiau, V. (2010). *The immune system and the gut microbiota: friends or foes?* Nat Rev Immunol, 10(10), 735-744. doi: 10.1038/nri2850
- Chen, J., Liang, R. H., Liu, W., Li, T., Liu, C. M., Wu, S. S., & Wang, Z. J. (2013). *Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their in vitro fermentation properties*. Carbohydr Polym, 91(1), 175-182. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.08.021
- Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (2002). *Gastrointestinal effects of prebiotics*. Br J Nutr, 87 Suppl 2, S145-151. doi: 10.1079/BJNBJN/2002530
- de Vrese, M., & Marteau, P. R. (2007). *Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea*. J Nutr, 137(3 Suppl 2), 803S-811S.
- Delia, P., Sansotta, G., Donato, V., Frosina, P., Salatino, A., Messina, G., Famularo, G. (2007). *Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea*. Tumori, 93(2), suppl 1-6.
- European Food and Safety Authority. (2004) Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety of product Oralin for dogs. The EFSA Journal, 51, 1-6.
- Elmadfa, I., Klein, P., & Meyer, A. L. (2010). *Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro*. Proc Nutr Soc, 69(3), 416-420. doi: 10.1017/s0029665110001710
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010a). *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. (7th edition) Elsevier Saunders.

- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010b). *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. (7th edition) California: Elsevier Saunders.
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Madsen, K. L. (2008). *Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 295(5), G1025-1034. doi: 10.1152/ajpgi.90227.2008
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Retrieved April 23, 2009, from <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- Fuller, R. (1989). *Probiotics in man and animals*. J Appl Bacteriol, 66(5), 365-378.
- Garcia-Mazcorro, J. F., Lanerie, D. J., Dowd, S. E., Paddock, C. G., Grutzner, N., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2011). *Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing*. FEMS Microbiol Ecol, 78(3), 542-554. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01185.x
- Garcia-Mazcorro, J. F., Suchodolski, J. S., Jones, K. R., Clark-Price, S. C., Dowd, S. E., Minamoto, Y., Dossin, O. (2012). *Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs*. FEMS Microbiol Ecol, 80(3), 624-636. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01331.x
- Gough, A., (2007) *Differential Diagnosis in Small Animal Medicine*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Gourbeyre, P., Denery, S., & Bodinier, M. (2011). *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions*. J Leukoc Biol, 89(5), 685-695. doi: 10.1189/jlb.1109753
- Greetham, H. L., Giffard, C., Hutson, R. A., Collins, M. D., & Gibson, G. R. (2002). *Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach*. J Appl Microbiol, 93(4), 640-646.
- Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2012). *Radiobiology for the Radiologist*: Wolters Kluwer Health.
- Haller, D., Blum, S., Bode, C., Hammes, W. P., & Schiffrin, E. J. (2000). *Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets*. Infect Immun, 68(2), 752-759.
- Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2011). *Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats*. FEMS Microbiol Ecol, 76(2), 301-310. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x

- Heng, N. C., Haji-Ishak, N. S., Kalyan, A., Wong, A. Y., Lovric, M., Bridson, J. M., . . . Tagg, J. R. (2011). *Genome sequence of the bacteriocin-producing oral probiotic Streptococcus salivarius strain M18*. J Bacteriol, 193(22), 6402-6403. doi: 10.1128/jb.06001-11
- Herd, T. (2004). Movimentos de tracto gastrointestinal. In: J.G. Cunningham, *Fisiologia Veterinária* (3ª ed., pp. 239-253). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. (Original published in 2002)
- Herd, T. (2004). Digestão e absorção: os processos não fermentativos. In: J.G. Cunningham, *Fisiologia Veterinária* (3ª ed., pp. 263-289). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. (Original published in 2002)
- Herstad, H. K., Nesheim, B. B., L'Abée-Lund, T., Larsen, S., & Skancke, E. (2010). *Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis--a controlled clinical trial*. J Small Anim Pract, 51(1), 34-38. doi: 10.1111/j.1748-5827.2009.00853.x
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & Huis in't Veld, J. H. (1998). *Overview of gut flora and probiotics*. Int J Food Microbiol, 41(2), 85-101.
- Holzappel, W. H., & Schillinger, U. (2002). *Introduction to pre- and probiotics*. Food Research International, 35(2-3), 109-116. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00171-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00171-5)
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanauke, P., & Koivula, T. (1991). *A human Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children*. Pediatrics, 88(1), 90-97.
- Jergens, A. E., Moore, F. M., Haynes, J. S., & Miles, K. G. (1992). *Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990)*. J Am Vet Med Assoc, 201(10), 1603-1608.
- Johnston, K. L. (1999). *Small intestinal bacterial overgrowth*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 29(2), 523-550, vii.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). *Histologia básica*. (10ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Katlaris, P. H., Salam, I., & Farthing, M. J. (1995). *Lactobacilli to prevent traveler's diarrhea?* N Engl J Med, 333(20), 1360-1361. doi: 10.1056/nejm199511163332016
- Kelley, R. L., Minikhiem, D., Kiely, B., O'Mahony, L., O'Sullivan, D., Boileau, T., & Park, J. S. (2009). *Clinical benefits of probiotic canine-derived Bifidobacterium animalis strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea*. Vet Ther, 10(3), 121-130.

- Kelley, R. L., Park, J. S., O'Mahony, L., Minikhiem, D., & Fix, A. (2010). *Safety and tolerance of dietary supplementation with a canine-derived probiotic (Bifidobacterium animalis strain AHC7) fed to growing dogs*. Vet Ther, 11(3), E1-14.
- Khalid, U., McGough, C., Hackett, C., Blake, P., Harrington, K. J., Khoo, V. S., . . . Andreyev, H. J. (2006). *A modified inflammatory bowel disease questionnaire and the Vaizey Incontinence questionnaire are more sensitive measures of acute gastrointestinal toxicity during pelvic radiotherapy than RTOG grading*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 64(5), 1432-1441. doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.10.007
- Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., & Courvalin, P. (1988). *Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in Enterococcus faecium*. N Engl J Med, 319(3), 157-161. doi: 10.1056/nejm198807213190307
- Leclercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J., & Courvalin, P. (1989). *Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 33(1), 10-15.
- Lenoir-Wijnkoop, I., Sanders, M. E., Cabana, M. D., Caglar, E., Corthier, G., Rayes, N., Wolvers, D. A. (2007). *Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract*. Nutr Rev, 65(11), 469-489.
- Lutgendorff, F., Akkermans, L. M., & Soderholm, J. D. (2008). *The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage*. Curr Mol Med, 8(4), 282-298.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., & Vesikari, T. (1995). *Lactic Acid Bacteria in the Treatment of Acute Rotavirus Gastroenteritis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 20(3), 333-338.
- Marcinakova, M., Simonova, M., Strompfova, V., & Laukova, A. (2006). *Oral application of Enterococcus faecium strain EE3 in healthy dogs*. Folia Microbiol (Praha), 51(3), 239-242.
- Marschan, E., Kuitunen, M., Kukkonen, K., Poussa, T., Sarnesto, A., Haahtela, T., Vaarala, O. (2008). *Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation*. Clin Exp Allergy, 38(4), 611-618. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02942.x
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Dore, J., Pochart, P., & Seksik, P. (2004). *Review article: gut flora and inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 20 Suppl 4, 18-23. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.02062.x
- McGough, C., Wedlake, L., Baldwin, C., Hackett, C., Norman, A. R., Blake, P., Andreyev, H. J. (2008). *Clinical trial: normal diet vs. partial replacement with oral E028 formula for the prevention of gastrointestinal toxicity in cancer patients undergoing pelvic radiotherapy*. Aliment Pharmacol Ther, 27(11), 1132-1139. doi: 10.1111/j.1365-2036.2008.03665.x

- Meddings, J. B., & Swain, M. G. (2000). *Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat*. *Gastroenterology*, 119(4), 1019-1028.
- Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, E., Rautio, M., Huovinen, P., & Kononen, E. (2005). *Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs*. *Appl Environ Microbiol*, 71(8), 4169-4175. doi: 10.1128/AEM.71.8.4169-4175.2005
- Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., & Varkila, K. (1996). *Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria*. *Infect Immun*, 64(12), 5403-5405.
- Morris, J., & Dobson, J. (2001). *Small Animal Oncology*. (1st edition). Oxford: Blackwell Science
- Mukai, T., Asasaka, T., Sato, E., Mori, K., Matsumoto, M., & Ohori, H. (2002). *Inhibition of binding of Helicobacter pylori to the glycolipid receptors by probiotic Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 32(2), 105-110.
- Nixon, A. F., Cunningham, S. J., Cohen, H. W., & Crain, E. F. (2012). *The effect of Lactobacillus GG on acute diarrheal illness in the pediatric emergency department*. *Pediatric Emerg Care*, 28(10), 1048-1051. doi: 10.1097/PEC.0b013e31826cad9f
- O'Mahony, D., Murphy, K. B., MacSharry, J., Boileau, T., Sunvold, G., Reinhart, G., O'Mahony, L. (2009). *Portrait of a canine probiotic Bifidobacterium--from gut to gut*. *Vet Microbiol*, 139(1-2), 106-112. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.05.002
- Ogilvie, G. K., Moore, A. S. (1995). *Managing the Veterinary Cancer Patient: A practice manual*. New Jersey: Veterinary Learning Systems Co., Inc.
- Pedone, C. A., Bernabeu, A. O., Postaire, E. R., Bouley, C. F., & Reinert, P. (1999). *The effect of supplementation with milk fermented by Lactobacillus casei (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres*. *Int J Clin Pract*, 53(3), 179-184.
- Pochard, P., Gosset, P., Grangette, C., Andre, C., Tonnel, A. B., Pestel, J., & Mercenier, A. (2002). *Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients*. *J Allergy Clin Immunol*, 110(4), 617-623.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (1999). *Microbiology*: McGraw-Hill Higher Education.
- Pruitt, A. F., & Thrall, D. E. (2011). Principles of radiation therapy. In: Dobson, J. M. & Lascelles, B. D., *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3rd edition., pp. 80-90). Gloucester: BSAVA

- Qin, H. L., Shen, T. Y., Gao, Z. G., Fan, X. B., Hang, X. M., Jiang, Y. Q., & Zhang, H. Z. (2005). *Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection*. World J Gastroenterol, 11(17), 2591-2596.
- Resta-Lenert, S., & Barrett, K. E. (2003). *Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)*. Gut, 52(7), 988-997.
- Rosenfeldt, V., Michaelsen, K. F., Jakobsen, M., Larsen, C. N., Moller, P. L., Pedersen, P., Paerregaard, A. (2002). *Effect of probiotic Lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea*. Pediatr Infect Dis J, 21(5), 411-416.
- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A., & Yolken, R. H. (1994). *Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus*. Lancet, 344(8929), 1046-1049.
- Salminen, M. K., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., & Jarvinen, A. (2004). *Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. rhamnosus GG*. Clin Infect Dis, 38(1), 62-69. doi: 10.1086/380455
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Mattila-Sandholm, T. (1998). *Demonstration of safety of probiotics — a review*. Int J Food Microbiol, 44(1–2), 93-106. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00128-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00128-7)
- Santos, J., Saunders, P. R., Hanssen, N. P., Yang, P. C., Yates, D., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (1999). *Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat*. Am J Physiol, 277(2 Pt 1), G391-399.
- Sashihara, T., Sueki, N., & Ikegami, S. (2006). *An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases*. J Dairy Sci, 89(8), 2846-2855. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72557-7
- Saxelin, M., Rautelin, H., Salminen, S., & Mäkelä, P. H. (1996). *Safety of Commercial Products With Viable Lactobacillus Strains*. Infectious Diseases in Clinical Practice, 5(5), 331-335.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., & Black, R. E. (2006). *Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials*. Lancet Infect Dis, 6(6), 374-382. doi: 10.1016/s1473-3099(06)70495-9
- Seehofer, D., Rayes, N., Schiller, R., Stockmann, M., Muller, A. R., Schirmeier, A., Neuhaus, P. (2004). *Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats*. J Surg Res, 117(2), 262-271. doi: 10.1016/j.jss.2003.11.021

- Snedecor, G. W., & Cochran, W. G (1989). *Statistical Methods* (8th edition). Iowa: Iowa State University Press
- Soderholm, J. D., & Perdue, M. H. (2001). *Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 280(1), G7-G13.
- Strompfova, V., Laukova, A., & Ouwehand, A. C. (2004a). *Lactobacilli and enterococci--potential probiotics for dogs*. Folia Microbiol (Praha), 49(2), 203-207.
- Strompfova, V., Laukova, A., & Ouwehand, A. C. (2004b). *Selection of enterococci for potential canine probiotic additives*. Vet Microbiol, 100(1-2), 107-114. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.02.002
- Su, P., Henriksson, A., & Mitchell, H. (2007). *Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model*. J Appl Microbiol, 103(6), 2392-2400. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03469.x
- Suchodolski, J. S. (2011). *Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 41(2), 261-272. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.12.006
- Suchodolski, J. S., Camacho, J., & Steiner, J. M. (2008). *Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis*. FEMS Microbiol Ecol, 66(3), 567-578. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x
- Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Westermarck, E., Steiner, J. M., Wolcott, R. D., Spillmann, T., & Harmoinen, J. A. (2009). *The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing*. BMC Microbiol, 9, 210. doi: 10.1186/1471-2180-9-210
- Sun, J., Le, G. W., Shi, Y. H., & Su, G. W. (2007). *Factors involved in binding of Lactobacillus plantarum Lp6 to rat small intestinal mucus*. Lett Appl Microbiol, 44(1), 79-85. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02031.x
- Tizard, I. R. (2004). *Veterinary immunology: an introduction* (7th ed.): Saunders.
- Todorov, S. D., Furtado, D. N., Saad, S. M., & Gombossy de Melo Franco, B. D. (2011). *Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for Lactobacillus acidophilus La-14, a potential probiotic strain*. New Microbiol, 34(4), 357-370.
- Toh, Z. Q., Anzela, A., Tang, M. L., & Licciardi, P. V. (2012). *Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease*. Front Pharmacol, 3, 171. doi: 10.3389/fphar.2012.00171
- Vahjen, W., & Manner, K. (2003). *The effect of a probiotic Enterococcus faecium product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of Salmonella spp., Campylobacter spp. and Clostridium spp. in faeces*. Arch Tierernahr, 57(3), 229-233.

- Veir, J. K., Knorr, R., Cavadini, C., Sherrill, S. J., Benyacoub, J., Satyaraj, E., & Lappin, M. R. (2007). *Effect of supplementation with Enterococcus faecium (SF68) on immune functions in cats*. *Vet Ther*, 8(4), 229-238.
- Vernazza, C. L., Rabiou, B. A., & Gibson, G. R. Rastall, B., & Gibson, G. (2006). Human Colonic Microbiology and the Role of Dietary Intervention: Introduction to Prebiotics. In: *Prebiotics: Development and Application* (pp. 1-29). West Sussex: Wiley.
- Wynn, S. G. (2009). *Probiotics in veterinary practice*. *J Am Vet Med Assoc*, 234(5), 606-613. doi: 10.2460/javma.234.5.606
- Yamamoto, K., Takeda, N., & Yamatodani, A. (2002). *Establishment of an animal model for radiation-induced vomiting in rats using pica*. *J Radiat Res*, 43(2), 135-141.
- Yan, F., & Polk, D. B. (2002). *Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 277(52), 50959-50965. doi: 10.1074/jbc.M207050200
- Yang, Y. J., Chuang, C. C., Yang, H. B., Lu, C. C., & Sheu, B. S. (2012). *Lactobacillus acidophilus ameliorates H. pylori-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFkappaB pathways*. *BMC Microbiol*, 12, 38. doi: 10.1186/1471-2180-12-38
- Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P. C., Ngan, B. Y., McKay, D. M., Sherman, P. M. (2006). *Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress*. *Gut*, 55(11), 1553-1560. doi: 10.1136/gut.2005.080739