



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

La microbiota intestinal en perros y gatos y su relación con el sistema inmunitario
asociado

The intestinal microbiota in dogs and cats and its relationship with the associated
immune system

Autor/es

Cristina Soriano Ferrer

Director/es

Cristina Acín Tresaco

Facultad de Veterinaria

2021

-ÍNDICE-

1. Resumen.....	2
1.1. Resumen	2
1.2. Abstract.....	2
2. Introducción.....	3
3. Justificación y objetivos.....	4
4. Metodología.....	5
5. Resultados y discusión.....	5
5.1. ¿Qué es la microbiota intestinal?.....	5
5.2. ¿Qué microorganismos la componen?.....	7
5.3. ¿Cuáles son las funciones de la microbiota?.....	12
5.4. ¿Qué relación existe entre la microbiota y el sistema inmune del huésped?.....	15
5.4.1. ¿Cómo se da la comunicación entre el sistema inmune del huésped y la microbiota intestinal?.....	17
5.4.2. Células T reguladoras y células Th17, el balance entre los estímulos inmunosupresores y los proinflamatorios	19
5.5. ¿Qué es la disbiosis? ¿Cómo afecta al huésped?.....	20
5.6. Efectos de los antibióticos sobre la microbiota intestinal.....	21
5.7. Efectos sobre la microbiota de los probióticos.....	22
6. Conclusiones.....	24
6.1. Conclusiones.....	26
6.2. Conclusions.....	26
7. Valoración personal.....	27
8. Bibliografía.....	28

1. Resumen

1.1 Resumen

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que conviven, a través de una relación comensal en el intestino de los mamíferos, y los genes relacionados que se expresan. Los perros y los gatos poseen sus propias microbiotas, similares entre ellas pero no iguales, y que cumplen una función tanto metabólica como inmunológica para su huésped.

La microbiota no solo produce metabolitos que funcionan como energía para las células epiteliales del intestino del huésped o que pueden ser absorbidos, sino que es capaz, mediante señales bioquímicas, de modular la respuesta inmune del huésped. Ello hace que estén íntimamente ligados, el equilibrio de la microbiota, con los estados de salud y enfermedad del huésped.

El desequilibrio de la microbiota se denomina disbiosis, la cual se puede medir gracias a la cuantificación de ciertos metabolitos en las heces. El índice de disbiosis parece estar relacionado con ciertas patologías tanto digestivas (enteropatías crónicas) como de otros tejidos alejados del tracto gastrointestinal (insuficiencia renal). Por ello, conocer el efecto sobre la microbiota de factores alterantes, como los antibióticos; o aquellos que la modulan de manera beneficiosa, como los probióticos, pueden ayudarnos a tratar dichas patologías.

1.2 Abstract

The intestinal microbiota is the set of microorganisms and the genes they express that coexist, through a commensal relationship, in the intestine of mammals. Dogs and cats have their own microbiota, similar to each other but not the same, which fulfil both a metabolic and an immunological function for their host.

The microbiota not only produces metabolites that function as energy for the epithelial cells of the host's intestine or that can be absorbed, but it is capable, through biochemical signals, of modulating the host's immune response. Being intimately linked, the balance of the microbiota with the host's health and disease states.

The imbalance of the microbiota is called dysbiosis, which can be measured thanks to the quantification of certain metabolites in the faeces. The dysbiosis index seems to be related to certain diseases, both digestive (chronic enteropathies) and other tissues far from the gastrointestinal tract (renal failure). Therefore, to know the effect on the microbiota of altering factors, such as antibiotics; or those that modulate it in a beneficial way, such as probiotics, can help us treat these pathologies.

2. Introducción

El término microbiota hace referencia al conjunto de microorganismos (no solo la comunidad de microorganismos, sino también los genes que expresan, las rutas metabólicas que ejercen y por tanto el micro-ecosistema que forman) que viven en simbiosis con el hospedador y los cuales presentan un papel en la salud y la enfermedad de éste. Existen diferentes comunidades de microbiota en los perros y los gatos según su localización (piel, tracto respiratorio, aparato genital, conjuntiva, intestinal, etc.), siendo la intestinal la mayor de estas comunidades con un papel fundamental en la salud del individuo.

La microbiota intestinal es como denominamos a aquella población de microorganismos, formada por bacterias en su mayoría, pero también por virus, hongos y protozoos, que habitan en el tracto gastrointestinal. A día de hoy se considera un órgano con importantes funciones metabólicas e inmunológicas, que repercute no solo en salud intestinal sino que su correcto funcionamiento y/o desequilibrios (disbiosis) tienen un papel en enfermedades sistémicas (Pereira and Clemente, 2021).

Es por esto que es no solo importante conocer la composición de la microbiota intestinal, sino los factores que la modifican y que pueden llevar a este micro-ecosistema a un desequilibrio y por tanto a un estado patológico del individuo. Algunos de estos factores son, no sólo la composición en especies de estos microorganismos que mayoritariamente son bacterias y que difiere según el tramo del tracto gastrointestinal, sino también la relación de estos con las células epiteliales intestinales, la capa de moco, el propio ambiente del tracto gastrointestinal e incluso la relación con el sistema inmunitario del huésped (Suchodolski, 2021).

En los últimos años se ha empezado a usar técnicas de secuenciación de ADN para alcanzar un conocimiento más amplio de la microbiota, ya que se ha visto que representa un papel fundamental tanto en estados de salud como de enfermedad. También se ha ahondado en cómo este conocimiento, desde un punto de vista integrativo, puede ayudarnos a entender los procesos fisiológicos y patológicos que se dan en estas especies. Esto es debido a la estrecha relación entre el micro-ecosistema de la microbiota y el huésped, que nos permite aprovechar dicha relación para determinadas intervenciones terapéuticas (Suchodolski, 2021).

3. Justificación y objetivos

El estudio de la microbiota intestinal, tanto de su composición, funciones, relaciones con el huésped como sus alteraciones, suponen de gran interés en la clínica de perros y gatos porque permite conocer un importante factor en estados de salud y enfermedad. Es por esto, que los objetivos de este trabajo son:

- ❖ Conocer la composición y diversidad de la microbiota intestinal de perros y gatos
- ❖ Exponer las funciones de la microbiota y cómo afectan al huésped
- ❖ Descubrir cómo se relaciona el sistema inmune del huésped y la microbiota intestinal
- ❖ Exponer la relación entre la disbiosis y procesos patológicos
- ❖ Conocer los factores que pueden modificar la microbiota intestinal

4. Metodología

Este Trabajo de Fin de Grado se ha llevado a cabo mediante una revisión bibliográfica de artículos científicos, libros y revistas. Se han utilizado como métodos de busca los buscadores de Alcorze, Pubmed y Google Académico.

Se ha buscado en libros básicos de editoriales científicas, actas de congresos de sociedades profesionales y científicas relacionadas, bases de datos como Pubmed, Science Direct y Google Scholar, Elsevier y el repositorio IVIS. Se han tenido en cuenta las publicaciones de los últimos 20 años, así como las más relevantes de años anteriores. Entre las palabras clave utilizadas en la búsqueda de la información, realizándose la búsqueda en idioma inglés en su mayor parte, cabe destacar: “microbiota”, “microbioma” “intestinal microbiota”, “gut microbioma”, “gut microbiota”, “immune system”, “microbiota and dogs”, “microbiota and immunity”, “microbiota and antibiotics”, “gut microbiota and probiotics”

Para realizar la bibliografía se ha utilizado el método Harvard, mediante el gestor de referencias Zotero.

5. Resultados y discusión

5.1 ¿Qué es la microbiota intestinal?

La microbiota intestinal se puede definir como el micro-ecosistema de microorganismos formado por bacterias, virus, hongos y protozoos que habitan en el tracto gastrointestinal, el cual, ya es considerado a día de hoy, como un importante órgano con funciones metabólicas y del sistema inmune (Shreiner, Kao and Young, 2015). Podemos hablar de microbiota cuando nos referimos al conjunto de microorganismos desde un punto de vista taxonómico, es decir, haciendo referencia a las especies de microorganismos que la componen. Mientras que el término microbioma hace referencia a su contenido genético y por ende a la funcionalidad que estos microorganismos llevan a cabo (Suchodolski, 2021).

Casi la totalidad de los microorganismos que pueblan el tracto gastrointestinal son bacterias. Las bacterias constituyen con gran diferencia el componente más grande de estos microorganismos intestinales, con más del 98% de las lecturas de secuenciación metagenómica de muestras fecales asignadas a bacterias en perros y gatos (Swanson *et al.*, 2011). Así mismo, la mayoría de bacterias que encontramos en el intestino delgado de perros y gatos son anaerobias estrictas o facultativas. Los filos predominantes son Firmicutes (también conocidas como Endobacterias, mayoritariamente Gram positivas), Fusobacterias (bacilos Gram negativos) y Bacteroidetes (Gram negativas) (Ritchie, Steiner and Suchodolski, 2008; Honneffer *et al.*, 2017). Aunque ya se ha extendido el uso de métodos moleculares para caracterizar la microbiota, todavía no se han descrito todas las presentes (Suchodolski, 2021).

El tracto gastrointestinal está formado por varias partes, que muestran diferencias, tanto anatómicas como fisiológicas debido a sus diferentes funciones, ya sea la digestión, la absorción de nutrientes o la excreción de residuos. Esto conlleva diferencias de pH, de enzimas, de concentraciones de electrolitos, de velocidades de absorción, etc, y son estas variaciones las que producen ambientes diferentes y por tanto promueven que las comunidades de microorganismos que habitan en ellas sean distintas (Pereira and Clemente, 2021). Esto es importante no solo porque las comunidades de microorganismos varían en función del tramo del tracto gastrointestinal en el que se encuentran, sino que las diferencias en el ambiente, pueden llevar a que similares especies de bacterias expresen genes diferentes y por tanto tener funciones metabólicas distintas. La expresión de factores de virulencia puede depender de la concentración de ciertos metabolitos en el lumen (Suchodolski, 2021).

La enorme diversidad de microorganismos que conviven con el huésped, afectan al desarrollo, regulación y actividad del sistema inmune y por tanto, las respuestas del sistema inmune están íntimamente ligadas con la microbiota. Esta teoría contradice lo que se pensaba hace unos años, y por tanto el sistema inmune no solo diferencia entre lo propio y lo ajeno, sino que es capaz de concretar el grado de amenaza y responder acorde a lo necesario. Así, el sistema inmune es capaz de, mientras tolera a la microbiota, tener una respuesta altamente eficaz contra patógenos. Esta respuesta está

modulada por cómo son los antígenos y por cómo son presentados frente al sistema inmune. Es así como la microbiota forma un papel importantísimo en la modulación del sistema inmune, y por lo que está estrechamente relacionada con los estados de salud y enfermedad (Tizard and Jones, 2018).

5.2 ¿Qué microorganismos la componen?

La mayoría de las bacterias de la microbiota intestinal son bacterias anaerobias, necesitan por tanto medios concretos para crecer. Es por esto que los métodos que habitualmente se utilizan en la clínica diaria para recoger muestras fecales no son los óptimos para cultivarlas. Solo algunas especies pueden ser aisladas a partir de las muestras fecales de los pacientes, y esto puede inducir a error en la interpretación clínica ya que se puede llegar a pensar (de forma errónea) que estas especies son patógenas en perros y gatos (como por ejemplo *E. coli* o *C. Perfringens*) (Suchodolski, 2021).

Además las bacterias que pueblan el intestino no se encuentran solo en el lumen, algunas bacterias son capaces de atravesar el moco y quedar adheridas a las células epiteliales, dentro de las criptas del colon (Donaldson, Lee and Mazmanian, 2016). En la Figura 1 se pueden observar bacterias (*Helicobacter spp*) dentro de las criptas del colon en un perro sano.



Figura 1. Microfotografía de la mucosa del colon en un perro sano. De izquierda a derecha, tinción de hematoxilina-eosina donde no se aprecian bacterias; tinción con nitrato de plata donde se ven las bacterias dentro de las criptas y autofluorescencia donde las bacterias emiten fluorescencia roja (Giaretta *et al.*, 2020).

Aunque perros y gatos son especies carnívoras, el perro posee una flexibilidad metabólica mayor que le permite digerir y metabolizar una mayor cantidad de hidratos de carbono complejos, lo que puede llevar a diferencias en sus respectivas microbiotas (Deng and Swanson, 2015).

Existen múltiples estudios que analizan la microbiota de perros y gatos, pero que difieren entre sí sobre todo debido al método de análisis utilizado. Un estudio llevado a cabo en perros determinó que, de las muestras analizadas, las bacterias se repartían en: Firmicutes 47,7%, Proteobacteria 23,3%, Fusobacteria 16,6%, Bacteroidetes 12,4%. De los cuales los Clostridiales eran predominantes en el duodeno (40%) y jejunio (39%), eran bastante abundantes en el íleon (25%) y el colon (26%), mientras que los Fusobacteriales y Bacteriodales eran los más abundantes en el íleon (33%) y el colon (30%) (Deng and Swanson, 2015). Los Lactobacillales se encontraban de forma común en todo el tubo digestivo y los Enterobacteriales se veían de forma más frecuente en el intestino delgado que en el colon (Suchodolski, Camacho and Steiner, 2008).

En la Tabla 1 se pueden observar los grupos de bacterias detectados con mayor asiduidad en perros y gatos a través de muestras fecales y que por tanto representan la parte más distal del tracto gastrointestinal (Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013).

A)	PHYLUM	ORDER	GENUS	B)	PHYLUM	ORDER	GENUS
	FIRMICUTES 94.4% (69.0-99.9%) ~33%*	Lactobacillales 11.7% (0-87.8%)	Lactobacillus 3.6% (0-75.4%)		FIRMICUTES 90.7% (20.4-99.9%) ~13%*	Lactobacillales 16.9% (0-99.4%)	Streptococcus 7.2% (0-75.4%)
		Clostridiales 61.7% (4.8-97.6%)	Ruminococcus 12.4% (0.4-42.7%) Blautia 4.7% (0.9-8.9%) +30 more Most <1%			Clostridiales 54.9% (0-94.1%)	Ruminococcus 10.3% (0.3-42.5%) Blautia 4.9% (0.7-14.9%) +30 more Most <1%
		Erysipelotrichales 17.1% (0-68.4%)	Catenibacterium 8.0% (0-48.1%)			Erysipelotrichales 19.4% (0-78.8%)	Catenibacterium 9.6% (0-56.8%)
	BACTEROIDETES 2.1% (0-18.2%) ~4%*	Bacteroidales 2.2% (0-18.2%)	Bacteroides and Prevotella 1.0% (0-14.6%)		BACTEROIDETES 4.6% (0-61.7%) ~9%*	Bacteroidales 4.4% (0-48.1%)	Bacteroides and Prevotella 1.8% (0-27.1%)
	ACTINOBACTERIA 4.4% (0-24.1%) ~1%*	Coriobacteriales 3.1% (0-17.8%) Bifidobacteriales 2.8% (0-17.8%)	Various Each <2% Bifidobacterium 2.8% (0-17.8%)		ACTINOBACTERIA 2.7% (0-24.1%) ~1%*	Coriobacteriales 2.7% (0-24.1%) Bifidobacteriales <0.1%	Various Each <2% Bifidobacterium <0.1%
	PROTEOBACTERIA 1.9% (0-16.5%) ~14%*	Various Most <0.5%	Various Most <0.1%		PROTEOBACTERIA 0.4% (0-6.5%) ~6%*	Various Most <0.5%	Various Most <0.1%
	FUSOBACTERIA 0.6% (0-6.8%) ~8%*	Fusobacteriales <1%	Fusobacterium <1%		FUSOBACTERIA 1.6% (0-20.5%) ~1%*	Fusobacteriales 1.5% (0-18.2%)	Fusobacterium <1%

Tabla 1. En la tabla que se muestra a continuación se pueden observar, de forma simplificada, las especies presentes en materia fecal de perros (columna A) y de gatos (columna B). Se representan tanto en filo, como orden, como en género de especies halladas. Se indican las proporciones de cada una de ellas (García-Mazcorro and Minamoto, 2013).

En Tabla 2 se describen los filos de bacterias más abundantes en el tracto gastrointestinal de perros y gatos adultos, que son Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria. De forma parecida a lo que se observa en la microbiota humana, los filos más abundantes en las heces de los perros son Firmicutes y Bacteroidetes (Barko *et al.*, 2018).

Phylum	Class	Order	Family	Genus
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium
			Ruminococcaceae	Ruminococcus
			Eubacteraceae	Faecalibacterium
			Eubacteraceae	Eubacterium
	Bacilli	Lactobacilliales	Lactobacillaceae	Lactobacillus
			Streptococcaceae	Streptococcus
	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Enterococcus
				Turicibacter
				Catenibacterium
	Negativicutes	Selenomonadales	Selenomonadaceae	Coprobacillus
Allobaculum				
Megamonas				
Dialister				
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Veillonellaceae	
			Veillonellaceae	Megasphaera
			Veillonella	
Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Prevotellaceae	
			Prevotella	
			Bacteroidaceae	Bacteroides
			Coriobacteriaceae	Collinsella
			Atopobiaceae	Olsenella
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Slackia	
			Eggerthellaceae	Eggerthella
			Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Fusobacterium	
			Escherichia	
		Aeromonadales	Shigella	
			Succinivibrio	
			Anaerobiospirillum	

Tabla 2. Taxonomía y filogenética de los microorganismos más comunes de la microbiota (Barko *et al.*, 2018).

Por otro lado, un estudio llevado a cabo en perros sanos, determinó que *Helicobacter* era, con diferencia, la bacteria mayoritaria en el estómago (>98%). Estudios en gatos han mostrado resultados similares. Así, se han identificado de forma abundante, tanto en perros como gatos, *H. heilmannii*, pero también otras especies como *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. pametensis* (García-Mazcorro and Minamoto, 2013).

En cuanto a la diversidad que encontramos en el intestino delgado, las conclusiones de estudios recientes reflejan que: los órdenes más abundantes en los gatos son Clostridiales y Lactobacillales (cercano al 90%); mientras que en perros, los filos más

abundantes en el intestino delgado son Firmicutes (47,7%), Proteobacteria (23,3%), Fusobacteria (16,6%) y Bacteroidetes (16,6%) (Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013).

Según otro estudio, dentro del filo de los Firmicutes; Bacili, Clostridia y Erysipelotrichi son las clases más representativas tanto en perros como en gatos. Siendo especialmente recalculable que dentro de la clase Bacili, predominan los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* en perros y *Enterococcus* y *Lactobacillus* en gatos. Mientras que dentro de Proteobacteria, los géneros *Sutterella*, *Succinivibrio*, *Anaerobiospirillum* y *Escherichia/Shigella* son los más abundantes encontrados en las heces de perros y gatos (Alessandri, Argentini, *et al.*, 2020).

Aunque la diversidad de bacterias es bastante similar en las dos especies domésticas, en un estudio relativo a las bifidobacterias, se encontraron diferencias en la presencia de las especies relativas a este grupo entre ambas especies. Las especies que más se identificaron en el perro fueron: *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* subesp y *Bifidobacterium pseudolongum_new_subesp*. Mientras que en el gato fueron: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium pseudolongum_new_subesp*, *Bifidobacterium longum* subesp. *longum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* y *Bifidobacterium crudilactis* (Alessandri, Milani, *et al.*, 2020).

Aparte de las bacterias, en el tracto gastrointestinal podemos encontrar hongos, virus y parásitos, aunque la relación de éstos con la microbiota y el huésped no están bien estudiados. Recientes estudios aclaran que el hongo más abundante en perros y gatos es Ascomycota, aunque se han encontrado más filos como Basidiomycota, Glomeromycota, Zygomycota (Blake and Suchodolski, 2016).

Es importante recalcar que numerosos estudios han demostrado que enfermedades entéricas agudas y crónicas, como el IBD (inflammatory bowel disease), están relacionadas con alteraciones de la composición de la microbiota y por tanto con la alteración de las especies de la forma (Honneffer *et al.*, 2014). En otro estudio se vio que, comparada con la microbiota de perros sanos, los perros con IBD, presentaban una

menor cantidad de Fusobacterias y Faecalibacterium spp, productoras de ácidos grasos de cadena corta (Huang *et al.*, 2020).

Además, existen estudios que muestran que la composición de la microbiota cambia con la edad. Conforme aumenta la edad de los perros se observa una bajada considerable de las Fusobacterias. Y no solo con la edad, sino que hasta podría estar relacionado con problemas de memoria, los perros de un estudio que cometían más errores tenían una mayor cantidad de Actinobacterias (Kubinyi *et al.*, 2020).

5.3 ¿Cuáles son las funciones de la microbiota?

La microbiota intestinal lleva a cabo funciones que benefician al huésped desde el punto de vista metabólico y es por esto por lo que, además de un “órgano inmune” se considera un “órgano metabólico”. Algunas de estas funciones son: colaboración en la digestión, ayudar al metabolismo del huésped, síntesis de vitaminas, biotransformación de ácidos biliares, metabolismo de xenobióticos, correcta maduración de las células epiteliales intestinales, y defensa contra bacterias patógenas. Es la biodiversidad microbiana presente en la microbiota intestinal la que le permite al huésped beneficiarse de rutas metabólicas que de otro modo no podría disfrutar (Mondo *et al.*, 2019).

Los procesos que llevan a cabo las bacterias ofrecen energía y sustratos no solo a ellas mismas, sino también al huésped, como podemos apreciar en la Figura 2. El principal de estos procesos se considera la fermentación ya que la mayoría de las bacterias son anaerobias ya sea facultativas o estrictas (Schmitz and Suchodolski, 2016). Los sustratos de esta fermentación son alcoholes o carbohidratos no digestibles como el almidón, celulosa o la pectina y los productos de la fermentación de estos sustratos son gases, ácidos grasos de cadena corta, acetato, propionato y butirato, los cuales sirven como sustrato energético bacteriano pero también para las células de la pared intestinal (Mondo *et al.*, 2019).

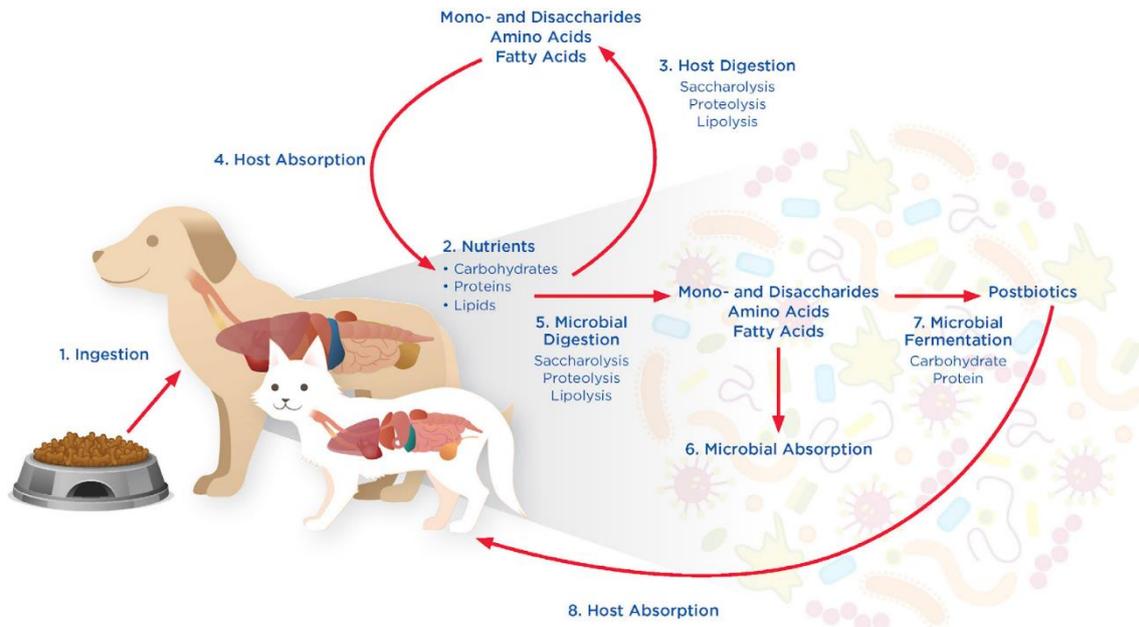


Figura 2. Ejemplo de las interacciones que se dan entre la comida (fuente de nutrientes), la microbiota intestinal y el huésped. En primer lugar, se da la ingestión de la comida, que da como resultado de la digestión de los diferentes nutrientes (lípidos, glúcidos, carbohidratos). Estos son convertidos en moléculas más simples, que pueden ser absorbidas por el intestino del huésped. Los nutrientes no absorbidos por el huésped, pueden ser transformados por la microbiota mediante procesos digestivos para su propia absorción. Los nutrientes que restan son fermentados por la microbiota, y los productos obtenidos absorbidos por el huésped (Wernimont *et al.*, 2020).

Los ácidos grasos de cadena corta, aparte de servir como energía (Wong *et al.*, 2006) ayudan a modular el pH luminal, ayudando a que sea más ácido y por tanto un medio óptimo para el crecimiento de las bacterias comensales pero no de las patógenas (el pH es una de las principales barreras frente a las bacterias patógenas). Además ayudan a la reabsorción de sodio y potasio cuando son absorbidos por el intestino (Mondo *et al.*, 2019).

Los ácidos grasos de cadena corta no solo suponen un sustrato energético, sino que ayudan a regular la motilidad intestinal y son una importante defensa contra las bacterias patógenas. Asimismo, inducen la formación de células T reguladoras, que son mediadoras de la inflamación con un efecto antiinflamatorio. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* y *Ruminococcus bromii* son algunas

de las bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (Blake and Suchodolski, 2016).

Como se puede apreciar en la Figura 3, la transformación de ácidos biliares primarios (el cólico con tres OH y el quenodesoxicólico con dos OH) a secundarios (desoxicólico y litocólico) también es llevada a cabo por bacterias de la microbiota. Estos ácidos biliares secundarios ayudan a la correcta absorción de lípidos y vitaminas liposolubles por el intestino (Blake and Suchodolski, 2016).

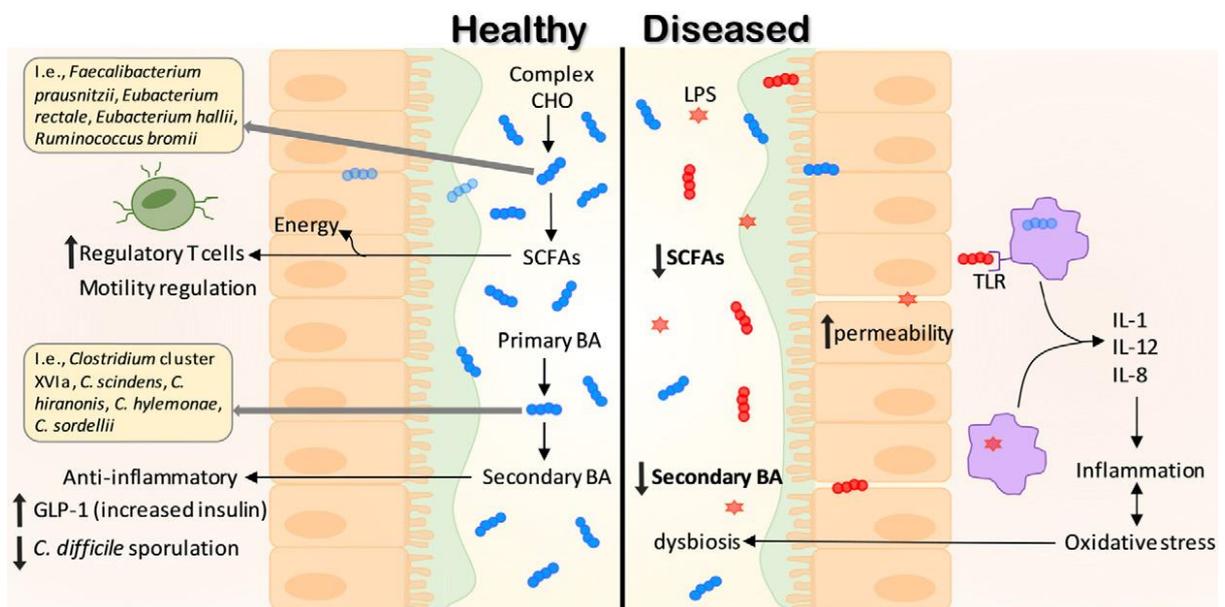


Figura 3. Representación de cómo los organismos de la microbiota son capaces de transformar carbohidratos complejos en ácidos grasos de cadena corta y ácidos biliares primarios en secundarios y cómo esto tiene efectos sobre el sistema inmune (Blake and Suchodolski, 2016).

En animales sanos, la microbiota intestinal (Figura 3) es capaz de convertir carbohidratos complejos (CHO) en ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) los cuales aportan energía a las células epiteliales del intestino, aumentan las células T reguladoras antiinflamatorias y modulan la motilidad intestinal. La microbiota también se encarga de convertir los ácidos biliares primarios en secundarios, que tienen propiedades antiinflamatorias, inducen GLP-1 (aumentan la insulina) e incluso son capaces de reducir la esporulación de bacterias como *Clostridium difficile*. Sin embargo, una microbiota en estado de

enfermedad, produce menor cantidad de péptidos microbianos, lo que conlleva a un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal y como consecuencia la translocación de bacterias. En este estado, los macrófagos reconocen las bacterias y promueven las reacciones inflamatorias. Finalmente, esta inflamación lleva al huésped a un estado de estrés oxidativo que a su vez produce disbiosis, y por tanto más desequilibrio en la microbiota (Blake and Suchodolski, 2016).

5.4 ¿Qué relación existe entre la microbiota y el sistema inmune del huésped?

Los animales necesitan crear relaciones de simbiosis con la microbiota que habita sus superficies (piel, tracto respiratorio, tracto digestivo, etc). La gran diversidad de microorganismos que se encuentran en ellos influencia, en gran medida, el desarrollo, regulación y función del sistema inmunitario. Es por esto que la microbiota intestinal se considera también un importante órgano inmunitario (Tizard and Jones, 2018).

La importancia inmunológica que representa la microbiota se puede explicar debido a que la actividad inmunológica que se da en el intestino es mayor de la que se da en todos los otros órganos linfoides juntos. Se estima que más del 80% de las células B activadas se encuentran en el intestino, cuya función es proteger de la posible entrada de bacterias de la microbiota. La relación entre microbiota y huésped, también viene dada por la capacidad del sistema inmune de encontrar un equilibrio entre los procesos pro-inflamatorios y los anti-inflamatorios (Kamada *et al.*, 2013; Tizard and Jones, 2018).

Se cree que la capacidad que tiene el sistema inmune de tolerar a la microbiota se debe a que el sistema inmune es inmaduro en el momento del nacimiento, y que los animales en el momento del nacimiento ya reciben microbiota por parte de la madre (Belkaid and Hand, 2014). Es más, recientes estudios demuestran que humanos y ratones nacen ya con microbiota (es decir, desarrollan una microbiota intra-útero) (Grześkowiak *et al.*, 2015).

Las bacterias comensales ayudan al desarrollo de la estructura fisiológica del intestino y esto permite al huésped diferenciar entre bacterias comensales y las patógenas. La

relación existente entre ambos, permite que el sistema inmune sea capaz de llevar a cabo respuestas defensivas eficaces contra las bacterias patógenas ajenas mientras que al mismo tiempo es tolerante con las comensales y las rutas metabólicas que estas llevan a cabo. La capacidad que tienen los microorganismos de la microbiota de producir cambios en el sistema inmunitario, tanto a nivel local como sistémico son debidos a unos complejos sistemas de feedback entre los componentes tanto innatos como adquiridos del sistema inmunitario y la microbiota (Mondo *et al.*, 2019).

La relación existente entre la microbiota y el huésped es tal, que hay estudios que demuestran que los animales “germ-free” (sin presencia de microorganismos de la microbiota o con una población muy reducida) tienen una densidad de células linfoides mucho menor en la mucosa intestinal y que su nivel de inmunoglobulinas también es menor en el suero. Mientras que, estos mismos animales, sometidos a un contacto con microorganismos de la microbiota consiguen un incremento considerable de linfocitos e inmunoglobulinas, no solo en el intestino, sino también en el suero. Esto se explica, porque el desarrollo y regulación de los linfocitos T helper Tipo 1 y Tipo 2 esta mediado por la microbiota, mediante la producción de butirato y acetato (ácidos grasos de cadena corta) (Mondo *et al.*, 2019).

En otro estudio llevado a cabo en ratones, se vio que aquellos animales “germ-free” (nacidos mediante cesárea y mantenidos aislados del ambiente) presentaban:

- Placas de Peyer de menor tamaño.
- Linfonodos mesentéricos de menor tamaño.
- Menor cantidad de Linfocitos T CD4⁺ en la lámina propia.
- Menor cantidad de linfocitos intraepiteliales que además presentan una menor expresión de receptores tipo Toll (sistema inmunitario innato) y más moléculas del sistema del complemento (MHC) clase II, así como menor citotoxicidad.
- Menor cantidad de Linfocitos T CD4⁺ en el bazo y centros germinales más pequeños debido a la menor cantidad de linfocitos B.
- Reducción significativa de la cantidad de macrófagos y neutrófilos.
- Nivel de inmunoglobulinas equivalente al 2% del de un animal sano.

Es innegable que estos animales se encuentran más indefensos contra posibles infecciones (Tizard and Jones, 2018).

La presencia de ciertas bacterias de la microbiota promueve no solo la diversificación de las células B, sino también la producción de IgA. En un estudio con conejos “germ-free”, la combinación de *Bacillus subtilis* y *Bacteriodes fragilis* podía producir la creación de células B y VDJ, siendo este último, un mecanismo de recombinación genética que interviene en el sistema inmunitario (Tizard and Jones, 2018)

La respuesta innata que se da en el intestino es sumamente importante para su protección y es llevada a cabo por la combinación de células como las células epiteliales del intestino, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y eosinófilos. La interacción de estas células con los péptidos microbianos ayuda a que se forme la relación comensal (Eissa *et al.*, 2019).

La respuesta adaptativa se da en los tejidos linfoides asociados a la mucosa intestinal donde se encuentran los linfocitos B y T, que juegan un papel fundamental en la inmunidad del intestino. Las células CD4⁺ T helper son una población de células que forman parte de los linfocitos T y que se clasifican según las citoquinas que son capaces de producir y que suponen una forma de comunicación dentro del sistema inmune (Eissa *et al.*, 2019).

5.4.1 ¿Cómo se da la comunicación entre el sistema inmune del huésped y la microbiota intestinal?

Se cree que la forma en la que las bacterias son capaces de producir cambios en el sistema inmune viene dada por señales que intercambia con éste. La comunicación entre ambos se da a través de metabolitos y nutrientes (Figura 4), y esta interacción es esencial para el correcto funcionamiento de las respuestas tanto innata como adaptativa (Tomkovich and Jobin, 2016). Cambios profundos en la microbiota producen como consecuencia efectos negativos en el correcto funcionamiento del sistema

inmune, es por esto que esta interacción es sumamente importante para la salud del huésped (Tizard and Jones, 2018).

La forma en la que el sistema inmune reconoce los microorganismos es mediante los “receptores que reconocen patrones (PRRs) y lo hace a través de dos sistemas: los receptores tipo Toll y las moléculas de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NODs). Estos PRRs son capaces de reconocer los denominados patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs). Una vez el microorganismo es reconocido se inicia una respuesta inmunitaria apropiada a ese microorganismo (Barko *et al.*, 2018).

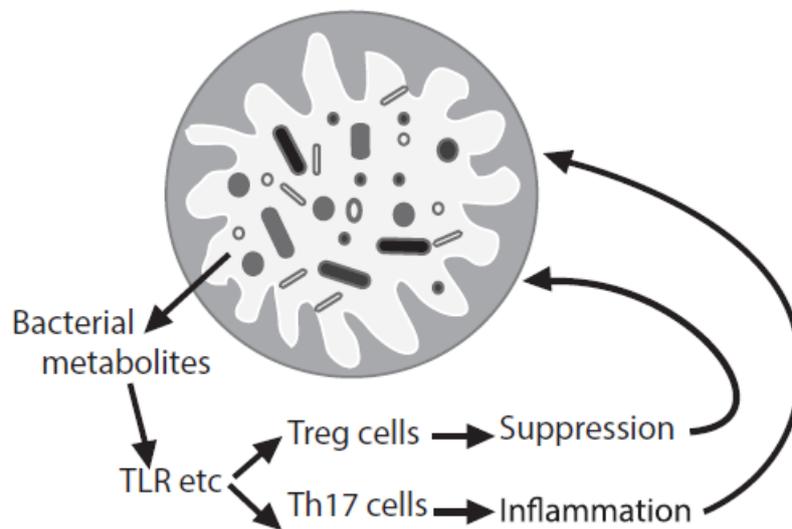


Figura 4. Los nutrientes y productos microbianos pasan a través de la pared intestinal y regulan el desarrollo y las actividades del sistema inmune, esto lo consigue promoviendo un balance entre la inmunosupresión que promueven las células T reguladoras y las células Th17 que promueven la inflamación (Tizard and Jones, 2018).

La presencia de ciertas especies de bacterias promueve la producción de células T reguladoras (por la presencia de ácidos grasos de cadena corta que son producidos como metabolitos de sus fermentaciones) no solo a nivel intestinal, sino también en otros tejidos como el bazo o el pulmón, incluso tienen un papel en la inhibición de procesos alérgicos. Las células T producidas por la relación con la microbiota intestinal en el intestino migran a otros tejidos de forma que influyen en el balance de estas células

en el resto del cuerpo. La forma en la cual la microbiota interviene en la producción de las células T reguladoras, tiene que ver con la estimulación que reciben las IELs (linfocitos intraepiteliales T que se encuentran en la lámina propia) por parte de la microbiota ya sea a través IL-1 (interleuquina-1) o IL-3, y esto lleva a que se diferencien como células T reguladoras o células Th17 (Tizard and Jones, 2018).

Parece ser que el Grupo 3 ILC también regula la información que se intercambia entre la microbiota y el huésped, mediante la producción de IL-17 e IL-22 las cuales atraen a los neutrófilos y, promueven la producción de péptidos antimicrobianos, estimulan la producción de IgA y la activación de células B. (Tizard and Jones, 2018).

5.4.2 Células T reguladoras y células Th17, el balance entre los estímulos inmunosupresores y los proinflamatorios

Las células T helper pueden diferenciarse en células T reguladoras o células Th17 en función de los estímulos que reciban provenientes de la microbiota (Ohnmacht *et al.*, 2015). Las células T reguladoras intestinales son un subgrupo dentro de los CD4⁺ helper necesarias para que la relación comensal que existe entre la microbiota y el huésped se mantenga. También los enterocitos envían señales para producir estas células. Las células T reguladoras producen citoquinas supresoras, las IL-10. En condiciones normales, se tiende a formar Células T reguladoras (no células Th17), por lo que se da la mínima inflamación de la pared intestinal. Sin las células T reguladoras, otras células T se activarían contra la microbiota produciendo inflamación. Es por tanto la producción de IL-10 por las células T reguladoras lo que suprime la inflamación (Tizard and Jones, 2018).

El sistema inmune tiene que estar preparado para poder llevar a cabo una respuesta inflamatoria en caso de infección y esta respuesta está mediada por las células Th17 que son proinflamatorias y son también un subgrupo de las CD4⁺. Si se estimula a las T helper con IL-23 (que se produce por los macrófagos cuando se produce contacto de bacterias –bacterias filamentosas segmentadas– con los enterocitos) (Schnupf *et al.*, 2015) se producen las células Th17, que a su vez son capaces de producir IL-17 y IL-22 (Figura 5).

Las bacterias filamentosas segmentadas son un grupo de bacterias comensales Gram positivas que encontramos en el intestino de los mamíferos y que estimulan la regulación del sistema inmune innato del huésped ya que tienen contacto con las células dendríticas del intestino, promueve el desarrollo de los centros germinales de las placas de Peyer y otros órganos linfoides, así como incrementan la producción de IgA y de células Th17 (Tizard and Jones, 2018).

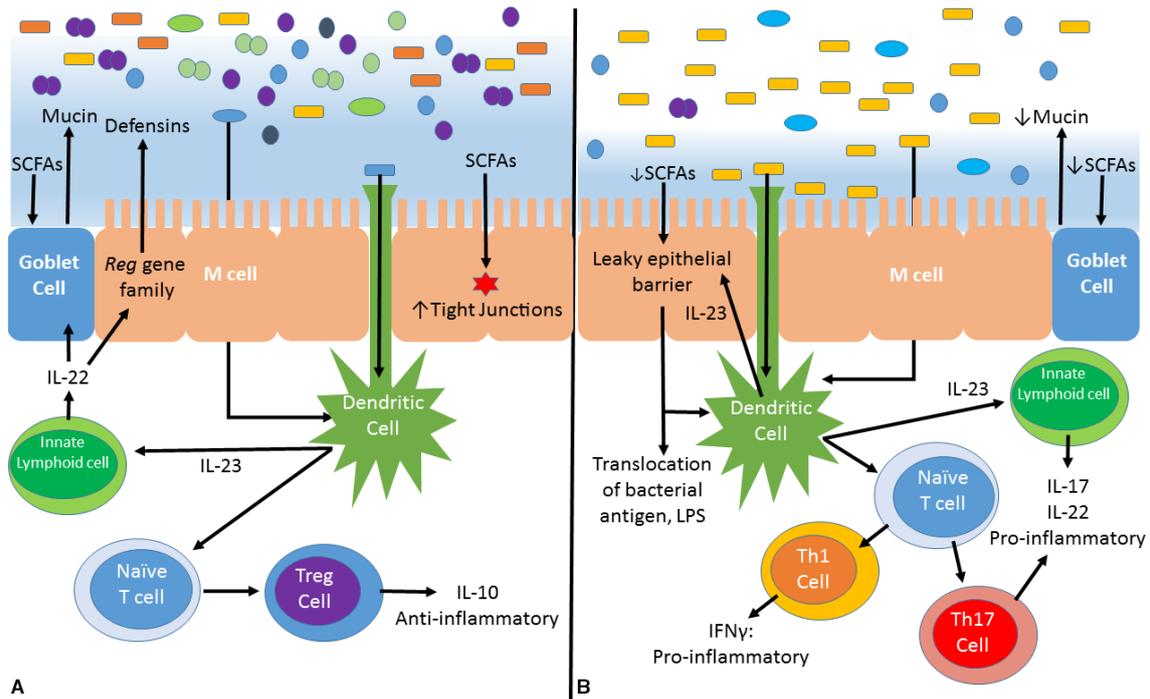


Figura 5. Balance entre las respuestas inmunosupresoras y antiinflamatorias en la mucosa intestinal (Barko *et al.*, 2018)

5.5 ¿Qué es la disbiosis? ¿Cómo afecta al huésped?

Cuando hay una alteración de la microbiota (desequilibrio), se produce lo que denominamos disbiosis. Actualmente ya existe un método para cuantificar la disbiosis. Se denomina Índice de disbiosis y fue creado por el *College of Veterinary Medicine Gastrointestinal Laboratory* y se basa en una prueba PCR que cuantifica 8 grupos de bacterias que habitualmente se encuentran en la microbiota de perros y gatos. Su valor nos indica el grado de disbiosis. Ya se han relacionado índices de disbiosis altos con patologías como enteropatías crónicas, disbiosis producidas por antibióticos o en insuficiencia pancreática exocrina (Tizard and Jones, 2018).

En los últimos años se está empezando a relacionar enfermedades como la diabetes, la insuficiencia renal o la obesidad con la alteración de la microbiota. Varios estudios han llegado a la conclusión de que la microbiota de perros y gatos obesos es diferente a la de los sanos (Wernimont *et al.*, 2020).

En un estudio donde se cuantificó y comparó la microbiota intestinal de perros sanos y con patologías digestivas (especialmente enteropatías crónicas e insuficiencia pancreática exocrina) mediante la medición de lactato y los ácidos biliares fecales, así como el índice de disbiosis; se determinó que, en las enteropatías crónicas, aunque no había una variación de los grupos bacterianos más importantes, el índice de disbiosis solía ser diferente de 0. Sin embargo, en la insuficiencia pancreática exocrina, se dan las mayores alteraciones en la microbiota por sus cambios en el índice de disbiosis y por el aumento significativo del ácido láctico producido por las bacterias. Los perros con patologías suelen tener un nivel de ácidos biliares menor que los animales sanos (Blake *et al.*, 2019).

5.6 Efectos de los antibióticos sobre la microbiota intestinal

Los antibióticos se utilizan de manera diaria en la clínica de perros y gatos para el tratamiento de patologías intestinales agudas y crónicas, sobre todo cuando existe diarrea. Pero los antimicrobianos pueden quebrantar el equilibrio de la microbiota por un tiempo prolongado. El Metronidazol es de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de diarreas por su efectividad frente a *Giardia* o *Clostridium perfringens* (Pilla *et al.*, 2020).

En un reciente estudio, se ha observado que tras la administración de Metronidazol, se observa un descenso significativo de la diversidad de la microbiota y un descenso significativo del número de Fusobacterias que tarda hasta 4 semanas en recuperarse. Además el índice de disbiosis aumenta de manera significativa (Pilla *et al.*, 2020).

El metronidazol es un antibiótico que funciona de manera selectiva frente a bacterias anaerobias (la mayoría de las bacterias de la microbiota lo son). Por eso su administración repercute de manera significativa en la cantidad de bacterias anaerobias de los filos Bacteroidetes y Fusobacterias, mientras que se aprecia un aumento de los filos Actinobacterias y Proteobacterias (Igarashi *et al.*, 2014). Se observa también un descenso del orden de los Clostridiales, mientras se da un aumento del orden Lactobacillales, formado por bacterias aerobias y anaerobias facultativas que producen ácido láctico. El aumento de este grupo de bacterias está relacionado con el aumento del lactato fecal, que en otros estudios se ha relacionado con enteropatías e insuficiencia pancreática exocrina (Pilla *et al.*, 2020).

También afecta a la producción de ácidos grasos de cadena corta, ya que se ve disminuida tras la administración de antibiótico. Especialmente el butirato, que es producido en su mayoría por bacterias del filo Firmicutes y que es esencial como forma de energía para las células epiteliales intestinales. La alteración del metabolismo de los ácidos biliares también se ha relacionado con la administración de antibióticos (Pilla *et al.*, 2020).

En otro estudio sobre los efectos a largo plazo de la administración de Tilosina en perros sanos se observa un descenso en la diversidad de la microbiota, así como alteraciones de la misma tras la administración del antibiótico, pero sin diarrea. Por otro lado, sí se ve afectado el metabolismo de los ácidos biliares y la cantidad de *C. hiranonis*, que es una bacteria capaz de llevar a cabo la deshidroxilación de los ácidos biliares (Manchester *et al.*, 2019).

5.7 Efectos sobre la microbiota de los probióticos

El uso de antibióticos que se usan de manera cotidiana para el tratamiento de ciertas enfermedades produce la disminución de las bacterias beneficiosas de la microbiota mientras al mismo tiempo puede aumentar las posiblemente patógenas. Estos efectos pueden alargarse en el tiempo en la microbiota. Es este el escenario sobre el cual, el uso de probióticos para mantener o reestablecer la salud de la microbiota, puede suponer

una manera de ayudar a promover la salud en nuestros perros y gatos (Grześkowiak *et al.*, 2015).

Denominamos probióticos al conjunto de microorganismos vivos que administrados en la cantidad correcta tienen un efecto beneficioso en la salud del huésped, por medio de su efecto sobre la microbiota intestinal. Algunos posibles efectos beneficiosos sobre la salud de perros y gatos serían la modulación del sistema inmune, protección frente a infecciones, control de procesos alérgicos o la obesidad (Figura 6). La mayoría de estos microorganismos son bacterias ácido lácticas y las pertenecientes al grupo de las bifidobacterias encontradas en la microbiota de humanos. En perros se piensa que una posible bacteria probiótica sea *Lactobacillus fermentatum* AD1 (Grześkowiak *et al.*, 2015).

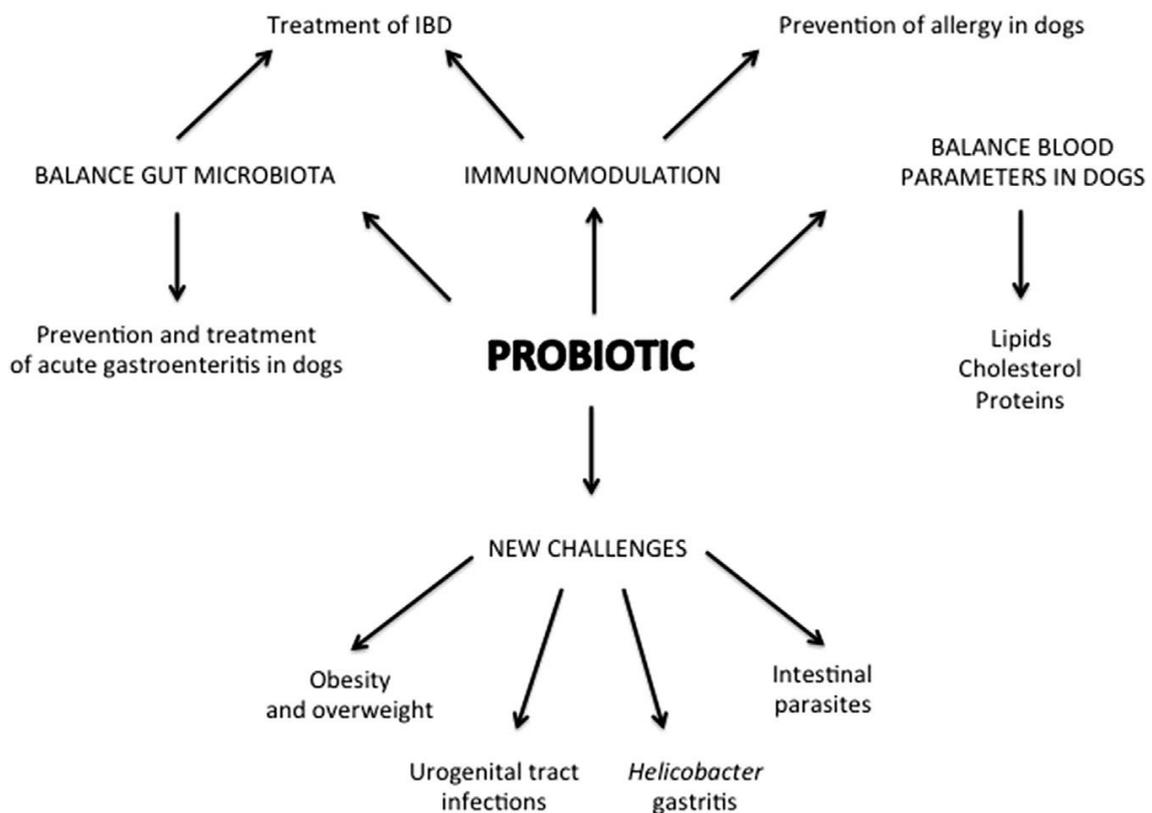


Figura 6. Posibles beneficios de la administración de probióticos en la salud de perros y gatos.

En un estudio sobre los efectos de la administración de probióticos por vía oral se ha observado que, tras la administración de éstos, los síntomas de diarrea son menores en

los perros tratados que en los del grupo control. Y que, tras 15 días de la administración, en este grupo, la tasa de diarrea sigue siendo menor. De este modo, estos resultados reflejan que la administración de probióticos puede aliviar los síntomas de la diarrea. En ese mismo estudio también se demuestra que la administración de probióticos promueve la ingesta de alimento y la ganancia de peso. Así como una mejor respuesta inmune, pues se observan mayores niveles de IgG en suero e IgA en muestras fecales. En cuanto a la modificación de la composición de la microbiota intestinal, comparados con el grupo de control, los perros a los que se les ofrecieron probióticos presentan mayor número de *Bacteroides* y *Faecalibacterium* y menor de *Clostridium*, *Flavonifractor*, *Oscillibacter* y *Bautia* (Xu, Huang, et al., 2019).

Otros estudios ya han demostrado que los probióticos pueden mejorar la salud del huésped por medio de la regulación de la microbiota intestinal (Walker, 2008). En recientes estudios se ha demostrado que los perros tratados con probióticos tienen un aumento significativo de la diversidad de la microbiota intestinal, mostrando niveles superiores de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* respecto al grupo control. En este mismo estudio, también se analizaron los cambios que se daban en el microbioma, y aunque los cambios en éste han sido menos notables que en la diversidad, si se ha visto que la diversidad de genes funcionales aumentan con la administración de probióticos (Xu, Zhao, et al., 2019).

Una forma de administrar probióticos de forma cotidiana y fácil para los propietarios puede ser la administración de kéfir. El kéfir es un producto lácteo, un fermento de la leche, que contiene más de 50 especies de microorganismos, donde se incluyen bacterias ácido-lácticas, levaduras y bacterias ácido-acéticas (Guzel-Seydim et al., 2011). En un estudio llevado a cabo sobre los beneficios de la administración de kéfir en perros, se concluyó que tras la administración de kéfir durante 2 semanas se pudo modular la microbiota intestinal de perros adultos sanos sin que estos presentaran efectos adversos (Kim et al., 2019).

Así mismo en otro estudio en el cual se medía la efectividad de la administración de *Lactobacillus Fermentum* en perros, se observó una mejora de las funciones

inmunitarias del intestino en los perros a los que se les administró (Strompfová, Lauková and Gancarčíková, 2012).

La microbiota intestinal supone un amplio tema de estudio con alto interés por su relación con patologías sistémicas que habitualmente se ven en la clínica de perros y gatos (diabetes, obesidad, insuficiencia renal, etc). Aunque todavía queda mucho por descubrir, la relación entre una microbiota sana y un correcto funcionamiento del sistema inmune del huésped, parecen estar íntimamente relacionados. Dándonos a los veterinarios la opción de poder llevar a cabo acciones que modulen esta microbiota para poder mejorar la salud del paciente.

Así mismo, los estados de disbiosis de la microbiota parecen estar relacionados con la presencia de ciertas patologías, debido al desequilibrio que se forma en las poblaciones microbianas y sus interacciones con el huésped.

Queda evidente también, que la utilización de antibióticos de manera errónea, ya no solo supone un problema por la aparición de resistencias a los antibióticos, que supone uno de los grandes retos de la medicina moderna, sino porque además afectan de manera evidente a la población de bacterias que viven en sintonía con el huésped y que produce efectos negativos sobre su salud.

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones

- ❖ La microbiota intestinal de perros y gatos está formada en casi un 98% por bacterias, donde los filos predominantes son: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria y Proteobacteria. El orden de los Clostridiales es de los más abundantes en ambas especies.
- ❖ Las bacterias de la microbiota intestinal llevan a cabo ciertas rutas metabólicas que le permiten al huésped obtener energía y nutrientes. Se encargan de la fermentación de carbohidratos complejos a ácidos grasos de cadena corta y son capaces de transformar ácidos biliares primarios en secundarios.
- ❖ Los metabolitos que producen las bacterias de la microbiota son un medio de comunicación con el sistema inmune del huésped. El sistema inmune posee receptores capaces de reconocer patrones moleculares asociados a bacterias (MAMPs) tanto de las comensales como de las patógenas.
- ❖ Un índice de disbiosis diferente de 0 se relaciona con patologías como las enteropatías crónicas o la insuficiencia pancreática exocrina.
- ❖ Los antimicrobianos son capaces de producir la disbiosis de la microbiota, y por tanto tener efectos negativos sobre la salud del huésped.
- ❖ Se ha demostrado que el uso de probióticos ayuda a modular la microbiota y por tanto a mejorar la salud del huésped.

6.2 Conclusions

- ❖ The intestinal microbiota of dogs and cats is made up of almost 98% bacteria, where the predominant phyla are: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria and Proteobacteria. The Clostridial order is one of the most abundant in both species.
- ❖ The bacteria of the intestinal microbiota carry out certain metabolic routes that allow the host to obtain energy and nutrients. They are responsible for the fermentation of complex carbohydrates to short-chain fatty acids and are capable of transforming primary bile acids into secondary ones.

- ❖ The metabolites produced by microbiota bacteria are a means of communication with the host's immune system. The immune system possesses receptors capable of recognizing bacterial-associated molecular patterns (MAMPs) of both commensal and pathogens.
- ❖ A dysbiosis index other than 0 is related to pathologies such as chronic enteropathies or exocrine pancreatic insufficiency.
- ❖ Antimicrobials are capable of producing dysbiosis of the microbiota, and therefore have negative effects on the health of the host.
- ❖ The use of probiotics has been shown to help modulate the microbiota and therefore improve the health of the host.

7. Valoración personal

La razón por la cual decidí llevar a cabo esta revisión bibliográfica como Trabajo de Fin de Grado fue por mi incipiente interés por la microbiota intestinal tras leer algunos libros y artículos sobre la relación que había entre ciertas patologías en humana, que en principio nada tienen que ver con el tracto gastrointestinal (migrañas, enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn), con la presencia de una microbiota alterada en los individuos que la padecían. Aunque claramente perros y gatos, tienen una alimentación diferente de los humanos, supuse que estos hallazgos serían similares en las dos especies de animales domésticos y quería saber más al respecto.

Al realizar este trabajo he descubierto, no solo que al contrario de lo que pensaba la microbiota de los perros parece ser muy similar a la de los humanos en cuanto a la variedad de bacterias que contienen, sino que esa relación entre la población de microorganismos que puebla el intestino supone un importante órgano del huésped. Su equilibrio, su correcto funcionamiento y su relación con el sistema inmune del huésped (tanto a través de la respuesta innata como de la respuesta adaptativa y como consecuencia las células que los componen) suponen, no solo que el huésped es beneficiario de rutas metabólicas que de otro modo sería imposible que disfrutase, sino que afecta al funcionamiento de todo el sistema inmune, incluso en tejidos que se encuentran alejados del tracto gastrointestinal.

Creo que, a mi juicio, el entendimiento de que esa población de microorganismos puede ayudarnos es clave en nuestro ejercicio como clínicos, siendo uno de los factores a tener en cuenta en ciertas patologías y que además se ve afectado por el uso de antibióticos con efectos negativos, y el uso de probióticos con efectos positivos.

Espero que en los próximos años el estudio de la microbiota intestinal de los animales domésticos siga en aumento, porque creo que supondrá grandes avances en la explicación de ciertas patologías que hasta el momento no tienen una explicación concreta.

Por último me gustaría agradecer a mi directora, Cristina Acín, su paciencia y ayuda en la realización de este trabajo y a mi familia y amigos por el apoyo que me han dado, no solo en la realización de este trabajo, sino a lo largo de mi paso por este graduado.

8. Bibliografía

1. Alessandri, G., Argentini, C., *et al.* (2020) 'Catching a glimpse of the bacterial gut community of companion animals: a canine and feline perspective', *Microbial Biotechnology*, 13(6), pp. 1708–1732. doi:10.1111/1751-7915.13656.
2. Alessandri, G., Milani, C., *et al.* (2020) 'Deciphering the Bifidobacterial Populations within the Canine and Feline Gut Microbiota', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by A.J. McBain, 86(7). doi:10.1128/AEM.02875-19.
3. Barko, P.C. *et al.* (2018) 'The Gastrointestinal Microbiome: A Review', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), pp. 9–25. doi:10.1111/jvim.14875.
4. Belkaid, Y. and Hand, T.W. (2014) 'Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation', *Cell*, 157(1), pp. 121–141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011.

5. Blake, A.B. *et al.* (2019) 'Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease', *PLOS ONE*. Edited by C. Staley, 14(10), p. e0224454. doi:10.1371/journal.pone.0224454.
6. Blake, A.B. and Suchodolski, J.S. (2016) 'Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats', *Animal Frontiers*, 6(3), pp. 37–42. doi:10.2527/af.2016-0032.
7. Deng, P. and Swanson, K.S. (2015) 'Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges', *British Journal of Nutrition*, 113(S1), pp. S6–S17. doi:10.1017/S0007114514002943.
8. Donaldson, G.P., Lee, S.M. and Mazmanian, S.K. (2016) 'Gut biogeography of the bacterial microbiota', *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), pp. 20–32. doi:10.1038/nrmicro3552.
9. Eissa, N. *et al.* (2019) 'Mucosal immunity and gut microbiota in dogs with chronic enteropathy', *Research in Veterinary Science*, 122, pp. 156–164. doi:10.1016/j.rvsc.2018.11.019.
10. Garcia-Mazcorro, J. and Minamoto, Y. (2013) 'Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review', *Archivos de medicina veterinaria*, 45(2), pp. 111–124. doi:10.4067/S0301-732X2013000200002.
11. Giaretta, P.R. *et al.* (2020) 'Bacterial Biogeography of the Colon in Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy', *Veterinary Pathology*, 57(2), pp. 258–265. doi:10.1177/0300985819891259.
12. Grześkowiak, Ł. *et al.* (2015) 'Microbiota and probiotics in canine and feline welfare', *Anaerobe*, 34, pp. 14–23. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.04.002.
13. Guzel-Seydim, Z.B. *et al.* (2011) 'Review: Functional Properties of Kefir', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), pp. 261–268. doi:10.1080/10408390903579029.

14. Honneffer JB, Minamoto Y, Suchodolski JS. (2014) 'Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs'. *World Journal of Gastroenterology*. 28;20(44), pp. 16489-97. doi: 10.3748/wjg.v20.i44.16489. PMID: 25469017; PMCID: PMC4248192.
15. Honneffer, J.B. *et al.* (2017) 'Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract', *Metabolomics*, 13(3), p. 26. doi:10.1007/s11306-017-1165-3.
16. Huang, Z. *et al.* (2020) 'The canine gastrointestinal microbiota: early studies and research frontiers', *Gut Microbes*, 11(4), pp. 635–654. doi:10.1080/19490976.2019.1704142.
17. Igarashi, H. *et al.* (2014) 'Effect of Oral Administration of Metronidazole or Prednisolone on Fecal Microbiota in Dogs', *PLoS ONE*. Edited by B.A. White, 9(9), p. e107909. doi:10.1371/journal.pone.0107909.
18. Kamada, N. *et al.* (2013) 'Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease', *Nature Reviews Immunology*, 13(5), pp. 321–335. doi:10.1038/nri3430.
19. Kim, D.-H. *et al.* (2019) 'Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product', *Journal of Dairy Science*, 102(5), pp. 3903–3911. doi:10.3168/jds.2018-15639.
20. Kubinyi, E. *et al.* (2020) 'Gut Microbiome Composition is Associated with Age and Memory Performance in Pet Dogs', *Animals*, 10(9), p. 1488. doi:10.3390/ani10091488.
21. Manchester, A.C. *et al.* (2019) 'Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(6), pp. 2605–2617. doi:10.1111/jvim.15635.
22. Mondo, E. *et al.* (2019) 'Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases', *Open Veterinary Journal*, 9(3), p. 253. doi:10.4314/ovj.v9i3.10.

23. Ohnmacht, C. *et al.* (2015) 'The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t⁺ T cells', *Science*, 349(6251), pp. 989–993. doi:10.1126/science.aac4263.
24. Pereira, A.M. and Clemente, A. (2021) 'Dogs' Microbiome From Tip to Toe', *Topics in Companion Animal Medicine*, 45, p. 100584. doi:10.1016/j.tcam.2021.100584.
25. Pilla, R. *et al.* (2020) 'Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(5), pp. 1853–1866. doi:10.1111/jvim.15871.
26. Ritchie, L.E., Steiner, J.M. and Suchodolski, J.S. (2008) 'Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis: Intestinal microbial communities in healthy cats', *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), pp. 590–598. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00609.x.
27. Schmitz, S. and Suchodolski, J. (2016) 'Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence?', *Veterinary Medicine and Science*, 2(2), pp. 71–94. doi:10.1002/vms3.17.
28. Schnupf, P. *et al.* (2015) 'Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro', *Nature*, 520(7545), pp. 99–103. doi:10.1038/nature14027.
29. Shreiner, A.B., Kao, J.Y. and Young, V.B. (2015) 'The gut microbiome in health and in disease', *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), pp. 69–75. doi:10.1097/MOG.000000000000139.
30. Stropfová, V., Lauková, A. and Gancarčíková, S. (2012) 'Effectivity of freeze-dried form of *Lactobacillus fermentum* AD1-CCM7421 in dogs', *Folia Microbiologica*, 57(4), pp. 347–350. doi:10.1007/s12223-012-0139-0.
31. Suchodolski, J.S. (2021) 'Analysis of the gut microbiome in dogs and cats', *Veterinary Clinical Pathology*, p. vcp.13031. doi:10.1111/vcp.13031.

32. Suchodolski, J.S., Camacho, J. and Steiner, J.M. (2008) 'Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis: Molecular analysis of canine intestinal microbial community', *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), pp. 567–578. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x.
33. Swanson, K.S. *et al.* (2011) 'Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice', *The ISME Journal*, 5(4), pp. 639–649. doi:10.1038/ismej.2010.162.
34. Tizard, I.R. and Jones, S.W. (2018) 'The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats', *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48(2), pp. 307–322. doi:10.1016/j.cvsm.2017.10.008.
35. Tomkovich, S. and Jobin, C. (2016) 'Microbiota and host immune responses: a love-hate relationship', *Immunology*, 147(1), pp. 1–10. doi:10.1111/imm.12538.
36. Walker, W.A. (2008) 'Mechanisms of Action of Probiotics', *Clinical Infectious Diseases*, 46(s2), pp. S87–S91. doi:10.1086/523335.
37. Wernimont, S.M. *et al.* (2020) 'The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease', *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 1266. doi:10.3389/fmicb.2020.01266.
38. Wong, J.M.W. *et al.* (2006) 'Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), pp. 235–243. doi:10.1097/00004836-200603000-00015.
39. Xu, H., Zhao, F., *et al.* (2019) 'Metagenomic analysis revealed beneficial effects of probiotics in improving the composition and function of the gut microbiota in dogs with diarrhoea', *Food & Function*, 10(5), pp. 2618–2629. doi:10.1039/C9FO00087A.
40. Xu, H., Huang, W., *et al.* (2019) 'Oral Administration of Compound Probiotics Improved Canine Feed Intake, Weight Gain, Immunity and Intestinal

Microbiota', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 666.

doi:10.3389/fimmu.2019.00666.