



ANA FLÁVIA CHIZZOTTI

**NÍVEIS DE MANANOPROTEÍNA SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, IMUNIDADE E
MICROBIOTA FECAL DE CÃES ADULTOS**

LAVRAS – MG

2012

ANA FLAVIACHIZZOTTI

**NÍVEIS CRESCENTES DE MANANOPROTEÍNA SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, IMUNIDADE E MICROBIOTA DE CÃES
ADULTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad

Coorientadores

Dr. Christian Hirsch

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Chizzotti, Ana Flávia.

Níveis de manano proteína sobre a digestibilidade, imunidade e microbiota fecal de cães adultos / Ana Flávia Chizzotti. – Lavras : UFLA, 2012.

90 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Flávia Maria de Oliveira Borges Saad.

Bibliografia.

1. Levedura. 2. Parede celular. 3. Bactéria ácido-lático. 4. Imunonutrientes. 5. Nutracêuticos. 6. Caninos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.70855

ANA FLAVIACHIZZOTTI

**NÍVEIS CRESCENTES DE MANANOPROTEÍNA SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, IMUNIDADE E MICROBIOTA DE CÃES
ADULTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2012.

Dr. Márcio Antônio Brunetto Unesp/Pirassununga

Dra. Janine França UFU

Dra. Priscila Vieira e Rosa UFLA

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad
Orientadora

LAVRAS – MG

2012

AGRADECIMENTOS

A minha família, que é a base da minha vida, agradeço pelo apoio, incentivo e ensinamentos preciosos. Tenho vocês como meus eternos heróis.

Aos meus irmãos pela amizade, disposição em ajudar, carinho e grandes exemplos.

Ao meu padrinho pela constante preocupação e cuidados e aos meus tios que me ensinaram a importância de uma família unida.

Aos meus sobrinhos por encherem meu coração de alegria e minha afilhada por ser o anjo da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de expandir meu conhecimento.

A minha orientadora, Prof^a. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad, pela orientação de anos de trabalho em conjunto, pelos ensinamentos que foram muito além dos dados em sala de aula.

Aos membros da banca Prof^a. Priscila Viera e Rosa, Prof^a. Janine França e Prof. Márcio Antônio Brunetto pelo importante apoio na melhoria deste trabalho.

Aos Professores Carlos Eduardo Saad e Roberto Maciel de Oliveira, que fizeram parte da banca de qualificação pela colaboração na realização deste trabalho e em minha formação profissional.

À Professora Roberta e à Eliana do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela disponibilidade e atenção. Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, pela convivência harmoniosa e conhecimentos compartilhados.

Ao PET Zootecnia, que em muito contribuiu para a minha formação tanto profissional, quanto cidadã e proporcionou-me fazer amigos tão especiais.

Ao Núcleo de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia (NENAC), por todos os anos de aprendizado. Aos integrantes que fizeram este trabalho se tornar realidade e pela amizade e companheiros em todas as horas, agradeço Karen, Taís, Michel, Vanessa, Lívia, Matheus, Sabine muito obrigada e em especial as minhas amigas Rosana, Jéssica e Fernanda por anos de trabalho em conjunto e risadas compartilhadas.

À Jam que acompanhou toda minha jornada como amiga, conselheira e grande exemplo de pessoa e profissional.

Ao João Paulo pela amizade, paciência e ajuda nos momentos difíceis. Dri muito obrigada também, sem vocês seria quase impossível.

A todos meus amigos distantes que se fizeram presentes e aos presentes que fizeram com esses anos se tornassem especiais, levarei essas amizades para sempre na minha vida, Paulo Carvalho e Simoni Botega vocês foram essenciais.

A Deus, por conceder-me força e discernimento para continuar nas horas difíceis e mostrar-me o caminho certo a seguir.

“Lembre-se do poder das palavras. Quem escreve constrói um castelo, e quem lê passa a habitá-lo.”

(Silvia Diboc)

“Difícil não é fazer o que é certo, é descobrir o que é certo fazer”.

(Robert Henry Srouer)

RESUMO GERAL

Foram estudados os efeitos da adição de diferentes níveis de mananoproteínas, fração da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sobre a sua influência na digestibilidade aparente da dieta e sobre composição da microbiota intestinal de cães adultos, através da mensuração da população de bactérias ácido-lática. Utilizou-se 24 cães adultos da raça *Beagle*, machos e fêmeas, com peso médio de $13,66 \pm 2,71$ kg. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em quatro tratamentos: dieta controle (controle) e controle mais 300, 600 e 900 ppm de frações de mananoproteína na matéria seca. O período experimental constituiu-se de doze dias para o ensaio de digestibilidade, sendo sete de adaptação e cinco de coleta, e oito dias para o ensaio microbiológico, sendo sete para adaptação e um para coleta. Os dados foram avaliados pelo Proc *GLM* do *SAS*, sendo as médias comparadas pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes não variaram com a inclusão de mananoproteínas ($p > 0,05$). A inclusão de mananoproteínas não resultou em diferenças quanto às contagens de bactérias do ácido lático ($p > 0,05$). Não foi possível verificar efeito prebiótico sobre a microbiota intestinal e digestibilidade com inclusões de até 900 ppm na dieta de cães adultos, sendo necessária a realização de novos estudos comparando níveis maiores de mananoproteínas.

Palavras-chave: Parede celular de levedura. Bactéria. Ácido-lático. Caninos.

GENERAL ABSTRACT

The effects of adding different levels of manoprotein fraction of the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, about its influence on apparent digestibility of the diet and on composition of intestinal microflora of adult dogs by measuring the population of lactic acid bacteria. We used 24 adult beagle dogs, male and female, with average weight of 13.66 ± 2.71 kg. The animals were distributed in a completely randomized design with four treatments: control diet (control) and control over 300, 600 and 900 ppm mananoproteína fractions of dry matter. The experiment consisted of twelve days for the digestibility trial, seven of adaptation and five collection, and eight days for microbiological testing, seven for adaptation and one for collection. Data were analyzed by Proc GLM of SAS, and the averages compared by Tukey test ($p < 0.05$). The apparent digestibility coefficients of nutrients did not vary with the inclusion of mananoprotein ($p > 0.05$). The inclusion of mananoprotein did not result in differences in the counts of lactic acid bacteria ($p > 0.05$). Unable to verify prebiotic effect on intestinal microbiota and digestibility with inclusions of up to 900 ppm in the diet of adult dogs, necessitating further studies comparing higher levels of mananoprotein.

Keywords: Yeast cell wall, Lactic acid bacterium, Canines.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Tratamentos experimentais empregados no estudo	21
Tabela 2	Níveis de garantia da dieta comercial utilizada no estudo na Matéria Natural (MN) e na Matéria Seca (MS).....	22
Tabela 3	Coeficientes de digestibilidade aparente (%) da matéria seca (CDAMS), proteína bruta (CDAPB), matéria mineral (CDAMM) extrato etéreo em hidrólise ácida (CDAEEHA) e extrativos não nitrogenados (CDAENN) com base na matéria seca de diferentes inclusões de mananoproteína na dieta para cães	28
Tabela 4	Valores médios obtidos para energia digestível aparente (EDA), energia metabolizável aparente corrigida (EMA) na matéria seca (MS) e na matéria natural (MN) , em kcal/kg em diferentes inclusões de mananoproteína na dieta para cães	30
Tabela 5	Contagem total de bactérias ácido-láticas log/g de fezes na matéria original encontrados no estudo.....	31

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Tratamentos experimentais empregados no estudo	53
Tabela 2	Níveis de garantia expressos no rótulo da ração utilizada no estudo	54
Tabela 3	Resultados dos valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina nos quatro tempos avaliados.....	60
Tabela 4	Resultados dos valores de leucócitos, monócitos, plaquetas, linfócitos nos quatro tempos avaliados	62
Tabela 5	Resultados dos valores de imunoglobulinas A, G e M nos quatro tempos avaliados	65

Tabela 6	Resultados dos valores de fibrinogênio e PCR nos quatro tempos avaliados.....	68
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURA

AAFCO	<i>Association Of American Feed Control Officials</i>
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CDA	Coefficiente de digestibilidade aparente
CV	Coefficiente de variação
EB	Energia Bruta
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEHA	Extrato etéreo em hidrólise ácida
EM	Energia Metabolizável
ENN	Extrativos não nitrogenados
FB	Fibra bruta
FOS	Frutoligossacarídeo
IG	Intestino grosso
MM	Matéria mineral
MN	Matéria natural
MOS	Mananoligossacarídeo
MS	Matéria seca

NRC	<i>National Research Council</i>
PB	Proteína bruta
TGI	Trato gastrintestinal
TLAI	Tecido Linfoide Associado ao Intestino
UFC	Unidades formadoras de colônia
Ig A	Imunoglobulina A
Ig G	Imunoglobulina G
Ig M	Imunoglobulina M
PCL	Parede Celular de Levedura
EPL	Extrato seco da parede celular de levedura
Th1	Resposta T <i>helper</i> tipo 1
Th2	Resposta T <i>helper</i> tipo 2
TNF - α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Introdução Geral	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Trato Gastrintestinal de cães	16
2.2	Microbiota do TGI dos cães	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Local de realização do experimento e instalações	20
3.2	Animais utilizados e tratamentos experimentais	20
3.3	Teste de digestibilidade	22
3.4	Metodologia dos cálculos	23
3.5	Análises microbiológicas	25
3.6	Análise estatística	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Coefficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes e escore fecal	28
4.2	Microbiologia fecal	31
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2	Níveis de mananoproteína sobre a imunidade humoral de cães adultos	38
1	INTRODUÇÃO	40
2	REVISÃO DE LITERATURA	42
2.1	Trato Gastrintestinal de cães	42
2.2	Funções imunes do trato gastrintestinal	43
2.3	Prebióticos	46
2.4	Mananligossacarídeos (MOS)	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1	Local de realização do experimento e instalações	52
3.2	Animais utilizados e tratamentos experimentais	52
3.3	Procedimento experimental	54
3.4	Coleta de sangue	55
3.5	Exames sorológicos para Leishmaniose	56
3.6	Dosagem de anticorpos	56
3.7	Delineamento experimental e análise estatística	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Dosagem de anticorpos	59
5	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	78

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o conceito de animais de companhia, vem se expandindo, para membros das famílias, uma vez que grande parte desses animais vive em ambiente familiar com intensa proximidade ao ser humano. Com aumento da demanda por alimentos industrializados, observa-se também maior exigência quanto à otimização do bem-estar e sobrevida desses animais.

O uso de alimentos funcionais como probióticos e prebióticos, surge de maneira estimulante, como forma de substituição a certas drogas de utilização veterinária, favorecendo a proliferação de bactérias desejáveis em detrimento de outras que não são desejadas no trato gastrointestinal desses animais.

Prebióticos são compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados por microrganismos do trato gastrointestinal (TGI). Esses compostos podem atuar beneficemente sobre a modulação da microbiota nativa, sobre o sistema imune e sobre a mucosa intestinal, melhorando os processos de digestão e absorção dos nutrientes. Porém, a adição de compostos de potencial ação prebiótica às dietas nem sempre reflete-se da mesma forma sobre a resposta biológica, o que pode estar relacionado com a composição dos ingredientes dietéticos, com a adaptação e a seletividade da microbiota ao prebiótico, ou com o nível de estresse do animal.

Os MOS atuam de maneira a modular a integridade imunológica e a microbiota intestinal, impedem que as bactérias patogênicas presentes no cólon se prendam ao epitélio intestinal uma vez que competem pelo mesmo sítio de ligação, além disto, a fermentação do MOS, no intestino dos cães pode aumentar

a população de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bactérias desejáveis no trato gastrointestinal.

A microbiota benéfica auxilia a digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminui, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (SILVA; NORBERG, 2003).

A microbiota residente é responsável pela saúde do TGI, influencia o desenvolvimento da sua microanatomia, auxilia no processo digestivo, estimula o desenvolvimento do sistema imunitário entérico e protege da invasão de agentes patogênicos. Os cães saudáveis são imunologicamente tolerantes a essa microbiota estável, e a perda de tolerância contribui para a gênese de enteropatias crônicas, como a doença inflamatória intestinal (GERMAN; ZENTEK, 2006).

Atualmente, esses compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento com o objetivo de manter o equilíbrio benéfico da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em iminente condição de estresse.

Por essa razão, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos da mananoproteína, sobre a digestibilidade e microbiota intestinal de cães adultos, por meio da quantificação da população de bactéria ácido-láticas presentes nas fezes dos mesmos, quando alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de inclusões de mananoproteína.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Trato Gastrointestinal de cães

O Trato Gastrointestinal (TGI) desempenha importante papel na proteção do organismo contra infecções e outras doenças, por prevenir contra a invasão de patógenos, neutralizar toxinas e estimular a resposta imunológica local (OLIVEIRA; BATISTA, 2010).

O intestino é o maior órgão imunológico do corpo, pois constitui cerca de 60 a 70% de todo o sistema linfóide, com os tecidos linfóides, associado à mucosa intestinal (TLAI) que promove a imunidade local e sistêmica ativa e induz a tolerância imunológica da mucosa. O baixo pH do estômago (pH = 1 a 4) destrói os microrganismos mais prejudiciais, enquanto outros são eliminados pelas enzimas digestivas do estômago e intestino. A rápida taxa de trânsito também protege contra a colonização de patógenos (BELOSHARPA; SWANSON, 2010).

A saúde do TGI é muitas vezes mensurada indiretamente pelo tipo de população microbiana, volume das fezes e sua consistência, componentes do odor fecal e os índices relacionados ao sistema imunológico. Estratégias alimentares são usadas para melhorar ou manter a saúde intestinal como: fibras dietéticas, prebióticos e probióticos (FAHEY, 2004).

A entrada de microrganismos nas células epiteliais resulta na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a resposta à invasão bacteriana ativa sinais intracelulares que levam à iniciação e à amplificação de uma resposta inflamatória aguda. Para manter a integridade da função dessa barreira celular, as superfícies das mucosas são providas com uma resposta inata e adaptativa, a qual tem como componente o tecido linfóide associado à mucosa intestinal.

2.2 Microbiota do TGI dos cães

O intestino delgado dos cães possui uma população microbiana simples, onde no duodeno e jejuno encontram-se, predominantemente, *Streptococcus* e *Lactobacillus* e, no íleo, *Escherichia coli* e bactérias anaeróbias. A baixa densidade de microrganismos é resultado, principalmente, da influência da acidez gástrica, da bile, temperatura e peristaltismo que proporcionam um ambiente desfavorável a proliferação dos microrganismos. Patterson e Burkholder (2003) descreveram que espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são sensíveis ao estresse do hospedeiro, já que essas populações tendem a diminuir em aves nessas condições.

A superfície da mucosa dos animais são colonizadas por diversos microrganismos, a densidade das bactérias presentes no IG pode alcançar 10^{10} por grama de fezes (VANHOUTTE et al., 2005) sendo composta principalmente por *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium*. A colonização da mucosa intestinal inicia-se com o fornecimento do colostro e leite materno. A dieta, a exposição a microrganismo e o ambiente contribuem para a formação e estabelecimento da microbiota intestinal. A nutrição modula as mudanças na composição da microbiota, incluindo o estabelecimento ou prevenção de doenças digestivas (FERNANDES et al., 2012).

O epitélio intestinal apresenta altas taxas de multiplicação e renovação, podendo acontecer a cada três dias o *turnover* celular no ID, logo a grande importância do fornecimento de nutrientes para o intestino. Essas células usam 10 a 20% do gasto total de energia do corpo e utilizam até 50% do *turnover* proteico corporal de alguns aminoácidos essenciais (LAFLAMME, 2008). Além disso, o uso de aminoácidos da dieta pelo ID pode ter efeito substancial sobre a disponibilidade sistêmica dos aminoácidos essenciais.

Grande parte da nutrição da mucosa intestinal ocorre através do lúmen intestinal e/ou pelo fluxo sanguíneo. A absorção de nutrientes direta pelo lúmen intestinal corresponde a 50% das necessidades energéticas dos enterócitos e 70% das necessidades energéticas dos colonócitos, sendo o restante suprido pela corrente circulatória (BRUNETTO, 2009). A nutrição tem assim, impacto significativo no TGI de animais saudáveis e doentes, com especial importância para a função do intestino e do sistema imunitário associado à mucosa do TGI. A entrada de nutrientes do lúmen intestinal permite a nutrição das próprias células intestinais e a presença desses nutrientes é um estímulo trófico para a mucosa intestinal, permitindo maiores taxas de replicação e diferenciação celular, com formação de membrana mucosa mais espessa e resistente, maior capacidade de absorção de nutrientes e defesa contra a penetração de antígenos, também mantém a integridade da mucosa ao evitar a atrofia do intestino, o comprometimento imune e a translocação bacteriana (BRUNETTO, 2009).

Os microrganismos presentes no TGI mantem relações simbióticas ou antagonicas, nutrindo-se dos componentes de alimentos não digeridos e das secreções do trato gastrointestinal (TESHIMA, 2003). Podem encontrar-se tanto associadas intimamente com o epitélio, como livres na luz intestinal (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004).

Em condições normais, essas populações encontram-se em equilíbrio. Em condições de estresse como mudança da dieta, alterações climáticas, uso contínuo de antibioterapia ou qualquer outra situação desfavorável, as populações comensais tendem a diminuir e as nocivas a proliferar, ocorrendo o desequilíbrio das bactérias, processo denominado disbiose, e reflete-se negativamente na saúde do animal (GOMES, 2009; SILVA; NORNBORG, 2003).

Alguns autores mostram que a dieta é capaz de influenciar a composição da microbiota do colón. Hussein e Healy (1999) descreveram que dependendo

da fonte e da quantidade de proteína dietética, essa pode influenciar a maior concentração de patógenos, como *Clostridium*, o que tende a ocasionar diminuição da concentração fecal de *Bifidobacterium*. Conseqüentemente o escore fecal piora e a excreção de enterotoxinas do *Clostridium perfringense* outros produtos metabólicos relacionados à decomposição bacteriana de proteínas aumentam (ZENTEK et al., 2003).

As bactérias maléficas como *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonase* *Salmonella* podem causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e propiciar o aparecimento de enfermidades (NUNES, 2009).

A partir dos recentes avanços na biologia genômica, a microbiota intestinal está sendo estudada e caracterizada com base no conteúdo de DNA (MIDDELBOSS et al., 2010; SWANSON et al., 2002). Com esses avanços, pretende-se aumentar o conhecimento da filogenia e metabolismo da microbiota intestinal, com a esperança de proporcionar uma melhor descrição e compreensão de estados de doença e como prevenir ou tratá-las através de intervenção nutricional (BELOSHARPA; SWANSON, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do experimento e instalações

A realização do experimento teve a aprovação da Comissão de Bioética na Utilização de Animais (NINTEC / PRP-UFLA), da Universidade Federal de Lavras, protocolo nº 070/2011 (Anexo B).

O experimento foi conduzido no período de novembro a dezembro de 2010, no CENAC (Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia), do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, região Sul do Estado de Minas Gerais, latitude 21°14'30'' (S), longitude 45°00'10'' (O) e 910 metros de altitude.

O Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia possui vinte e quatro canis e gaiolas metabólicas, onde são alojados 24 cães da raça *Beagle*. Os canis apresentam a área de 4,5m² (1,5 m de largura x 3,0 m de comprimento) com área de solário, comedouros e bebedouros automáticos individuais. As gaiolas metabólicas com dimensão de 70cm x 85cm x 70cm (altura x profundidade x largura), são constituídas de arame galvanizado e chapas metálicas nas laterais, além da bandeja coletora para fezes com fundo telado que permite a coleta da urina sem contaminação fecal.

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Animais utilizados e tratamentos experimentais

Foram utilizados 24 cães adultos, machos e fêmeas, da raça *Beagle*, com idade média de 6,5 (\pm 3,5) anos, vermifugados, com peso médio de 13,66 \pm 2,70

kg. Os cães selecionados passaram por exame clínico antes e durante a realização do teste.

Para a alimentação dos animais utilizou-se um alimento comercial seco isento de prebióticos utilizado como controle. O estudo proposto foi constituído por quatro tratamentos como representado na Tabela 1, totalizando seis repetições por tratamento.

Tabela 1 Tratamentos experimentais empregados no estudo

Tratamentos	Alimentos
T 1	dieta controle (ração seca extrusada)
T 2	dieta controle + mananoproteínas na dose de 300 ppm
T 3	dieta controle + mananoproteínas na dose de 600 ppm
T 4	dieta controle + mananoproteínas na dose de 900 ppm

As diferentes doses do produto foram ministradas aos animais em forma de cápsulas, juntamente com um alimento comercial, cujos níveis de garantia do rótulo encontram-se na Tabela 2. No tratamento 1, os animais receberam cápsulas de placebo durante o período experimental.

Tabela 2 Níveis de garantia da dieta comercial utilizada no estudo na Matéria Natural (MN) e na Matéria Seca (MS)

Níveis de Garantia	MN	MS
Umidade (max.)	12,0%	8,02%
Proteína Bruta (mín.)	22,0%	25,83%
Extrato Etéreo (mín.)	10,0%	7,70%
Matéria Fibrosa (max.)	5,0%	2,88%
Matéria Mineral (max.)	9,0%	14,88%
Cálcio (max.)	2,4%	
Fósforo (mín.)	0,9%	
Energia Metabolizável	3090 kcal/kg	

Composição básica: carne de frango, farelo de glúten de milho, quirera de arroz, milho integral moído, farinha de subprodutos de frango, gordura animal estabilizada com tocoferóis, farelo de milho, miúdos de aves hidrolisados, ovo em pó, óleo de peixe, L-lisina, cloreto de potássio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, cloreto de colina, taurina, DL-metionina, ácido ascórbico, sulfato de zinco, sulfato ferroso, *premix* vitamínico (A,D-3, E, B12), riboflavina, niacina, pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, biotina, momonitrato de tiamina, ácido fólico, sulfato de cobre, cloridrato de piridoxina, menadionabissulfito de sódio, iodato de cálcio, selenito de sódio.

A quantidade de ração fornecida a cada animal foi calculada de acordo com suas necessidades energéticas diárias de manutenção em kcal/dia de acordo National Research Council -NRC (2006), utilizando a fórmula $130 \times \text{“peso corporal”}^{0,75}$.

A quantidade total de alimento para cada animal de cada tratamento foi fornecida uma vez ao dia durante um período de 24 horas. As sobras foram coletadas diariamente e pesadas para a determinação do consumo.

3.3 Teste de digestibilidade

O ensaio de digestibilidade foi realizado seguindo as recomendações da Association of American Feed Control Officials - AAFCO (2007), com coleta

total de fezes e urina. Os animais passaram por um período de sete dias de adaptação e cinco dias de coleta. Para tal procedimento, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas com o fornecimento a vontade de água potável.

As fezes foram coletadas todos os dias pela manhã, perfazendo 24 horas, sendo então pesadas e armazenadas em sacos plásticos individuais e armazenadas em *freezer* à temperatura de -20°C. Para análises bromatológicas as fezes foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas compondo uma amostra por animal, colocadas em bandejas de alumínio, pesadas e em seguida colocadas em estufa de ventilação forçada (65°C) por um período de 72 horas. As amostras foram pesadas, para a determinação da matéria pré-seca e moídas em moinho com malha de 1mm e acondicionadas em potes plásticos previamente identificados para posteriores análises.

Foram determinados os coeficientes de digestibilidade aparente (%) da matéria seca (CDAMS), proteína bruta (CDAPB), extrato etéreo (CDAEE), matéria mineral (CDAMM), energia digestível (ED) e energia metabolizável corrigida (EM) em kcal/kg, dos tratamentos experimentais. As análises bromatológicas foram realizadas de acordo com metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1995).

A energia bruta foi determinada com bomba calorimétrica adiabática da marca *Parr Instrument* (Illinois, EUA), o conteúdo de nitrogênio foi determinado, usando o método Kjeldahl, o extrato etéreo por hidrólise ácida, segundo a AOAC (1995) e as demais análises foram realizadas de acordo com a metodologia de Silva e Queiroz (2002).

3.4 Metodologia dos cálculos

Os cálculos utilizados para a obtenção dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e demais nutrientes, energia digestível aparente e energia metabolizável aparente, seguiram determinações segundo a

Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação - ANFALPET (2008).

Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS)

$$\text{CDAMS (\%)} = [(a - b) / a] \times 100$$

em que:

a= consumo de alimento na matéria seca;

b= fezes excretadas na matéria seca.

Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA) dos nutrientes,

$$\text{CDA nutrientes (\%)} = \{[(a \times b) - (c \times d)] / (a \times b)\} \times 100$$

em que:

a = consumo de alimento na matéria seca;

b = % do nutriente no alimento;

c = quantidade excretada nas fezes na matéria seca;

d = % do nutriente nas fezes.

Energia Digestível Aparente na Matéria Seca (EDAMS),

$$\text{EDAMS (kcal/kg)} = (a - b) / c$$

em que:

a = consumo de energia bruta na matéria seca (kcal/g);

b = excreção de energia bruta na matéria seca (kcal/g);

c = consumo total na matéria seca (g).

Energia Metabolizável Aparente na Matéria Seca (EMAMS),

$$\text{EMAMS (kcal/g)} = \frac{(a \times b) - [(d \times c) + (e \times f)]}{a}$$

em que:

a = consumo total da ração na matéria seca (g);

b = energia bruta da ração na matéria seca (kcal/g);

c = energia bruta das fezes na matéria seca (kcal/g);

d = excreção fecal total na matéria seca (g);

e = energia bruta da urina (kcal/mL);

f = volume de urina (mL).

3.5 Análises microbiológicas

O ensaio microbiológico foi realizado em um período experimental de oito dias, sendo sete dias de adaptação à dieta e um dia de coleta de fezes. A necessidade energética de manutenção e fornecimento dos tratamentos foi realizada seguindo o protocolo para o ensaio de digestibilidade. Os parâmetros avaliados foram contagem das bactérias lácticas que incluem bactérias do ácido-lácticos sendo expressa por \log_{10} UFC/g fezes.

As análises microbiológicas das fezes foram realizadas no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia.

Amostras de fezes frescas foram colhidas de forma asséptica, mantidas em pote coletor universal estéril, guardadas em isopor contendo gelo e levadas para procedimento analítico com no máximo 30 minutos após sua coleta, de forma a se manter a viabilidade dos microrganismos presentes.

As amostras fecais foram homogeneizadas, pesadas 10 gramas e diluídas em 90 mL de água peptonada 0,1% estéril. Procedeu-se diluições na ordem de 10^{-2} a 10^{-11} em tubo de ensaio contendo 9mL de água peptonada estéril para posterior plaqueamento.

Foi utilizado o meio de cultura comercial Agar Man, Rogora e Sharpe (MRS), da marca *Oxoid*® (São Paulo, Brasil). Sendo realizada a técnica de profundidade com sobrecamada, inoculando-se 1mL das diluições pré-estabelecidas, em placas contendo 16mL de meio de cultura.

As diluições foram semeadas em duplicatas em placas de *Petri* descartáveis e incubadas. As bactérias anaeróbias ácido-láticas (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) foram incubadas em jarras de anaerobiose com o sistema gerador de anaerobiose (*Anaerobac*® *Probac* do Brasil, São Paulo) a 37° C por 72 horas nas diluições de 10^{-7} a 10^{-11} . Após esse período, procede-se a contagem de todas as colônias, sendo os resultados expressos em \log_{10} de UFC/g de fezes na matéria original (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

3.6 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e seis repetições, totalizando 24 unidades experimentais.

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} é a observação referente a cada tratamento;

m é constante geral;

t_i é o efeito tratamento dos níveis;

e_{ij} são os erros aleatórios associados a cada variável;

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento *GLM (General Linear Models)* do *software Statistical Analysis System (Versão 8.2)* (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2004). Foi realizado o teste F para homogeneidade das variâncias e *Shapiro-Wilk* para a normalidade do resíduo, quando não atenderam as premissas foram então transformadas por log ou raiz quadrada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes e escore fecal

Os resultados dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS), proteína bruta (CDAPB), dos extrativos não nitrogenados (ENN) com base na matéria seca estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 Coeficientes de digestibilidade aparente (%) da matéria seca (CDAMS), proteína bruta (CDAPB), matéria mineral (CDAMM) extrato etéreo em hidrólise ácida (CDAEEHA) e extrativos não nitrogenados (CDAENN) com base na matéria seca de diferentes inclusões de mananoproteína na dieta para cães

Tratamentos	CDAMS ¹	CDAPB ¹	CDAEEHA ¹	CDAENN ¹
T0	79,15	84,14	88,70	78,68
T300	79,71	83,48	89,69	78,92
T600	76,73	81,36	86,64	75,78
T900	75,36	79,27	87,62	76,28
p	0,0812	0,0916	0,1179	0,2891
cv (%)	4,40	4,58	2,63	4,51

¹Médias seguidas de letras maiúscula distintas diferem pelo teste *Tukey* em nível nominal de significância de 5%. CV = coeficiente de variação.

Com relação ao CDA da MS e PB não houve diferença significativa ($p > 0,05$), porém observou-se tendência a diminuição da digestibilidade das mesmas com o aumento da inclusão de mananoproteína na dieta, resultados semelhantes foram observados, por Gomes (2009) onde não encontrou diferença significativa nos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da MS, PB, MO e EB ($p > 0,1$) em cães suplementados com até 0,45% de PCL. O mesmo foi observado por Aquino (2009) em seu trabalho com felinos onde não houve

diferença no CDA nos animais suplementados com extrato seco de parede de levedura (EPL).

Outros autores obtiveram resultados semelhantes, como Swanson et al. (2002), ao suplementarem 0,3% de MOS na matéria seca do alimento consumido para cães e não encontraram diferença significativa nos CDA dos nutrientes, mas observaram tendência à diminuição do coeficiente de digestibilidade ileal da CDMS, CDMO e PB, como uma possível aglutinação da proteína com o mananoligossacarídeo, por acelerar o crescimento de bactérias lácticas e diminuindo assim sua digestão.

Smiricky-Tjardes et al. (2003) suplementaram cães com oligofrutose e encontraram redução do CDA da MS, MO e EE, e tendência a redução do CDA da PB, justificado pela diminuição no tempo de trânsito intestinal, efeito como de fibras fermentáveis, e aumento da síntese celular bacteriana, conferindo um aumento da excreção fecal de nitrogênio.

Middelbos et al. (2007), empregando cinco níveis de parede de levedura (0%, 0,05%, 0,25%, 0,45% e 0,65%) na dieta para cães encontraram um efeito cúbico na digestibilidade da matéria seca (83,0%, 82,1%, 80,0%, 83,2% e 81,2%), sendo a melhor digestibilidade alcançada com a utilização de 0,45% de parede de levedura e o pior, com 0,25%. Os autores explicam que, devido à capacidade dos MOS de alterar o número de bactérias lácticas, a digestibilidade da proteína pode ser diminuída e, dessa forma, resultaria em reflexos na digestibilidade da matéria seca.

Enquanto Zentek et al. (2002), em seu estudo com cães suplementados com cerca de 1g de MOS por quilograma de peso corporal por um período de 10 dias, encontraram diminuição do CDA da MS, PB e ENN, justificando esses achados pela diminuição do tempo da taxa de passagem do alimento pela inclusão de fibras fermentáveis.

Em relação à ausência de efeito da inclusão de mananoproteína sobre os CDA dos ENN e EEHA os resultados observados estão de acordo com os encontrados na literatura. Gomes (2009) não observou diferença significativa nos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da EEHA e ENN ($p>0,1$) em cães suplementados com até 0,45% de parede celular de levedura. Aquino (2009) não observou diferença com relação ao CDEEHA em seu experimento.

Hahn et al. (2006) observaram efeitos positivos sobre a digestibilidade, sendo essa aumentada para a matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo, cálcio e fósforo.

Os resultados dos valores médios, obtidos para energia digestível aparente (EDA) e energia metabolizável aparente corrigida (EMA) na matéria seca, em kcal/kg apresentados Tabela 4.

Tabela 4 Valores médios obtidos para energia digestível aparente (EDA), energia metabolizável aparente corrigida (EMA) na matéria seca (MS) e na matéria natural (MN), em kcal/kg em diferentes inclusões de mananoproteína na dieta para cães

Tratamentos	ED MN ¹	ED MS ¹	EMA MN ¹	EMA MS ¹
T0	3353	3563	3018	3274
T300	3378	3634	2987	3249
T600	3261	3505	2809	3060
T900	3187	3464	2864	3119
p	0,0587	0,1738	0,1975	0,2252
cv (%)	3,96	4,26	6,62	6,67

¹Médias seguidas de letras maiúscula distintas diferem pelo teste *Tukey* em nível nominal de significância de 5%.

CV = coeficiente de variação

Foi observada tendência à diminuição da energia digestível na matéria natural, o que pode ser explicado pelos menores coeficientes de digestibilidade

da PB e MS observados com o aumento dos níveis de inclusão de mananoproteína, embora esses parâmetros não terem apresentado diferença significativa os mesmo podem ter influenciado a energia digestível da matéria natural.

Para os valores encontrados de energia digestível na matéria seca (ED MS) e energia metabolizável aparente (EMA) na matéria seca (MS) e natural (MN) não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Resultados semelhantes foram observados por Aquino (2009) que não observou nenhuma influencia do EPL sobre a energia digestível das dietas na matéria seca e na matéria natural, concordando com Gomes (2009) onde as dietas experimentais tiveram o mesmo coeficiente de metabolização da energia bruta.

4.2 Microbiologia fecal

A análise da população de bactérias ácido-láticas (BAL) presentes nas fezes dos animais submetidos aos tratamentos está representada na Tabela 5.

Tabela 5 Contagem total de bactérias ácido-láticas log/g de fezes na matéria original encontrados no estudo

Variável	Tratamentos (ppm de mananoproteínas)							
	0	300	600	900	CV	p*	L	Q
BAL	11,98	12,19	11,68	11,96	10,59	0,9208	NS	NS

(log/g MO)

p*: significância $p < 0,05$; CV: coeficiente de variação; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; MO: matéria original; Lac: *Lactobacillus*, Bif: *Bifidobacterium*; NS: Não significativo.

Não houve diferença significativa na população de bactérias ácido-láticas com inclusão de diferentes níveis de inclusão de mananoproteína em nível de significância de 5%.

Aquino (2009) ao comparar quatro diferentes níveis de extrato de parede de levedura (0; 0,2%; 0,4% e 0,8%) na dieta de gatos adultos não encontrou diferença significativa entre os tratamentos na mensuração da população dessas mesmas bactérias. Segundo esse autor, esses resultados levam a sugerir que os mananoligossacarídeos não foram significativamente fermentados pela população de bactérias ácido-láticas do intestino, o que conseqüentemente não causou diminuição no pH, fator importante para proliferação das mesmas e de outras bactérias desejáveis no cólon, em detrimento das bactérias indesejáveis.

Gomes (2009) também não encontrou diferença significativa na contagem de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nas fezes de cães adultos submetidos a quatro diferentes tratamentos ($P > 0,10$) com parede celular de levedura (PCL – 0; 0,15%; 0,30% e 0,45%), justificando que a ação da PCL sobre a composição da microbiota fecal de cães é controversa e, com base nos dados disponíveis, de pequena magnitude.

Esses resultados vão de acordo com os autores acima citados, considerando que 25% da constituição da PCL seja mananoligossacarídeo, concentração utilizada em estudo realizado por Gomes (2009) ficaria (0; 0,037%; 0,075%; 0,11%) de MOS, semelhantes ao presente experimento (0,03%; 0,06% e 0,09%), em ambos os trabalhos não foram observadas diferenças significativas.

Por outro lado, estudos realizados por Swanson et. al. (2002) demonstraram que a suplementação com 0,3% de MOS apresentou influência positiva sobre as populações microbianas com tendência para aumento de *Lactobacillus*. Porém, segundo o mesmo autor a população de *Bifidobacterium* manteve-se constante.

5 CONCLUSÃO

A inclusão dos níveis 300, 600 e 900 ppm de mananoproteínas na dieta de cães adultos não produziu efeito sobre a digestibilidade, bem como alterações na população de bactérias ácido-láticas. Dessa maneira, torna-se necessário a realização de estudos utilizando-se diferentes níveis do produto, uma vez que, de acordo com os resultados obtidos neste experimento, os níveis administrados não se mostraram eficazes para o aumento das bactérias benéficas intestinais.

REFERÊNCIAS

AQUINO, A. A. **Extrato seco de parede de levedura em dietas para gatos adultos**. 2009. 197f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Manual do programa integrado de qualidade pet**. São Paulo, 2008. 238 p.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **AAFCO official publication**. Atlanta, 2007. 512 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Arlington, 1995. 1018p.

BELOSHARPA, A. N.; SWANSON, K. Gastrintestinal health of dogs and cats. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, 2.; SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 9., 2010, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Alimentação Animal, 2010. p. 53-55.

BRUNETTO, M. A. Nutrição clínica: emergência e cuidados intensivos. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 14, n. 78, p. 41-46, 2009.

FAHEY, G. C. Prebiotic use by companion animals. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, San Diego, v. 228, n. 1, p. 36, 2004.

FERNANDES, P. C. C. et al. **Viabilidade do uso de prebióticos na alimentação de cães**. Disponível em: <http://www.adip.com.br/ftp/Viabilidade_do_uso_probioticos.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriu. **Anais...** Balneário Camboriu: SBZ, 2004. p.6-28.

GERMAN, A.; ZENTEK, J. The most common digestive diseases: the role of nutrition. In: _____. **Encyclopdeia of canine clinical nutrtrion**. Saint Charles: Royal Canin, 2006. p. 92-133.

GOMES, M. O. S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009.98 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

HAHN, T. W. et al. Effects of supplementation of β -glucanos on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1422-1428, June 2006.

HUSSEIN, H.S.; HEALY, H. P. In vitro fermentation characteristics of mannanoligosaccharides by dogs and cats. In: THE WALTHAM INTERNATIONAL SYMPOSIUM ABSTRACTS, 10., 2001, Bethesda. **Abstracts...** Bethesda: American Society for Nutrition, 2001. p. 80.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of body condition score system for dogs. **Canine Practices**, Canberra, v. 22, n. 1, p. 10-15, 1997.

MIDDELBOS, I. S. et al. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 3022-3032, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academies, 2006.

NUNES, E. O. F. S. **Nutrição do intestino, imunidade intestinal e resistência a parasitas do intestino em cães**. 2009. 174 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

OLIVEIRA, L. T.; BATISTA, S. M. M. **A atuação dos probióticos na resposta imunológica**. Disponível em:
<http://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=216>. Acesso em: 29jul.2010.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 4, p.627-631, 2003.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235 p.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 983-990, set./out. 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 295p.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. In vitro formation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microbiota. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2505-2514, Oct. 2003.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Version 9.1.1. Cary, 2004. Software.

SWANSON, K.S. et al. Supplemental fructooligosaccharides and mammal oligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 1, p. 980-989, May 2002.

SWANSON, K. S.; FAHEY JUNIOR, G. C. Prebiotics in companion animal nutrition. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2002. p. 461-473.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F. (Ed.). **Probióticos e prebióticos: atualização e prospecção**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p.35-60.

VANHOUTTE, T. et al. Molecular monitoring and characterization of the fecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.249, n. 1, p.65-71, 2005.

ZENTEK, J. et al. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 87, p. 397-407, 2003.

CAPÍTULO 2 Níveis de mananoproteína sobre a imunidade humoral de cães adultos

RESUMO

Nutracêuticos podem melhorar as funções do organismo, sendo alguns utilizados como imunomoduladores e esses têm demonstrado a capacidade de preservar a integridade do muco intestinal, melhora da resposta imunológica em geral, e por isso tem sido objeto de pesquisa. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de níveis crescentes de inclusão de frações de mananoproteína na dieta sobre o sistema imunológico de cães. Foram utilizados 24 cães adultos da raça *Beagle* em quatro tratamentos: dieta comercial (controle) e controle com adição de 300, 600 e 900 ppm de frações de mananoproteína na matéria seca. As dietas foram oferecidas durante 37 dias. Os animais foram expostos ao desafio antigênico, vacina contra a leptospirose no dia 7, como forma de desafio do sistema imune. As avaliações incluíram hemograma completo, quantificação de anticorpos contra a *leishmaniose*, a imunoglobulinas A, G e M concentração no sangue, plaquetas, fibrinogênio e proteína Creativa. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 10, 23 e 35 para todos os parâmetros medidos. Os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo usando PROC *GLM* do SAS 9.1. Não houve efeito dos tratamentos sobre todas as variáveis avaliadas ($P > 0,05$). Valores de leucócitos e PCR apresentaram interação no tempo, sendo esses valores aumentados com inclusões de mananoproteína acima de 600 ppm. Sugere-se que a suplementação de mananoproteína foi capaz de reduzir a resposta inflamatória.

Palavras-chave: Imunonutrientes. Nutracêuticos. Caninos.

ABSTRACT

Nutraceuticals can enhance the functions of the body, and some are used as immunomodulators and these have demonstrated the ability to preserve the integrity of the intestinal mucus, improves the immune response in general, and so has been the object of research. The aim of this study was to evaluate the effect of increasing levels of inclusion of manoprotein fractions in the diet on the immune system of dogs. We used 24 adult beagle dogs in four treatment groups: commercial diet (control) and control with the addition of 300, 600 and 900 ppm manoprotein fractions of dry matter. Diets were fed for 37 days. The animals were exposed to antigen challenge, the vaccine against leptospirosis on day 7 as a way to challenge the immune system. The evaluations included complete blood count, measurement of antibodies against leishmaniasis, immunoglobulins A, G and M concentration in the blood, platelets, fibrinogen and C-reactive protein. Blood samples were collected on days 0, 10, 23 and 35 for all parameters measured. Data were analyzed as repeated measures using PROC GLM of SAS 9.1. There was no treatment effect on all variables ($P > 0.05$). Leukocytes PCR showed interaction in time, and these values increased with inclusions manoprotein above 600 ppm. It is suggested that supplementation manoprotein was able to reduce the inflammatory response.

Keywords: Immunonutrients. Nutraceuticals. Canines.

1 INTRODUÇÃO

A membrana mucosa do sistema digestório serve como barreira protetora que auxilia na prevenção contra a invasão de patógenos, ação de toxinas e outras substâncias indesejáveis, durante a digestão e absorção de nutrientes essenciais. A complexa função de proteção é realizada tanto por meios físicos como imunológicos.

Prebióticos são descritos como imunonutrientes por contribuir com a protetora do Trato Gastrointestinal (TGI), dentre os mais estudados estão os mananoligoassacarídeos (MOS).

Os MOS são compostos derivados obtidos da parede celular da levedura *Sacharomyces cerevisiae* contendo em sua estrutura glucanos, mananos, proteínas, lipídios e quitina. Auxiliam a proteção do TGI através da adsorção de bactérias patogênicas com bloqueio dos locais de adesão de bactérias ao intestino, denominado enlace patogênico. Esse processo tem a capacidade de estimular a resposta imune contra patógenos específicos, impedem a colonização no intestino e fazem com que sejam apresentadas células imunitárias como antígenos atenuados.

O sistema imunológico, quando ativado, fornece proteção contra patógenos ou promove respostas imunes específicas, através da imunidade inata ou adaptativa. Vários tipos de células do sistema imune são recrutadas e estimuladas. Entre as células incluem-se os neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células epiteliais, célula natural *killer* e células M, essas responsáveis por recolher antígenos do lúmen intestinal e apresentar aos linfócitos nas placas de *Peyer*. Essas células monitoram os sítios de entrada de patógenos e de resposta imune inespecífica, incluindo a fagocitose e morte natural.

É relatado que a resposta imune inata em animais pode ser modulada pelo consumo de determinadas bactérias produtoras de ácido láctico. Os

prebióticos, em sua ação sobre os animais de companhia, atuam como imunomoduladores, tem efeito na regulação da resposta imune, pode estimular a produção de citocinas e, portanto, reforça a resposta imunológica natural (PERDIGON et al., 1995).

O papel dos mananoligossacarídeos (MOS) na resistência ao patógeno e na modulação do sistema imunológico não está completamente compreendido. A ligação de patógenos nas células epiteliais do intestino é um passo essencial no processo de infecção. As fímbrias tipo-1, são comumente encontradas em numerosas espécies de *Escherichia coli* e *Salmonella*, e são específicos para os resíduos de manana. As mananas ajudam na resistência da colonização de microrganismos patogênicos, atuam como receptores análogos de fímbrias tipo-1 e diminuem o número de sítios de ligação disponíveis. As mananas também têm demonstrado modular o sistema imunitário.

As mananas podem ser um agente promissor de proteção natural, devido à sua atividade antimutagênica e antioxidante. Glucomanas isoladas de *Candida utilis* produzem um efeito protetor contra a mutagenicidade induzida pela ciclofosfamida em camundongos. O trabalho realizado por esses pesquisadores sugeriu que o efeito antimutagênico dos glicomanas pode ser baseado em sua capacidade de sequestrar radicais de oxigênio reativo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de mananoproteínas sobre a imunidade inata de cães adultos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Trato Gastrointestinal de cães

O Trato Gastrointestinal (TGI) desempenha importante papel na proteção do organismo contra infecções e outras doenças, por prevenir contra a invasão de patógenos, neutralizar toxinas e estimular a resposta imunológica local (OLIVEIRA; BATISTA, 2010).

O intestino é o maior órgão imunológico do corpo, pois constitui cerca de 60 a 70% de todo o sistema linfóide, com os tecidos linfóides, associado à mucosa intestinal (TLAI) que promove a imunidade local e sistêmica ativa e induz a tolerância imunológica da mucosa. O baixo pH do estômago (pH = 1 a 4) destrói os microrganismos mais prejudiciais, enquanto outros são eliminados pelas enzimas digestivas do estômago e intestino. A rápida taxa de trânsito também protege contra a colonização de patógenos (BELOSHARPA; SWANSON, 2010).

A saúde do TGI é muitas vezes mensurada indiretamente pelo tipo de população microbiana, volume das fezes e sua consistência, componentes do odor fecal e os índices relacionados ao sistema imunológico. Estratégias alimentares são usadas para melhorar ou manter a saúde intestinal como: fibras dietéticas, prebióticos e probióticos (FAHEY, 2004).

A entrada de microrganismos nas células epiteliais resulta na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a resposta à invasão bacteriana ativa sinais intracelulares que levam à iniciação e à amplificação de uma resposta inflamatória aguda. Para manter a integridade da função dessa barreira celular, as superfícies das mucosas são providas com uma resposta inata e adaptativa, a qual tem como componente o tecido linfóide associado à mucosa intestinal.

2.2 Funções imunes do trato gastrointestinal

O TGI atua não somente como um órgão captador de nutrientes básicos, mas também é o principal órgão imunológico do corpo humano, serve como uma interface protetora entre o meio externo e o interno do organismo.

O intestino tem grande importância na defesa imunológica uma vez que é o principal meio de comunicação com meio externo e porta de entrada de antígenos.

O TLAI está diretamente envolvido com as doenças alérgicas e autoimunes. Assim, a barreira mucosa gastrointestinal tem duas funções protetoras fundamentais como a estrutural e a funcional, essa última diretamente associada ao sistema imune gastrointestinal (ROCHA, 2006).

O TLAI constitui a parte mais extensa e complexa do SI do organismo, possui em torno de 80% das células de defesa e mais de 50% das células imunitárias efetoras. Pelo menos 25% da mucosa e da submucosa intestinal são compostas por tecidos linfoides (SWANSON; FAHEY JUNIOR, 2002). O conhecimento da constituição do TLAI permite compreender como se desenvolve e regula a resposta imunitária. Essa é constituída pelas placas de *Peyer*, linfonodos mesentéricos e foliculos linfoides isolados, onde são selecionados os antígenos dietéticos e microrganismos patogênicos, uma área eferente, de tecido difuso com locais efetores que são os linfócitos intraepiteliais (IEL) e linfócitos da lâmina própria do intestino, onde a resposta imune é efetuada. Essas células imunológicas são fundamentais para a manutenção da barreira mucosa protetora (LAFLAMME, 2008).

Os componentes primários do tecido linfoide associados à mucosa intestinal são subdivididos em: células linfoides agregadas, que são as Placas de *Peyer* e não agregadas, que são caracterizadas pelos linfócitos B/T submucosos e foliculares, os intraepiteliais, plasmócitos e macrófagos (LAFLAMME, 2008).

Os linfócitos agregados e não agregados do tecido linfoide associado às mucosas intestinal são os auxiliares dos tipos Th1 (associado às respostas mediadas por células e às citocinas IL2, IFN- γ , IL12 e FNT- β); Th2 (associado a produção de anticorpos e às citocinas IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13); e Th3 (associado à imunossupressão e às citocinas IL10 e TGF- β) (ROCHA, 2006).

As células B produzem os plasmócitos, que por sua vez são responsáveis pela síntese de anticorpos, funcionam como células apresentadoras de antígenos (APC), recolhendo-os e sendo apresentados às células T, que têm várias funções dependendo do seu tipo específico. As respostas mediadas por células T são mais eficazes contra patógenos intracelulares, enquanto reações mediadas por células B são mais efetivas contra os patógenos extracelulares. Além dessas células, o contorno epitelial sobre cada placa de *Peyer* contém APC especializada, chamadas células M (células das vilosidades), que têm um papel no desenvolvimento da tolerância alimentar (TIZARD, 2002). As células M recolhem antígenos do lúmen intestinal e os apresentam aos linfócitos nas placas de *Peyer*. Isso permite ao sistema imune (SI) desenvolver reconhecimento adequado perante aquele antígeno específico, seja para desenvolver tolerância a uma proteína alimentar ou para elaborar defesa contra o organismo invasor (ROCHA, 2006).

As células B ativadas produzem as imunoglobulinas. A imunoglobulina G (IgG) é o anticorpo predominante que circula no sangue dos cães. A imunoglobulina A (IgA) é o principal e o mais importante produto sintetizado e secretado pelos plasmócitos derivados dos linfócitos B do tecido linfoide associado à mucosas intestinal, sendo a primeira linha de defesa no TGI (ROCHA, 2006). A imunoglobulina E (IgE) encontram-se sobretudo no sistema respiratório e a imunoglobulina M (IgM) é encontrada principalmente no intravascular, sendo classificados como uma classe de anticorpos "precoces", produzidas nas fases iniciais das doenças que desencadeiam resposta humoral.

Cerca de 70% a 80% das células produtoras de imunoglobulinas (Ig) estão localizadas no TGI e mais de 60% da produção total diária de IgA intestinal. Essas são secretadas através das células epiteliais para o lúmen do TGI e podem atuar tanto dentro como fora da célula intestinal (GRIESHOP, 2002).

Quando há o estímulo imunológico da mucosa ocorre a produção de IgA nas placas de *Peyer*, esses bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas no lúmen intestinal. A produção constante de IgA ocorre devido à estimulação contínua pela microbiota normal do intestino. O principal modo de ação da IgA é evitar a aderência de bactérias e vírus às superfícies mucosas, um processo denominado exclusão imunológica. Se as bactérias ou os vírus não conseguirem aderir às células epiteliais intestinais, eles passarão pelo conteúdo intestinal e serão expulsos sem causar danos (DESHMUKH, 2008).

O TLAI é responsável pela defesa do organismo contra diferentes tipos de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários e outros parasitas. O TLAI participa desse processo exercendo as seguintes atividades: 1) captação, processamento e apresentação dos antígenos presentes no intestino; 2) produção de anticorpos locais, em especial da classe IgA; 3) ativação de resposta imune cito-mediadas, particularmente as mediadas por células T citotóxicas CD8+, ou células NK e por macrófagos (GOMES, 2009). O TLAI controla a invasão patogênica e induz tolerância oral em resposta a antígenos inofensivos da dieta e do epitélio intestinal. A mucosa intestinal é exposta a numerosos fatores exógenos e tem mecanismos reguladores diferenciados, que permitem uma permeabilidade seletiva para os nutrientes e certas macromoléculas, mas também a exclusão de uma potencial dieta prejudicial, de antígenos bacterianos ou do ambiente (NUNES, 2009).

A tolerância alimentar é responsável pelo discernimento do organismo em reconhecer o que é próprio do não próprio, parte desse processo ocorre na

mucosa intestinal e é responsável pela absorção ou exclusão, tolerância ou reatividade dos ingredientes ingeridos. Esses fatores irão influenciar a digestão com relação à secreção, absorção, motilidade e os mecanismos imunológicos relacionados à exclusão de antígenos, regulação do TLAI, processamento de antígenos, sensibilidade, alergia, bem como processos neuroendócrinos locais (CAVE, 2008).

Antígenos dos alimentos e microrganismo têm capacidade de interagir com a parede da mucosa e induzir reações e processos reguladores. A estimulação do sistema imunitário dentro do TGI também pode provocar efeitos sobre todo o corpo, os plasmócitos são ativados, migram para a corrente sanguínea e para outras partes do corpo, assim promovem a apresentação de antígenos e em reações secundárias em outros locais (TIZARD, 2002).

2.3 Prebióticos

Componentes prebióticos promovem benefícios na estimulação do sistema imune, combate a invasão de microrganismos patogênicos, produção de ácidos graxos de cadeia curta com a acidificação do cólon e adequação do tempo de trânsito intestinal (GOMES, 2009).

Gibson e Roberfroid (1995) postularam que prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Outro efeito adicional do prebiótico é inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro.

Assim, para ser classificada como prebiótico, a substância deve atender aos seguintes critérios: deve ser resistente à acidez gástrica, a hidrólise ou absorção do TGI; ser fermentável pela microbiota intestinal; estimular

seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais, que contribuem para a saúde e o bem-estar do hospedeiro (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2007). Diversos ingredientes passaram, então, a ser empregados como prebióticos, sem que a consideração à definição fosse seguida. Tendo em vista esses três critérios, três prebióticos foram estabelecidos: frutologossacarídeos (FOS), galactoligossacarídeos (GOS), e lactulose (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

O mecanismo de ação do MOS é diferenciado em relação ao dos outros oligossacarídeos utilizados como prebióticos, havendo inclusive algumas divergências em relação a sua classificação (AQUINO, 2009).

Segundo Cabib et. al. (1997), a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta uma parede celular que perfaz de 15 a 25% do seu peso seco, sendo constituída principalmente de glucanas (58%), mananoproteínas (40%) e quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglucosamina (2%) (KLISS, 1994). A estrutura da parede celular de levedura encontra-se ilustrada na figura 1.

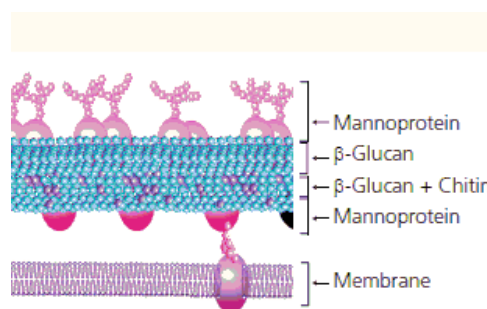


Figura 1 Porção da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* que ilustra as camadas de polissacarídeos localizadas individualmente

Fonte: (RUIZ-HERRERA, 1992 citado por SOUSA, 2008)

As principais constituintes da parede celular das leveduras, as glucanas, apresentam os seus blocos de glicose unidos por ligações glicosídicas (β 1-3) e (β 1-6), por isso são denominadas β -glucanas e possuem importante função no sistema imunológico, pois atuam nos animais estimulando as células fagocíticas; os mananoligossacarídeos, por sua vez, atuam de maneira a impedir a proliferação de bactérias patogênicas (ZAINE, 2010).

Segundo Medzhitov e Janeway Junior (2000), a porção majoritária dos polissacarídeos formadores da parede celular de leveduras, β -D-glucanas e α -D-mananas, são reconhecidas pela capacidade de promover a modulação do sistema imunológico de vários organismos vivos, desde insetos até humanos, por meio de interações específicas com diferentes células imunocompetentes.

2.4 Mananoligossacarídeos (MOS)

Os MOS apresentam a capacidade de modular o sistema imunológico e a microbiota intestinal, ligam-se a uma ampla variedade de micotoxinas e preservam a integridade da superfície de absorção intestinal. As bactérias patogênicas colonizam o TGI prendendo-se a superfície das células epiteliais e para evitar a infecção é necessário inibir o processo de enlace patogênico.

A ação prebiótica do MOS se faz pela adsorção de bactérias patogênicas com bloqueio dos locais de adesão de bactérias ao intestino, denominado enlace patogênico. Esse processo tem a capacidade de estimular a resposta imune contra patógenos específicos impedindo a sua colonização no intestino e fazendo com que sejam apresentados às células imunitárias como antígenos atenuados (GOMES, 2009).

Os MOS bloqueiam a aderência das bactérias patogênicas ao ocupar os sítios das células epiteliais da mucosa intestinal onde elas poderiam se prender. Também é capaz de induzir a ativação dos macrófagos saturando os sítios

receptores nas manoses das glicoproteínas da superfície celular, que se projetam da superfície da membrana celular dos macrófagos. Uma vez que três ou mais lugares tenham sido saturados, inicia-se uma reação em cadeia que dá origem a ativação dos macrófagos e a liberação de citocinas, com a instalação de resposta imunológica adquirida (BORGES; SALGARELLO; GURIAN, 2003).

Tem sido relatado que o MOS é capaz de aumentar os níveis séricos de imunoglobulina G e A e IgA ileal quando adicionados com frutoligossacarídeos (SWANSON et al., 2002). No trabalho de Zaine (2010) a suplementação com beta 1,3/1,6 glucano, não observou aumento de IgA fecal, porém houve aumento dos linfócitos T totais, T *helper*, T citotóxicos, linfócitos B e Fator Tumoral- α , indicando efeito imunomodulador de frações purificadas da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os MOS atuam benéficamente modulando a resposta imune dos animais através da interação existente entre os carboidratos dos mananoligossacarídeos e o sistema linfóide associado ao intestino do animal que responde de forma mais eficiente devido à apresentação de patógenos promovida pelos MOS. Estudos demonstraram maior produção de imunoglobulina A (IgA) sérica em cães, no conteúdo do cólon de ratos e maior atividade neutrofílica (KHIL, 2001).

Estudos demonstram que cães que consumiram uma dieta com MOS possuíam maiores concentrações de *Lactobacillus* fecais e maiores níveis de IgA e de linfócitos séricos, quando comparados com uma dieta controle sem suplementação (SWANSON et al., 2002). Acredita-se que os MOS possuem efeitos diretos sobre as células imunitárias do TGI quando absorvidos nas células M, localizadas no interior das placas de *Peyer*. Dessa forma, os MOS estimulariam tanto a imunidade sistêmica como a imunidade associada ao intestino, atuando como oligossacarídeo não patogênicos, e exercendo efeito semelhante a um adjuvante.

As manoses são responsáveis pela ligação com patógenos entéricos, adsorção de micotoxinas e produção de lectina. A lectina se liga a manose e auxilia a fagocitose, sendo importante especialmente na resposta da imunidade inata do animal (GOMES 2009). Os prebióticos atuam diretamente sobre o TLAI, devido ao contato direto entre células imunitárias, produção de AGCC, alteração da produção de mucina e bactérias lácticas, essas são responsáveis pela produção de algumas substâncias com capacidade imunoestimulatória, como os lipopolissacarídeos, peptideoglicanos e ácidos lipoteicoicos. Essas substâncias vão interagir sobre a produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose macrófaga e indução da síntese de imunoglobulinas IgA (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Gomes (2009) realizou a quantificação imunofenotípica por citometria de fluxo das subpopulações linfocitárias e populações de linfócitos T e B e demonstrou que houve aumento mediante a suplementação de Parede Celular de Levedura (PCL). Vogt (2005) mostrou aumento de linfócitos circulantes podendo ser decorrente do estímulo causado pela presença de PCL no lúmen intestinal. As alterações no padrão metabólico da população bacteriana fecal, evidenciadas pelo aumento de ácido butírico e diminuição de quatro aminas biotivas, parecem ter sido suficientes para provocar aumento de linfócitos circulantes, mesmo sem a alteração da microbiota.

Zaine (2010) foi além dos efeitos da parede celular de levedura e mostrou que seu estímulo sobre a imunidade está diretamente relacionado ao componente da estrutura da levedura que é utilizado.

A fração β -glucano da parede celular de levedura atua de maneira específica sobre a imunidade. Os β -glucanos são reconhecidos pelo sistema imune inato, esse reconhecimento desempenha papel importante na defesa do hospedeiro e apresenta oportunidades específicas de modulação clínica da resposta imune do hospedeiro. Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas,

entre outros, expressam receptores capazes de reconhecer os β -glucanos nas suas diversas formas. O receptor dectina-1 reconhece uma variedade de leveduras com ligações β -1,3 e β -1,6, que faz o reconhecimento, sinalização intracelular, ativa as respostas celulares e gera a resposta imune adaptativa (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009).

O uso de β -glucanostambum foi capaz de atuar sobre a imunidade humoral, com aumento de igm surica e diminuição de iga no soro e nas mucosas (STUYVEN et. al., 2010). Além disso, os mananos foram relatados como moduladores do sistema imune, por aumentar a concentração de imunoglobulina a em conteúdo cecal de ratos, aumentar a IgA biliar e sistêmica IgG em perus (SAVAGE, 1996) e aumentar a atividade de neutrófilos em cães e peixes (O'GARRA; ARAI, 2000). A suplementação de mos em perus aumentou o número de células caliciformes que são células muco-secretoras e desempenham um papel fundamental na homeostase intestinal (NEUTRA, 1999). Portanto, os mos também podem reforçar a barreira de defesa dos mecanismos intestinais que não são completamente entendidos até o momento (AQUINO, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do experimento e instalações

A realização do experimento teve a aprovação da Comissão de Bioética na Utilização de Animais (NINTEC / PRP-UFLA), da Universidade Federal de Lavras, protocolo nº 070/2011 (Anexo B).

O experimento foi conduzido no período de novembro a dezembro de 2010, no CENAC (Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia), do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, região Sul do Estado de Minas Gerais, latitude 21°14'30'' (S), longitude 45°00'10'' (O) e 910 metros de altitude.

O Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia possui vinte e quatro canis e gaiolas metabólicas, onde são alojados 24 cães da raça Beagle. Os canis apresentam a área de 4,5m² (1,5 m de largura x 3,0 m de comprimento) com área de solário, comedouros e bebedouros automáticos individuais. As gaiolas metabólicas com dimensão de 70 x 85 x 70 (altura x profundidade x largura) são constituídas de arame galvanizado e chapas metálicas nas laterais, além da bandeja coletora para fezes com fundo telado que permite a coleta da urina sem contaminação fecal.

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Animais utilizados e tratamentos experimentais

Foram utilizados 24 cães adultos, machos e fêmeas, da raça *Beagle*, com idade média de 6,5 ($\pm 3,5$) anos, vermifugados, com peso médio de 13,66 \pm 2,70

kg. Os cães selecionados estavam em bom estado de saúde e passaram por avaliação médico-veterinária antes e durante a realização do teste.

Para a alimentação dos animais utilizou-se uma dieta comercial seca isenta de prebióticos como controle. O estudo proposto foi constituído por quatro tratamentos como pode ser observado na Tabela 1, totalizando seis repetições por tratamento totalizando 24 unidades experimentais.

Tabela 1 Tratamentos experimentais empregados no estudo

Tratamentos	Alimentos
T 1	ração controle
T 2	ração controle + mananoproteínas na dose de 300 ppm
T 3	ração controle + mananoproteínas na dose de 600 ppm
T 4	ração controle + mananoproteínas na dose de 900 ppm

As diferentes doses do produto foram ministradas aos animais em forma de cápsulas, juntamente com um alimento comercial, cujos níveis de garantia do rótulo encontram-se na Tabela 2. No tratamento 1, os animais receberam cápsulas de placebo durante o período experimental.

Tabela 2 Níveis de garantia expressos no rótulo da ração utilizada no estudo

Níveis de Garantia	MN	MS
Umidade (máx)	12,0%	8,02%
Proteína Bruta (mín.)	22,0%	25,83%
Extrato Etéreo (mín.)	10,0%	7,70%
Matéria Fibrosa (máx.)	5,0%	2,88%
Matéria Mineral (máx.)	9,0%	14,88%
Cálcio (máx.)	2,4%	
Fósforo (mín.)	0,9%	
Energia Metabolizável	3090 kcal/kg	
Composição básica: carne de frango, farelo de glúten de milho, quirera de arroz, milho integral moído, farinha de subprodutos de frango, gordura animal estabilizada com tocoferóis, farelo de milho, miúdos de aves hidrolisados, ovo em pó, óleo de peixe, L-lisina, cloreto de potássio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, cloreto de colina, taurina, DL-metionina, ácido ascórbico, sulfato de zinco, sulfato ferroso, <i>premix</i> vitamínico (A,D-3, E, B12), riboflavina, niacina, pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, biotina, momonitrato de tiamina, ácido fólico, sulfato de cobre, cloridrato de piridoxina, menadionabissulfito de sódio, iodato de cálcio, selenito de sódio.		

A quantidade de ração fornecida a cada animal foi calculada de acordo com suas necessidades energéticas diárias de manutenção em kcal/dia de acordo com a National Research Council- NRC (2006), utilizando a fórmula $130 \times \text{Peso Corporal}^{0,75}$.

A quantidade total de alimento para cada animal de cada tratamento foi fornecida uma vez ao dia durante um período de 24 horas. As sobras foram coletadas diariamente e pesadas para a determinação do consumo.

3.3 Procedimento experimental

O experimento teve duração de trinta e cinco dias, sendo realizadas quatro coletas de sangue (dia 0, 10, 23 e 35) durante o período experimental.

No sétimo dia do experimento realizou-se desafio antigênico com vacinação subcutânea dos animais contra *Leishmaniose* Visceral Canina. Foi utilizada a vacina comercial (*Leishmune*®, Fort Dodge, São Paulo), com o propósito de promover uma imunostimulação antígeno-específica dos animais. Esse desafio teve como objetivo promover a situação de estresse nos animais, a fim de verificar se as diferentes concentrações de mananoproteínas administradas em cada tratamento influenciam no *status* imunológico dos animais.

Optou-se por uma vacina monovalente a qual os animais não haviam sido expostos anteriormente, para evitar interferência na contagem de anticorpos de exposições realizadas anteriormente. Os dias de coletas foram escolhidos de forma que ficassem equidistantes e que a última colheita de sangue correspondesse com o 28º dia após a vacinação, onde se tem o pico de produção de anticorpos.

3.4 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada antes do início do experimento (dia 0) e posteriormente nos dias 10, 23 e 35.

Realizou-se a coleta de sangue por venopunção jugular, o material foi separado em três tubos coletores, um para determinação do hemograma completo contendo EDTA, um tubo sem anticoagulante para obtenção do soro para a quantificação das imunoglobulinas A, G e M, proteínas C reativas e titulação para contagem de anticorpos antileishmaniose e o último tubo contendo citrato de sódio para determinação do fibrinogênio. As amostras coletadas foram armazenadas sob refrigeração de 4°C, até o envio para análises no Laboratório Santa Cecília – Lavras MG.

As contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, taxa de hemoglobina e volume globular foram realizadas através de um contador veterinário automático de células. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se de esfregaços, sendo a fórmula leucocitária absoluta obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias.

A contagem total de leucócitos foi efetuada em contador automático de células veterinário, sendo a contagem diferencial realizada em esfregaços sanguíneos frescos corados com panótico.

A concentração de fibrinogênio foi determinada pelo método de precipitação pelo calor em banho-maria a 56 °C e a para leitura foi utilizando refratômetro digital. A PCR foi determinada pelo método ultrasensível turbidimétrico e analisadas em analisador bioquímico.

3.5 Exames sorológicos para Leishmaniose

Esse exame foi realizado em laboratório especializado (Hermes Pardini, Belo Horizonte) com *Kit* licenciado pelo Ministério da Agricultura, recomendado para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina. Primeiramente realizou-se o ensaio imunoenzimático com o Teste de ELISA e para a confirmação do diagnóstico fez-se o teste de reação de imonofluorescência indireta (RIFI).

3.6 Dosagem de anticorpos

Para o exame de contagem de anticorpos antileishmaniose tem-se como valores referência para resultados reagente teste de ELISA com valores acima da linha de corte recomendado pelo fabricante do *KIT* e para o teste RIFI resultados com título igual ou superior a diluição 1:40.

Resultados com valores limites que os testes não foram capazes de determinar como reagente ou não reagente, pode corresponder ao início da soroconversão, reações cruzadas e/ou inespecíficas ou falência do sistema imune. Nesses casos é realizado um novo teste após 30 dias do último exame.

Todos os exames nas quatro coletas e em todos os animais o resultado foi não reagente, tanto para o teste de ELISA como para o RIFI.

3.7 Delineamento experimental e análise estatística

Para a variável hematológica o delineamento experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado, sendo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + r_j + e_{ij} + b_k + ab_{ijk} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

Y_{ijk} = observação da variável referente à subparcela k da parcela i na repetição j;

μ = média geral;

a_i = o efeito da dieta i da parcela ($i = 1,2,3,4$);

r_j = o efeito do repetição j ($j = 1,2,3,4,5,6,7$);

e_{ij} = o erro experimental associado às parcelas;

b_k = efeito do nível k do fator B (tempo de colheita) da subparcela (com $k = 0, 10, 23$ e 35);

ab_{ijk} = efeito da interação do fator A com o fator B;

e_{ijk} = o erro experimental associado às subparcelas.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento *GLM (General Linear Models)* do software *Statistical Analysis System (Versão 8.2) (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2004) Inc., Cary, NC, EUA*). Realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para a normalidade dos resíduos e teste F para a homogeneidade do resíduo. Atendendo às

premissas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As variáveis que não se apresentam significativas no teste de Shapiro-Wilk e F foram transformadas (transformação logarítmica e quadrática) e suas médias posteriormente analisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dosagem de anticorpos

Os resultados eritroleucométricos estão representados na Tabela 3. Os parâmetros hematológicos da série branca e plaquetas estão representados na Tabela 4. A quantificação das imunoglobulinas séricas estão na Tabela 5. Os resultados de fibrinogênio e Proteína C reativa estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 3 Resultados dos valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina nos quatro tempos avaliados

Tempo	Hemácia(mm ³)				Hematócrito(%)				Hemoglobina g/dL			
	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900
0	6,91	6,64	6,60	6,88	44,8	44,43	43,19	44,5	15,4	15,23	15,11	15,44
10	6,62	6,33	6,14	6,66	45,32	44,67	42,4	46,09	15,7	15,47	14,7	15,97
23	6,4	6,7	6,3	6,99	42,53	44,87	41,11	46,2	14,47	15,33	13,94	15,86
35	6,57	6,23	6,32	6,73	41,3	39,91	39,74	42,79	13,7	13,19	13,13	14,14
P	0,2788				0,2514				0,1911			
Efeito Tratamento												
Médias	Hemácias(mm ³)				Hematócrito(%)				Hemoglobina g/dL			
	T0	T300	600	900	0	300	600	900	0	300	600	900
Médias	6,62	6,48	6,34	6,81	43,49	43,47	41,61	44,89	14,82	14,80	14,22	15,35
P	0,4014				0,2801				0,2697			
Efeito Tempo												
Médias	Hemácias (mm ³)				Hematócrito (%)				Hemoglobina g/dL			
	0	10	23	35	0	10	23	35	0	10	23	35
Médias	6,75 ^a	6,43 ^b	6,60 ^{ab}	6,46 ^b	44,21 ^a	44,29 ^a	43,72 ^a	40,22 ^b	15,29 ^a	15,45 ^a	14,91 ^a	13,53 ^b
P	0,0054				<0,0001				<0,0001			
Cv	5,35				5,07				5,56			

Os parâmetros eritrocitários não diferiram entre os tratamentos, esses dados apresentam uma visão instantânea do sistema hematopoiético em um momento específico e oferecem visão geral sobre o estado do animal (REBAR et al., 2003).

Houve diferença significativa ao longo do tempo com diminuição de hemácias, hemoglobina e a porcentagem de hematócrito, esses se mantiveram dentro dos valores de referência (Anexo 1). A ausência de alterações sugere que as concentrações testadas foram seguras.

Esses achados vão de acordo com a literatura, Gomes (2010) e Zaine (2010) de acordo com a literatura não encontraram diferença sobre os parâmetros eritroleucométricos e plaquetários em cães, com a suplementação de PCL e beta-glucanos respectivamente.

Budiño et al. (2004) não encontraram diferença sobre variáveis hematológicas de leitões suplementados com probióticos e/ou prebióticos. Swanson et al. (2002) também não observaram nenhuma diferença significativa nesses parâmetros avaliados.

Tabela 4 Resultados dos valores de leucócitos, monócitos, plaquetas, linfócitos nos quatro tempos avaliados

	Leucócitos(mil/mm ³)				Monócito(mil/mm ³)				Plaquetas(mil/mm ³)				Linfócito(mil/mm ³)			
	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900
0	9,65 ^a	8,40 ^{A,a}	6,97 ^b	8,46 ^a	1,67	1,71	3,29	2,0	239,83	214,57	256,86	223,71	21,5	31,14	31,71	28,0
10	10,07 ^{ab}	11,38 ^{B,a}	9,29 ^b	9,97 ^b	5,5	3,43	3,43	3,14	243,5	240,29	256,0	220,86	21,5	25,86	25,57	22,43
23	8,08 ^{ab}	9,14 ^{AB,a}	7,47 ^b	8,96 ^a	2,17	2,29	1,86	2,57	247,67	258,29	257,86	237,43	28,83	29,29	32,57	23,0
35	8,97	9,3 ^{AB}	8,14	8,89	1,83	2,86	2,0	1,14	276,33	252,71	269,29	230,43	28,67	32,29	35,86	31,29
P	0,0167				0,2964				0,4483				0,4628			
Efeito Tratamento																
	Leucócitos(mil/mm ³)				Monócito(mil/mm ³)				Plaquetas(mil/mm ³)				Linfócito(mil/mm ³)			
	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900
Médias	9,19	9,54	7,97	9,07	2,79	2,57	2,64	2,21	251,83	241,46	260,0	228,11	25,13	29,64	31,43	26,18
P	0,1356				0,7571				0,4324				0,1329			
Efeito Tempo																
	Leucócitos(mil/mm ³)				Monócito(mil/mm ³)				Plaquetas(mil/mm ³)				Linfócito(mil/mm ³)			
	0	10	23	35	0	10	23	35	0	10	23	35	0	10	23	35
Médias	8,32	10,14	8,43	8,8	2,18 ^b	3,81 ^a	2,22 ^b	1,96 ^b	233,5 ^b	240,0 ^{ab}	250,4 ^{ab}	256,4 ^a	28,3 ^a	23,9 ^b	28,4 ^a	32,1 ^a
P	<0,0001				0,0017				0,0009				0,0001			
Cv	10,55				76,40				10,81				21,59			

Não foram encontradas respostas significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos para monócitos, plaquetas e linfócitos.

Com relação aos leucócitos algumas das diferenças encontradas no tempo 0 já estavam presentes na avaliação basal, sugerindo que não houve influência da inclusão de mananoproteína entre os tratamentos sobre tais parâmetros. Segundo Duncan, Prasse e Mahaffey (1994), podem existir as diferenças leucocitárias: leucocitose fisiológica; leucograma de *stress*, que pode justificar essa diferença encontrada.

Embora esses parâmetros encontram-se dentro dos valores de referência o aumento de leucócitos pode ser considerado uma reação a várias infecções, processos inflamatórios e, em certas circunstâncias, a processos fisiológicos como estresse (HOKAMA; MACHADO, 1997). Observou-se um aumento na contagem dos leucócitos ao longo do tempo, sendo maior no dia 10, que corresponde ao terceiro dia após a vacinação, esse aumento pode ser justificado pelo estresse causado pela imunoestimulação vacinal dos animais.

Os linfócitos apresentaram maior concentração no tempo 35, nesse trabalho não foi realizado a contagem das suas sub populações, o que pode ter colaborado para interpretação subjetiva da mesma, porém outros autores observaram aumento semelhante.

Zaine (2010) testou a inclusão de 0,2% de PCL e 0,015% de duas frações purificadas de beta 1,3/1,6 -glucanos (BG1 e BG2) e um grupo controle (CT), observou aumento dos linfócitos ao longo do tempo no grupo BG2, no mesmo trabalho demonstrou que a inclusão de beta-glucanos foram capazes de promover a imunoestimulação. Além de mostrar que o tipo de partícula pode influenciar diretamente no tipo de resposta desenvolvida ao glucano.

Hunter, Gault e Berner (2002) sugerem que o tamanho da partícula também pode afetar essa resposta, partículas menores e não agregadas foram

mais efetivas para melhorar a fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos, após ingestão oral da substância.

Gomes (2009) encontrou resultados semelhantes, com aumento de linfócitos B e linfócitos T totais. Hahnet al. (2006), em seu trabalho com suínos mostraram que a inclusão de 0,02% de beta-glucanos foi capaz de elevar as concentrações das células T helper e T citotóxicas por um período de 8 semanas.

Tabela 5 Resultados dos valores de imunoglobulinas A, G e M nos quatro tempos avaliados

	Ig A(mg/dL)				Ig G(mg/dL)				Ig M(mg/dL)			
	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900
0	36	40,29	43	36,29	271,68	324,53	305,23	283,09	43,08	51,74	49,14	52,51
10	39,33	42,71	42,43	39,14	300,32	300,94	314,21	312,59	39,88	45,33	49,70	46,97
23	49,98	61,49	50,0	50,0	326,57	373,29	349,14	333,5	49,98	61,49	59,84	56,03
35	50,0	49,29	49,57	48,43	341,28	367,01	341,09	335,97	55,05	69,79	72,66	69,00
P			0,8310				0,9868				0,7311	
Efeito Tratamento												
	Ig A(mg/dL)				Ig G(mg/dL)				Ig M(mg/dL)			
	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900
Médias	45,13	45,04	45,96	43,22	309,96	351,19	327,42	316,29	46,99	57,08	57,83	56,12
P			0,4620				0,5598				0,2865	
Efeito Tempo												
	Ig A(mg/dL)				Ig G(mg/dL)				Ig M(mg/dL)			
	0	10	23	35	0	10	23	35	0	10	23	35
Médias	40,148 ^b	40,963 ^b	50,0 ^a	49,29 ^a	297,04 ^b	317,77 ^b	346,33 ^a	346,53 ^a	49,34 ^a	56,26 ^a	57,09 ^a	67,05 ^b
P			<0.0001				<0,001				<0.0001	
CV			11,57				10,72				6,32	

A IgA apresentou aumento significativo ($P < 0,001$) duas semanas após a vacinação em todos os tratamentos, não apresentando significância ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Embora Swanson et al. (2002) relataram que a inclusão de MOS foi capaz de aumentar os níveis séricos de imunoglobulina G e A quando adicionados com frutoligossacarídeos. Avaliar a IgA sérica não é o melhor método para avaliar a influência sobre esta imunoglobulina por se específica de mucosa. Esse mesmo autor demonstrou aumento das concentrações de IgA ileal, porém Zaine (2010) não encontrou variação na concentração de IgA fecal.

A imunoglobulina M (IgM) é predominante no início das respostas imunitárias e é produzida rapidamente em respostas a antígenos que desencadeiam resposta humoral. IgG é a mais encontrada na superfície de linfócitos B, exercendo a função de receptoras, combinando com antígenos específicos. A IgM apresentou aumento ($P < 0,001$) na quarta semana após a vacinação em todos os tratamentos, porém não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

Mendes et al. (2003) avaliaram a resposta de IgG total ao antígeno da fração purificada isolada de *Leishmania* submetidos à vacinação, verificaram níveis aumentados de anticorpos IgG total, animais vacinados como infectados naturalmente, trabalhos indicando que a IgG1 está associada com o desenvolvimento e a IgG2 com a resistência à doença, apesar do presente experimento não ter avaliado a contagem das subclasses de IgG, trabalhos demonstram que animais vacinados têm predomínio de IgG2.

Não foram encontradas respostas significativas ($P > 0,05$) para a IgG como efeito dos tratamentos, mas assim como as outras imunoglobulinas houve aumento significativo a partir do vigésimo terceiro dia de coleta, o que era esperado pela resposta vacinal.

Trabalhos semelhantes que utilizaram a vacina como imunoestimulação foram relatados por Zaine (2010) com a vacina contra leptospirose e Stuyven et.

al. (2009) que utilizaram uma vacina bivalente, contra *Bordetellabronchiseptica* e o vírus da Parainfluenza tipo 2.

Zaine (2010) não encontrou resposta à vacina na contagem de anticorpos antileptospira, justificado pela técnica de soroaglutinação ser pouco sensível na detecção de anticorpos antileptospira.

A escolha dessa vacina se deu pelos animais não serem previamente vacinados com o sorovar contido nela e pela metodologia de avaliação sorológica estar bem padronizada.

Para imunestimulação dos animais e melhor avaliação de sua competência imunológica, semelhante ao desafio antigênico realizado que teria baixa capacidade imunogênica, pelo protocolo utilizado.

O'Garrae Arai (2000) não encontrou variações entre as concentrações de proteínas plasmáticas e IgG ao avaliar a inclusão de 1, 2 ou 4g de MOS por Kg de dieta. Já para imunidade, observou-se um efeito de prebiótico para resposta vacinal contra a doença de *Newcastle* aos 28 dias e um efeito de prebiótico para peso relativo de baço em cães.

Tabela 6 Resultados dos valores de fibrinogênio e PCR nos quatro tempos avaliados

Tempo	Fibrinogênio(mg/dL)				PCR (mg/L)			
	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900
0	306,33	176,5	240,43	254,86	2,52 ^{A,a}	3,98 ^{A,c}	5,77 ^{A,c}	3,44 ^{A,b}
10	275,5	253	273,43	258,43	1,01 ^{B,a}	3,04 ^{B,c}	1,76 ^{B,b}	1,47 ^{B,ab}
23	252,33	239,0	224,0	262,0	4,28 ^{C,ab}	3,42 ^{AB,c}	4,84 ^{C,b}	4,23 ^{C,a}
35	328,83	302,17	320,0	327,6	7,50 ^{D,a}	7,11 ^{C,ab}	6,78 ^{D,b}	6,71 ^{D,b}
P		0,5065				0,0494		
Efeito Tratamento								
	Fibrinogênio(mg/dL)				PCR(mg/L)			
	T0	T300	T600	T900	T0	T300	T600	T900
Médias	290,75	242,92	264,99	271,73	1,99	2,14	2,23	2,02
P		0,0406				0,1126		
L		0,5553				-----		
Q		0,0397				-----		
Efeito Tempo								
	Fibrinogênio (mg/dL)				PCR(mg/L)			
	0	10	23	35	0	10	23	35
Médias	244,77 ^b	264,7 ^b	244,04 ^b	319,33 ^a	2,05	1,48	2,11	2,72
P		0,0001				<0,0001		
Cv		23,17				18,74		

Não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém observou-se interação entre tratamento x tempo, havendo uma inversão desses valores no T0 e T600, enquanto o PCR do grupo controle foi o menor valor observado no tempo 0 este apresentou-se significativamente maior no tempo 35, o contrário foi observado com T600. Demonstrando que a inclusão a partir de 600ppm na dieta de mananoproteína foi capaz de diminuir a resposta inflamatória

Não há na literatura nenhum trabalho que correlacione proteína de fase aguda com a suplementação de mananoproteína, sabe-se que o fibrinogênio é

sintetizado pelo fígado e cuja concentração plasmática eleva-se sob a ação estimuladora das interleucinas (IL-1 e 6) e do TNF- α liberada pelo processo inflamatório (ANDREWS; REAGAN; NICOLA, 1994).

Durante o processo de inflamação aguda, a concentração plasmática dessa substância aumenta por vários dias, atingindo um pico entre o quinto e sétimo dia (SCHALM; JAIN; CARROL, 1975). Para cães, o valor de normalidade é compreendido entre 100 e 500mg/dL (SCHALM, 1970). Valores superiores podem indicar processo inflamatório, desde que a hemoconcentração não esteja presente (SUTTON; JOHNSTONE, 1997).

A PCR reflete a ativação do sistema imunológico e pode ser usada para avaliar a saúde dos animais. É responsável por amplificar a resposta imune, aumentando a lesão tecidual e participa na ativação do sistema complemento. A PCR está sendo considerada como marcador padrão-ouro para a inflamação. Ao longo do tempo em todos os tratamentos tiveram aumento da PCR, e se manteve dentro dos valores de referência (1,0mg/L até 16,40mg/L), sendo este aumento uma resposta à vacinação e não sobre um processo inflamatório patológico dos animais (DABROWSKI et al., 2007).

Burigoet al. (2007) encontraram diferença nos valores de PCR avaliando pacientes com a suplementação com FOS na dosagem de 12g por 15 dias, o grupo controle apresentou valores significativamente superiores de PCR, sugerindo que a suplementação com prebióticos foi capaz de reduzir processos inflamatórios.

O fibrinogênio e a PCR apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,001$) entre os dias de coleta, com significante aumento no dia 35, que corresponde ao vigésimo oitavo dia após a vacinação. O aumento desses parâmetros em todos os tratamentos foi em função da resposta vacinal, embora a literatura cite um aumento no quinto ao sétimo dia, no presente estudo observa-se o pico de

concentração das proteínas de fase aguda somente três semanas após a imunoestimulação.

O fibrinogênio apresentou ($p < 0,005$) efeito quadrático com relação aos tratamentos, sendo a média no T300 inferior aos demais tratamentos.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a inclusão de mananoproteína na dieta demonstrouse segura, não havendo alterações hematológicas e em concentrações acima de 600ppm houve interação com o tempo e efeito sobre a resposta inflamatória. Estudos mais aprofundados sobre o sistema imune são necessários para explicar a relação entre o mesmo.

REFERÊNCIAS

AQUINO, A. A. **Extrato seco de parede de levedura em dietas para gatos adultos**. 2009. 197f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ANDREWS, D. A.; REAGAN, W. J.; NICOLA, D. B. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. **Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Yarley, v.16, n. 10, p. 1349-1357, Oct. 1994.

BELOSHARPA, A. N.; SWANSON, K. Gastrintestinal health of dogs and cats. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, 2.; SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 9., 2010, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Alimentação Animal, 2010. p. 53-55.

BUDIÑO, F. E. L. et al. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum- Animal Science**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 529-536, 2004.

BURIGO, T. et al. Ação do prebiótico sobre as proteínas de fase aguda de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 130-135, 2007.

CABIB, E. et al. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. **Biochemical Society Transactions**, Colchester, v.25, n.1, p. 200-204, 1997.

CAVE, N. J. Nutrition e immunity. In: PIBOT, P.; BOURGE, V.; ELLIOT, D. (Ed.). **Encyclopedia of feline clinical nutrition**. 2nd ed. Saint Charles: Royal Canin, 2008. p. 480-506.

DABROWSKI, R. et al. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with piometra. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 67, p. 321-327, 2007.

DESHMUKH, A. O sistema imunológico e seu papel como um sistema protector para cães. In: _____. **Sistemas de proteção natural em caninos**. São Paulo: Proplan Purina, 2008. p. 1-15.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 3rded. Ames: Iowa State University, 1994. 300 p.

FAHEY, G. C. Prebiotic use by companion animals. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, San Diego, v. 228, n. 1, p. 36, 2004.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 259-275, Feb. 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n. 6, p.1401-1412, June 1995.

GOMES, M. O. S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009.98 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

GOODRIDGE, H.S.; WOLF, A.J.; UNDERHILL, D.M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 230, n. 1, p. 38-50, Feb. 2009.

GRIESHOP, C. M. Diet may affect nitriton, immune system of pets. **Feedtuffs**, Minnetonka, v.75, n. 26, p. 1-5, 2003.

HAHN, T. W. et al. Effects of supplementation of β -glucanos on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1422-1428, June 2006.

HOKAMA, N.K.; MACHADO, P.E.A. Interpretação clínica do hemograma nas infecções. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v.72, n.3, p.38-49, mar. 1997.

HUNTER JUNIO, K. W.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, Reno, v. 35, n. 1, p. 267-271, 2002.

KHIL, J. **The effect of pre- and probiotics and components of beef on colon cancer risk in rats**. Minnesota: University of Minnesota, p. 302, 2001.

KLISS, F.M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, Davis, v.10, n. 7, p.851-869, July 1994.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of body condition score system for dogs. **Canine Practices**, Canberra, v. 22, n. 1, p. 10-15, 1997.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JUNIOR, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 343, n. 5, p. 338-344, May 2000.

MENDES, G. et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. **Vaccine**, v. 2, n. 21, p. 19-20, 2003.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 68, n. 3, p. 587-597, Apr. 2007

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academies, 2006.

NEUTRA, M. R. M. Cells in antigen sampling in mucosal tissues. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 263, n. 1, p.17-32, Mar. 1999.

NUNES, E. O. F. S. **Nutrição do intestino, imunidade intestinal e resistência a parasitas do intestino em cães**. 2009. 174 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) -Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

O’GARRA, A.; ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 10, n. 12, p. 542-550, Dec. 2000.

OLIVEIRA, L. T.; BATISTA, S. M. M. **A atuação dos probióticos na resposta imunológica**. Disponível em:
<http://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=216>. Acesso em: 29jul.2010.

PERDIGON, G. et al. Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 1597-1606, 1995.

REBAR, A. H. et al. **Guia de hematologia para cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. 140 p.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 137, n. 3, p. 830-837, Mar. 2007.

ROCHA, E. E. M. O papel imunológico do intestino e o sistema GALT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO E CÂNCER, 4., 2006, Ganepão. **Anais...** Ganepão: SBNA, 2006. p. 69.

SAVAGE, S. I. Preparing broilers to minimize reprocessing. In: NATIONAL MEETING ON POULTRY HEALTH AND PROCESSING, 30., 1996, Ocean City. **Proceedings...** Ocean City: NMPH, 1996. p. 109-112.1

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.983-990, set./out. 2003.

SCHALM, O. W. Plasma protein: fibrinogen rations in disease in the dog and horse:part II. **The California Veterinarian**, Sacramento, v.24, n.4, p. 19-22, 1970.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J. **Veterinary hematology**. 3rded. Philadelphia: Lea &Febiger, 1975. 609 p.

SOUSA, L. C. **Avaliação do desempenho de *Bacilluslicheniformis*E-44 em diferentes condições de cultivo visando a obtenção de hidrolisado enzimático de levedura (*Saccharomycescerevisiae*)**.2008.101 p.Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Version 9.1.1. Cary, 2004. Software.

STUYVEN, E. et al. Effect of β -glucans on an ETEC infection in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 60-66, 2009.

SUTTOM, R.H.; JOHNSTONE, M. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs:a comparison with total leucocyte and neutrophil counts. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 18, p. 277-281, 1977.

SWANSON, K.S. et al. Supplemental fructooligosaccharides and mammalogigosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrients digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 1, p. 980-989, May 2002.

SWANSON, K. S.; FAHEY JUNIOR, G. C. Prebiotics in companion animal nutrition. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2002. p. 461-473.

VOGT, L.K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 111f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002. 496 p.

ZAINE, L. Utilização de beta-1,3/1,6-glucano de levedura de cana-de-açúcar em alimentos extrusados como imunomoduladores para cães. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, 2.; SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 9., 2010, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Alimentação Animal, 2010. p. 75-76.

ANEXOS

ANEXO A - TABELAS

TABELA1 Análise de variância e coeficiente de variação para fibrinogênio dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	31110.10289	10370.03430	3,4	0.0406
Repetição	6	22847.86807	3807.97801	1.00	0.4359
Erro (a)	17	51322.98605	3018.99918	0.79	0.6985
Tempo	3	94292.71479	31430.90493	8.22	0.0001
Tratamento*Tempo	9	31971.99650	3552.44406	0.93	0.5065
Erro (b)	65	248623.8277	3824.9820		
Total	103	482247.8462			
CV (%)	23,17				

TABELA 2 Análise de variância e coeficiente de variação para proteína C reativa dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	1,0228	0,3409	2,31	0,1126
Repetição	6	1,1429	0,1905	1,23	0,2998
Erro (a)	17	2,5063	0,1474		
Tempo	3	21,2554	7,0851	45,90	<0,0001
Tratamento*Tempo	9	2,8117	0,3124	2,02	0,0494
Erro (b)	69	10,6512	0,1544		
Total	107	39,0664			
CV (%)	18,74				

TABELA 3 Análise de variância e coeficiente de variação para IgA* dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	102,0767	34,0256	0,90	0,4620
Repetição	6	391,9624	65,3270	2,43	0,0355
Erro (a)	17	643,3286	37,8429		
Tempo	3	2115,5554	705,1852	26,23	<0,0001
Tratamento*Tempo	9	133,4395	14,8266	0,55	0,8310
Erro (b)	63	1693,5385	26,8816		
Total	101	5067,4608			
CV (%)	11,57				

*Transformação por raiz quadrada

TABELA 4 Análise de variância e coeficiente de variação para IgG dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	249332,2343	8310,7448	0,71	0,5598
Repetição	6	129076,1097	21512,6850	12,95	<0,0001
Erro (a)	17	199253,2405	11720,7789		
Tempo	3	47738,4408	15912,8136	12,95	<0,0001
Tratamento*Tempo	9	2678,4162	297,6018	0,24	0,9868
Erro (b)	69	84781,9767	1228,7243		
Total	107	489480,5500			
CV (%)	10,72				

TABELA 5 Análise de variância e coeficiente de variação para IgM dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	1,0793	0,3598	1,37	0,2865
Repetição	6	1,7687	0,2948	4,62	0,0005
Erro (a)	17	4,4739	0,2632		
Tempo	3	1,6315	0,5438	8,53	<0,0001
Tratamento*Tempo	9	0,3857	0,0429	0,67	0,7311
Erro (b)	69	4,3990	0,0638		
Total	107	13,7477			
CV (%)	6,32				

*Transformação por log

TABELA 6 Análise de variância e coeficiente de variação para hemácias dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	3,6729	1,2243	1,04	0,4014
Repetição	6	6,1054	1,0176	8,24	<0,0001
Erro (a)	17	20,0760	1,1809		
Tempo	3	1,7015	0,5672	4,60	0,0054
Tratamento*Tempo	9	1,3910	0,1546	1,25	0,2788
Erro (b)	69	8,5164	0,1234		
Total	107	41,2887			
CV (%)	5,35				

TABELA 7 Análise de variância e coeficiente de variação para hemoglobina dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	18,6593	6,2198	1,43	0,2697
Repetição	6	39,3904	6,5655	9,70	<0,0001
Erro (a)	17	74,1117	4,3595		
Tempo	3	6,3440	20,4480	30,22	<0,0001
Tratamento*Tempo	9	8,7297	0,9700	1,43	0,1911
Erro (b)	69	46,6857	0,6766		
Total	107	248,5796			
CV (%)	5,56				

TABELA 8 Análise de variância e coeficiente de variação para hematócrito dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	159,6153	53,2051	1,39	0,2801
Repetição	6	223,5717	74,5239	14,35	<0,0001
Erro (a)	17	651,0666	38,2980		
Tempo	3	223,5717	74,5239	14,35	<0,0001
Tratamento*Tempo	9	60,9179	6,7687	1,30	0,2514
Erro (b)	69	358,3958	5,1941		
Total	107	1785,1367			
CV (%)	5,26				

TABELA 9 Análise de variância e coeficiente de variação para leucócitos dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	52,1165	17,3722	2,12	0,1356
Repetição	6	10,6078	1,7680	2,00	0,0784
Erro (a)	17	139,3819	8,1989		
Tempo	3	62,3199	20,7733	23,48	<0,0001
Tratamento*Tempo	9	19,7438	2,1938	2,48	0,0167
Erro (b)	66	58,4008	0,8849		
Total	104	317,2756			
CV (%)	10,55				

TABELA 10 Análise de variância e coeficiente de variação para linfócitos dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	747,9435	249,3146	2,14	0,1329
Repetição	6	603,2326	100,5387	2,71	0,0201
Erro (a)	17	2980,7852	116,5167	3,14	0,0004
Tempo	3	904,6197	301,5399		
Tratamento*Tempo	9	327,6818	36,4090	0,98	0,4628
Erro (b)	69	2558,5773	37,0808		
Total	107	7077,5185			
CV (%)	21,59				

TABELA 11 Análise de variância e coeficiente de variação para monócitos dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	4,4836	1,4945	0,39	0,7571
Repetição	6	19,2128	3,2021	0,85	0,5389
Erro (a)	17	100,9955	5,9409	1,57	0,0971
Tempo	3	63,4711	21,1570		
Tratamento*Tempo	9	41,6104	4,6233	1,22	0,2964
Erro (b)	69	261,1488	3,7847		
Total	107	486,7685			
CV (%)	76,40				

TABELA 12 Análise de variância e coeficiente de variação para plaquetas dos cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	14622,1984	4874,0661	0,96	0,4324
Repetição	6	101675,2996	16945,8833	24,14	<0,0001
Erro (a)	17	85954,6766	5056,1574		
Tempo	3	8774,1848	2924,7283	4,17	0,0090
Tratamento*Tempo	9	6319,4153	702,1573	1,00	0,4483
Erro (b)	69	48435,8810	701,9693		
Total	107	266716,6667			
CV (%)	10,81				

TABELA 13 Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (%) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	75,4980	25,1660	2,59	0,0812
Erro	20	194,1440	9,7072		
Total	23	266,6420			
CV (%)	4,40				

TABELA 13 Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (%) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	87,7820	29,2610	2,47	0,0916
Erro	20	237,0450	11,8520		
Total	23	360,8270			
CV (%)	4,58				

TABELA 14 Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo hidrólise ácida (%) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	30,7600	10,2533	2,25	0,1179
Erro	18	82,1930	4,5663		
Total	21	112,9530			
CV (%)	2,63				

TABELA 15 Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente do extrativo não nitrogenado (%) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	46,8770	15,6260	1,34	0,2891
Erro	20	232,9450	11,6470		
Total	23	27,2730			
CV (%)	4,51				

TABELA 16 Análise de variância e coeficiente de variação da energia digestível em base natural (kcal/kg) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	138453	46151	2,93	0,0587
Erro	20	315067	15753		
Total	23	453520			
CV (%)	3,96				

TABELA 17 Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria seca (kcal/kg) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	97708	32579	1,83	0,1738
Erro	20	355573	17779		
Total	23	453281			
CV (%)	4,26				

TABELA 18 Análise de variância e coeficiente de variação para a energia metabolizável na matéria natural (kcal/kg) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	177900	59300	1,72	0,1975
Erro	20	694287	34714		
Total	23	872187			
CV (%)	6,62				

TABELA 19 Análise de variância e coeficiente de variação para a energia metabolizável na matéria seca (kcal/kg) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	194684	64895	1,58	0,2252
Erro	20	820738	41037		
Total	23	1015422			
CV (%)	6,67				

TABELA 20 Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de Bactérias do Ácido-lático (log UFC/g) de cães suplementados com diferentes concentrações de mananoproteína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	3	0,7798	0,2599	0,16	0,9208
Erro	20	32,1193	1,6059		
Total	23	32,8991			
CV (%)	10,59				

ANEXO B – DECLARAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 070/11**, relativo ao projeto intitulado "**Níveis crescentes de mananoproteína sobre a imunidade e microbiota de cães adultos**", que tem como responsável **Flávia Maria de Oliveira Borges Saad** está de acordo com os **Princípios Éticos da Experimentação Animal**, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 03/05/2012.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 070/11**, related to the project entitled "**Increasing levels of mananoprotein on immunity and microbiota of adult dogs**", under the supervision of **Flávia Maria de Oliveira Borges Saad**, is in agreement with the **Ethics Principles in Animal Experimentation**, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, and was approved in **May 03, 2012**.

Lavras, 03 de maio de 2012.


Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
Tel: +55 (35) 3829-5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

ANEXO C – HEMOGRAMA CANINO



Laboratório Santa Cecília

Matriz: Rua Monsenhor Aureliano, 46 Telef: (35) 3821-8098 / (35) 8802-1055
 Centro: Travessa Costa Pinto, 36 Tel: (35) 3821-6044 / (35) 8802-1054
 Jardim Fabiana: Rua Delino de Souza, 926 Tel: (35) 3822-8016 / (35) 8834-5814
 Home Page: www.labsantacecilia.com.br e-mail: contato@labsantacecilia.com.br

403214

Paciente: CADELA CLARAPROJ ANA FLAVIA Cadastro : 393897
 Dr. (a) : Idade: 2A 11M 2
 Coleta: 006 - Veterinária-001 - Unidade Matriz/Contrato: 29/11/10 15:13
 Cas: VETERINARIA/R-VETER-VETER/Registro : 403214/Página: 2/2

HEMOGRAMA COMPLETO CANINO

	Resultado	Unidade	Valores de Referência
Material :			Método : Automaticado Valores de Referência:
ERITROGRAMA			
Hemácias (milhões).....:	6,26	/mm ³	5,5 a 8,5
Hemoglobina.....:	19,2	g/dL	12 a 18
Hematócrito.....:	39,4	%	37 a 55
V.C.M.....:	62,9	fL	60 a 77
H.C.M.....:	21,0	pg	19 a 24
C.H.C.M.....:	33,5	%	31 a 36
RDW.....:	15,0	%	
Eritroblastos.....:	0	%	
OBSERVAÇÕES			
LEUCOGRAMA			
Leucócitos totais.....:	11,0	mil/mm ³	6,0 a 11,0 mil/mm ³
Blastos.....:	0	0,00	0
Promielócitos.....:	0	0,00	0
Mielócitos.....:	0	0,00	0
Metamielócitos.....:	0	0,00	0
Eosinófilos.....:	05	,55	a
Segmentados.....:	66	7,26	0 a 2
Linfócitos.....:	24	2,64	60 a 77
Linfócitos atípicos.....:	0	0,00	12 a 30
Monócitos.....:	03	,33	0 a 2
Eosinófilos.....:	02	,22	3 a 10
Basófilos.....:	0	0,00	2 a 10
			0 a 1
OBSERVAÇÕES			
Plaquetas.....:	411	mil/mm ³	200 a 500 mil/mm ³

Assinado eletronicamente em 01/12/10 por:
 Dra. EDNEY ROSÁRIA DE REZENDE

-CRFMG 14060