



MOARA MARINA BELO MATOS SILVEIRA

**ADITIVOS NUTRACÊUTICOS EM RAÇÕES COMERCIAIS -
IMUNIDADE E FUNÇÃO ANTIOXIDANTE DE CÃES IDOSOS**

**LAVRAS – MG
2022**

MOARA MARINA BELO MATOS SILVEIRA

**ADITIVOS NUTRACÊUTICOS EM RAÇÕES COMERCIAIS –
IMUNIDADE E FUNÇÃO ANTIOXIDANTE DE CÃES IDOSOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Paulo Borges Rodrigues

Orientador

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad

Coorientadora

LAVRAS - MG

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silveira, Moara Marina Belo Matos.

Aditivos nutracêuticos em rações comerciais- imunidade e função antioxidante de cães idosos. / Moara Marina Belo Matos
Silveira. - 2022.

68 p.: il.

Orientador(a): Paulo Borges Rodrigues.

Coorientador(a): Flávia Maria de Oliveira Borges Saad.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Nutrição. 2. Cães. 3. Aditivos. I. Rodrigues, Paulo Borges.
II. Saad, Flávia Maria de Oliveira Borges. III. Título.

MOARA MARINA BELO MATOS SILVEIRA

**ADITIVOS NUTRACÊUTICOS EM RAÇÕES COMERCIAIS –
IMUNIDADE E FUNÇÃO ANTIOXIDANTE DE CÃES IDOSOS**

**ADDITIVES IN COMMERCIAL FOOD DOG –
IMMUNITY AND ANTIOXIDANT FUNCTION OF SENIOR DOGS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de janeiro de 2022.

Dr. Paulo Borges Rodrigues UFLA - DZO

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad UFLA - DZO

Dr. Carlos Eduardo do Prado Saad UFLA- DZO

Dr. Walter Motta Ferreira UFMG

Dr. Djeison Lutier Raymundo UFLA - DMV

Prof. Dr. Paulo Borges Rodrigues

Orientador

Prof.^a Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad

Coorientadora

LAVRAS – MG

2022

AGRADECIMENTOS

O presente projeto foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Lavras, à Pós-Graduação em Zootecnia e ao Departamento de Zootecnia pela realização do curso de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para a realização do doutorado.

Ao Prof. Paulo Borges Rodrigues, pela orientação, por toda ajuda, disponibilidade, conhecimentos transmitidos e incentivo à pesquisa.

À Prof.^a. Flávia Saad, pela orientação, paciência, estímulo à pesquisa científica, pelos conhecimentos ensinados nessa longa jornada que se iniciou com uma grande admiração ainda na graduação e se estende até hoje.

Aos membros da banca examinadora pela contribuição e pelo aceite do convite em fazer parte desse momento tão importante.

À empresa Archer Daniels Midland (ADM) pelo financiamento do projeto.

Aos meus pais que foram essenciais para a conclusão dessa etapa e todas as que já venci até hoje. Nunca serei capaz de retribuir todo esforço, amor, carinho e dedicação que vocês têm por mim. Tudo que conquistei foi graças ao esforço e incentivo de vocês dois. Obrigada por tanto!

Ao Matheus Terra Abreu pelo apoio durante os momentos mais difíceis da pós-graduação.

Aos amigos que torceram por mim, em especial à Roberta Freitas Lacerda que foi uma grande companheira e sempre esteve presente e pronta a ajudar nos momentos mais difíceis (e foram muitos!).

À Tatiana Leite pela ajuda na condução do projeto e por todo carinho com os animais do setor.

Ao Luiz Eduardo Duarte de Oliveira, pela ajuda nas coletas de sangue, pela paciência, pelos conhecimentos compartilhados, pelas risadas e por transformar os dias de trabalho mais leves todas as vezes que esteve presente.

À Stefania Souza por toda ajuda na realização das análises laboratoriais, pelo esforço, empenho, dedicação e carinho. E por todo conhecimento transmitido nas intermináveis leituras de placa.

Ao Olivier Capet pela confiança para condução desse projeto, pela cordialidade e pela grande oportunidade que me foi dada.

À Waleska Silva e Daniel Dias pela imensa ajuda na condução do experimento, pela confiança, pela dedicação. Foram dias intensos, de muito trabalho e muita força de vontade para que tudo desse certo. Foi uma honra trabalhar com vocês.

A todos os cães utilizados nesse projeto e a todos os animais experimentais que são a peça fundamental de todo trabalho e contribuem para o avanço das pesquisas científicas e para a melhora da qualidade de vida de milhares de cães domiciliados.

RESUMO GERAL

Buscando melhorar a qualidade de vida dos cães durante a senilidade, a inclusão na dieta de aditivos nutracêuticos que modulem ou estimulem o sistema imune dos animais de companhia, ganharam destaque, com o objetivo de diminuir ou prevenir o progresso de alterações metabólicas e minimizar os sintomas clínicos do envelhecimento. Vinte e quatro cães da raça American Foxhound, com idade entre oito e 10 anos, de ambos os sexos, foram divididos em 3 grupos com oito cães cada. Cada grupo recebeu um tipo de ração seca e extrusada sendo, controle - ração premium especial sem inclusão de aditivos nutracêuticos; Tratamento 1 - ração super premium com a inclusão de selênio proteínato: 0,7373 ppm, zinco quelato com glicina: 230 ppm e vitamina C: 200mg/kg; Tratamento 2 - ração super premium com a inclusão de selênio proteínato 0,7373 ppm, zinco quelato com glicina: 230 ppm, vitamina C: 200mg/kg, *Capsicum spp* + *Curcuma spp*: 0,02 %, eugenol + sacarina: 0,02 %, óleo de peixe: 0,25%, mananoligossacarídeo + frutoligossacarídeo: 0,40%. Todos os cães consumiram a dieta controle por 30 dias antes do início do experimento, após esse período, foram distribuídos nos tratamentos conforme descrito acima. Após 50 dias (dia 50 do experimento) consumindo as dietas foi realizado desafio antigênico com vacinação subcutânea contra *Leishmaniose* Visceral Canina, Leish-Tech (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea- SP). Após o desafio antigênico, os animais permaneceram recebendo as dietas experimentais por 21 dias, totalizando 71 dias de período experimental. Foram realizadas quatro coletas de sangue nos dias: 0 (um dia antes do início do fornecimento das rações experimentais), 50, 57 e 71 para a realização das análises de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), cortisol, interleucina 10 (IL-10), TNF- α , haptoglobina, mieloperoxidase (MPO), interferon gama e óxido nítrico. Não foi observada interação dieta x tempo ($p > 0,05$) para nenhuma variável. Entretanto, houve diferença ($p < 0,05$) entre as dietas e entre os tempos avaliados para o cortisol, com contraste significativo entre o grupo controle e entre os tratamentos 1 e 2. Para as variáveis SOD, IL-10 e TNF- α houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta. A resposta do MDA evidenciou diferenças ($p < 0,05$) entre as dietas avaliadas, com contraste significativo entre o controle e os tratamentos e entre os tratamentos 1 e 2. Na análise de MPO houve diferença ($p < 0,05$) entre as dietas com contraste significativo entre os tratamentos 1 e 2. A inclusão de aditivos nutracêuticos na dieta de cães idosos é eficaz em modular a resposta imune e melhorar as defesas antioxidantes.

Palavras-chave: cão, nutrição, senilidade, cúrcuma, antioxidantes.

GENERAL ABSTRACT

Seeking to improve dog's quality life during senility, the inclusion in the diet of nutraceutical additives that modify or stimulate the immune system of companion animals, gaining prominence, with the objective of preventing metabolic alterations and minimizing the conditions of aging. Twenty-four American foxhound dogs, aged between 10 and 10 years, genders, were divided into eight dogs in 3 groups of eight dogs. Each group received a type of dry and extruded feed, according, control - special premium feed without the addition of nutraceutical additives; treatment 1 - super premium feed with the inclusion of selenium proteinate: 0.7373 ppm, zinc chelate with glycine: 230 ppm and vitamin C: 200mg/kg; treatment 2 - super premium feed with the inclusion of selenium proteinate 0.7373 ppm, zinc chelate with glycine: 230 ppm, vitamin C: 200mg/kg, *Capsicum spp* + *Curcuma spp*: 0.02%, eugenol + saccharin: 0.02%, fish oil: 0.25%, mannanoligosaccharide + fructooligosaccharide: 0.40%. All dogs consumed the control diet for 30 days before the start of the experiment, after which they were distributed in the treatments as described above. After 50 days (day 50 of the experiment) consuming the diets, an antigenic challenge was performed with subcutaneous vaccination against Canine Visceral Leishmaniasis, Leish-Tech (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea-SP). After the antigenic challenge, the animals remained on the experimental diets for 21 days, totaling 71 days of experimental period. Four blood samples were taken on days: 0 (a day before the beginning of the experimental feed), 50, 57 and 71 for the analysis of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), cortisol, interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), haptoglobin, myeloperoxidase (MPO), interferon gamma and nitric oxide. Diet x time interaction ($p > 0.05$) was not observed for any variable. However, there was a difference ($p < 0.05$) between the diets and between the times evaluated for cortisol, with a significant contrast between the control group and between treatments 1 and 2. For the variables SOD, IL-10 and TNF- α there was a significant difference ($p < 0.05$) between the collection times. The MDA response showed differences ($p < 0.05$) between the evaluated diets, with a significant contrast between the control and treatments and between treatments 1 and 2. In the MPO analysis, there was a difference ($p < 0.05$) between the diets with significant contrast between treatments 1 and 2. The inclusion of additives in the diet of elderly dogs is effective in modulating the immune response and improving antioxidant defenses.

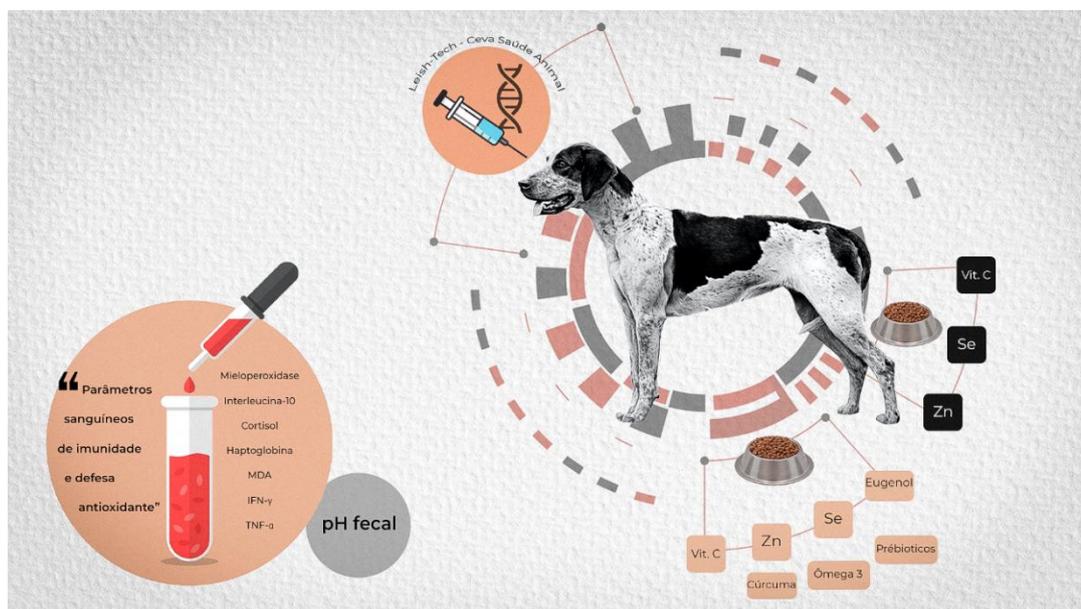
Keywords: dog, nutrition, senility, turmeric, antioxidants.

RESUMO INTERPRETATIVO

ADITIVOS NUTRACÊUTICOS EM RAÇÕES COMERCIAIS - IMUNIDADE E FUNÇÃO ANTIOXIDANTE DE CÃES IDOSOS

Elaborado por Moara Marina Belo Matos Silveira, orientada por Paulo Borges Rodrigues

O aumento na expectativa de vida dos cães trouxe novas preocupações para a fase da senilidade dos pets. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar a resposta imune e a função antioxidante de cães idosos, frente a adição de aditivos nutracêuticos na dieta. Os cães consumiram dietas contendo diferentes aditivos nutracêuticos que são descritos na literatura como possíveis moduladores do sistema imune e da função antioxidante. As dietas utilizadas foram: Controle - ração premium especial sem inclusão de aditivos nutracêuticos ; Tratamento 1 - ração super premium com a inclusão de selênio proteinato: 0,7373 ppm, zinco quelato com glicina: 230 ppm e vitamina C: 200mg/kg; Tratamento 2 - ração super premium com a inclusão de selênio proteinato 0,7373 ppm, zinco quelato com glicina: 230 ppm, vitamina C: 200mg/kg, *Capsicum spp* + *Curcuma spp*: 0,02 %, eugenol + sacarina: 0,02 %, óleo de peixe: 0,25%, mananoligossacarídeo + frutoligossacarídeo: 0,40%. Os cães foram desafiados com uma dose da vacina Leish-Tech e consumiram as dietas por 71 dias. Foram avaliados os parâmetros: malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), cortisol, interleucina 10 (IL-10), TNF- α , haptoglobina, mieloperoxidase (MPO), interferon gama e óxido nítrico plasmáticos. Houve diferença ($p < 0,05$) entre as dietas e entre os tempos avaliados para o cortisol, com de contraste significativo entre o controle e entre os tratamentos 1 e 2. Para SOD, IL-10 e TNF- α houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta. A resposta do MDA evidenciou diferenças ($p < 0,05$) entre as dietas avaliadas, com contraste significativo entre o controle e os tratamentos e entre os tratamentos 1 e 2. Na análise de MPO houve diferença ($p < 0,05$) entre as dietas com contraste significativo entre os tratamentos 1 e 2. Conclui-se que a inclusão dos aditivos nutracêuticos na dieta foi capaz de modular o sistema imune e melhorar as defesas antioxidantes de cães senis.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inclusão de aditivos nutracêuticos nas dietas experimentais.....	52
Tabela 2: Composição nutricional das dietas experimentais.....	52
Tabela 3: Parâmetros da função imune de cães idosos recebendo dieta com diferentes aditivos.....	57
Tabela 4: Parâmetros antioxidantes de cães idosos recebendo dieta com diferentes aditivos.....	61
Tabela 5: Contrastes ortogonais de cães idosos recebendo dieta com diferentes aditivos.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias metabólicas sintéticas dos ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega 6 e 3.....	14
Figura 2: Síntese de eicosanóides a partir de AGPI ômega 6 e 3.....	16
Figura 3: Mecanismo de ação do MOS sobre a adesão de bactérias patogênicas nos enterócitos.....	26
Figura 4: Estrutura da parede celular de levedura.....	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Composição básica das dietas experimentais e inclusão dos aditivos.....	51
---	----

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Senilidade e imunidade em cães	12
2.2 Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) da série ômega-3	13
2.3 Minerais (Zinco e Selênio)	18
2.4 Vitaminas (Ácido ascórbico e Tocoferol)	22
2.5 Prebióticos	25
2.6 Extratos Vegetais	30
2.7 Considerações Finais	33
REFERÊNCIAS	34
SEGUNDA PARTE	47
ARTIGO - Aditivos nutracêuticos podem modular o sistema imune e a função antioxidante de cães idosos	47

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo biológico complexo que determina a redução progressiva da capacidade de um indivíduo em manter a homeostase durante as situações de estresse fisiológico e ambiental (GOLDSTON; HOSKINS, 1995). Entretanto, o envelhecimento em si não deve ser considerado uma doença, e sim um processo que envolve perda progressiva da capacidade nos principais sistemas do organismo, o que altera as respostas frente aos fatores estressores e pode predispor a doenças.

Mudanças fisiológicas, que fazem parte do processo de envelhecimento, comprometem a habilidade do corpo em responder ao estresse ou mudanças e contribuem para a morbidade e mortalidade (SPARKES, 2011). Cuidados, principalmente com a nutrição do indivíduo, são necessários para que o envelhecimento ocorra da melhor forma possível sem grandes prejuízos à saúde e bem-estar dos animais. Melhorias na nutrição, cuidados de saúde e manejo fizeram com que muitos cães vivessem cada vez mais.

Durante toda vida, os animais são constantemente desafiados, e adaptações metabólicas produzem respostas inflamatórias eficientes. Essas respostas podem levar, com o passar do tempo, a ocorrência de doenças inflamatórias. Por outro lado, baixas respostas inflamatórias, tornam o indivíduo mais suscetível a doenças infecciosas (FRANCESCHI et al., 2007). Para a longevidade próspera, o animal deve encontrar meios de reduzir o impacto dos fatores pró-inflamatórios, mantendo os aspectos essenciais da imunidade protetora e prevenindo o aparecimento da imunidade deletéria.

A nutrição exerce papel determinante na modulação do sistema imunológico e antioxidante. Alguns nutrientes têm a capacidade de interferir na resposta imune por apresentar efeito regulatório direto sobre os leucócitos, alterando os índices de proliferação, padrão de produção de citocinas e diferenciação de populações leucocitárias específicas.

Os avanços na nutrição de animais de companhia frequentemente seguem as tendências da nutrição humana. Os conceitos de nutrição estão se expandindo para além da manutenção das atividades metabólicas e satisfação da fome para priorizar a utilização de alimentos que promovam bem-estar e melhora na saúde, além de reduzir risco de doenças.

Dessa forma, as pesquisas com inclusão de aditivos que modulam ou estimulam o sistema imune dos animais de companhia ganharam destaque. Alguns nutrientes tem a capacidade de interferir na resposta imune por apresentar efeito regulatório direto sobre os

leucócitos, alterando os índices de proliferação, padrão de produção de citocinas e diferenciação de populações leucocitárias específicas (KIM et al., 2013).

Os esforços estão voltados para a determinação de ingredientes e aditivos que incluídos na ração possam promover melhor qualidade de vida durante a senilidade dos cães, e, assim, diminuir ou prevenir o progresso de alterações metabólicas e minimizar os sintomas clínicos do envelhecimento.

A dieta com antioxidantes tem mostrado resultado no tratamento de doenças cognitivas nos animais, eles não revertem totalmente a lesão, mas retardam o aparecimento dela, sendo que seriam melhor aproveitados se fossem dados durante toda a vida e não só na idade avançada (DZANIS, 2008).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Senilidade e imunidade em cães

O envelhecimento é um processo biológico complexo que determina a redução progressiva da capacidade de um indivíduo em manter a homeostase durante as situações de estresse fisiológico e ambiental (GOLDSTON, 1995). Entretanto, o envelhecimento em si não deve ser considerado uma doença, e sim um processo que envolve perda progressiva da capacidade de reserva funcional nos principais sistemas do organismo, o que altera as respostas frente aos fatores estressores e pode predispor a doenças.

Durante toda uma vida, os animais são constantemente desafiados, e adaptações metabólicas produzem respostas inflamatórias eficientes. Essas respostas podem levar a ocorrência de doenças inflamatórias com o passar do tempo. Por outro lado, baixas respostas inflamatórias tornam o indivíduo mais suscetível a doenças infecciosas (FRANCESCHI et al., 2007). Para a longevidade próspera, o animal tem que achar meios de reduzir o impacto dos fatores pró-inflamatórios, mantendo os aspectos essenciais de imunidade protetora e prevenindo o aparecimento da imunidade deletéria.

Um bom exemplo do status imunológico dos animais é a resposta à vacinação. Um estudo comparativo de 32 cães jovens (idade média de 3,15 anos) e 33 cães idosos (idade média de 12,1 anos) que receberam vacinação multivalente anual revelaram concentrações semelhantes de anticorpos séricos ao vírus da cinomose canina (CDV) e parvovírus canino (CPV), antes da vacinação dos animais. Cães jovens e idosos apresentaram respostas sorológicas semelhantes ao CDV e ao CPV após a vacinação de reforço, mas os cães jovens apresentaram uma resposta maior à vacinação antirrábica (HOGENESCH et al., 2004).

Contrariamente, um estudo com 14.035 cães recebendo um tratamento primário de vacina contra o vírus da raiva antes de viagens internacionais demonstrou que os animais mais velhos tiveram uma chance significativamente maior de não alcançar o título vacinal necessário de 0,5 UI / ml (MANSFIELD et al., 2004).

Uma vez que animais idosos podem apresentar menor resposta vacinal, o estudo de moduladores da imunidade pode ser mais eficaz nessa faixa etária, pois os efeitos se tornam mais acentuados e facilitam a constatação estatística das variáveis estudadas.

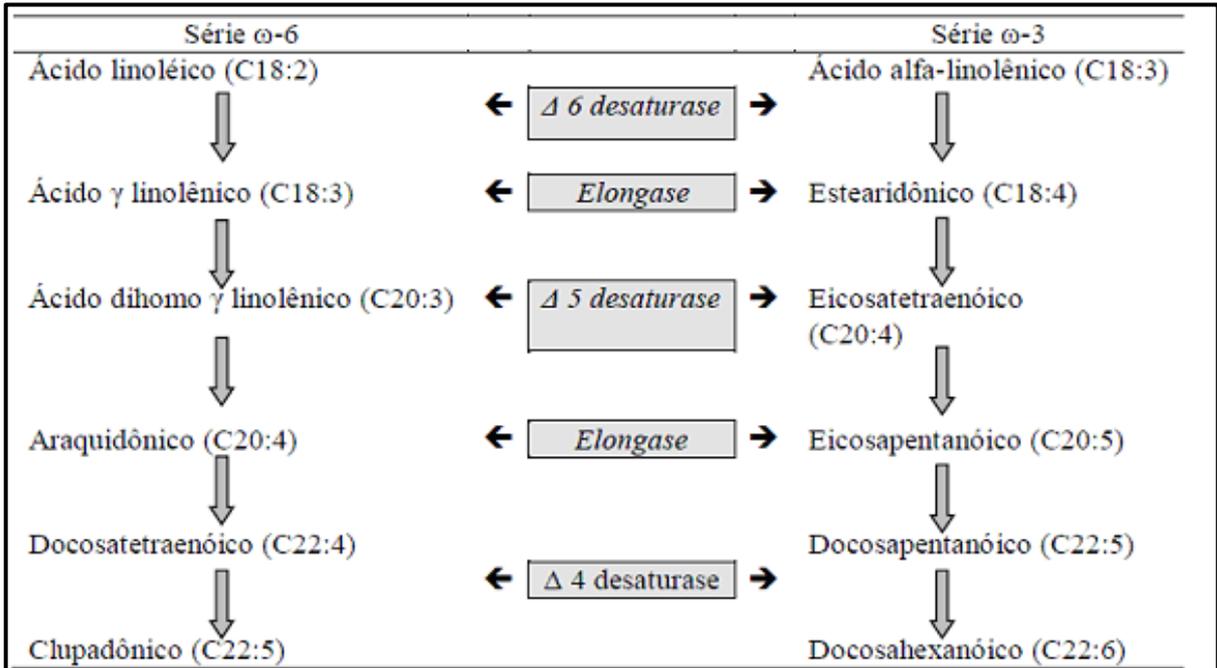
2.2 Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) da série ômega-3

Os ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonetos com número variável de átomos de carbono, sendo classificados quanto ao número de carbonos na cadeia, o número de duplas ligações e a localização da primeira ligação dupla. É importante conhecer esta composição, pois a estrutura dos ácidos graxos está intimamente ligada aos seus efeitos no metabolismo celular (FREEMAN, 2010).

A família ômega-3 é assim denominada pela primeira dupla ligação da cadeia estar entre o terceiro e o quarto carbono. São considerados ácidos graxos essenciais pois os cães não podem sintetizá-los e devem ser recebidos pela dieta (NRC,2006). Estes ácidos graxos são incorporados aos fosfolipídios da membrana celular no organismo, atuando sobre sua integridade e fluidez, além de possuir papel importante na sinalização e permeabilidade celular (CALDER, 2008; TORREJON et al., 2007).

O precursor da família ômega-3 é o ácido graxo alfa-linolênico. Sua denominação molecular é C18: 3 Ω 3, o que indica que a molécula apresenta 18 átomos de carbono, 3 duplas ligações e que a primeira dupla ligação está no terceiro carbono (Ω 3). Pela ação das enzimas dessaturase e alongase os animais aumentam a estrutura química da molécula (Figura 1), sintetizando o ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5 Ω 3) e o ácido docosaenoico (DHA; C22:6 Ω 3). Esta conversão, no entanto, é limitada no cão e não ocorre no gato, de modo que para uma ação fisiológica correta deve-se suplementar na dieta destes animais carnívoros diretamente o EPA e o DHA (BAUER, 2011).

Figura 1: Vias metabólicas sintéticas dos ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega 6 e 3.



Fonte: Briz, 1997.

Quando existe uma injúria física ou bioquímica, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são liberados das membranas celulares pelas fosfolipases e transformados pelas enzimas lipoxigenase e cicloxigenase, formando os eicosanóides. O termo eicosanóide é usado para caracterizar um grupo de compostos oxigenados a partir de ácidos graxos de vinte carbonos (SMITH; MURPHY, 2016). Eicosanóides são hormônios parácrinos, caracterizados por serem substâncias que atuam apenas em células próximas ao local onde são sintetizados, ao invés de serem transportados pelo sangue e atuar em células de outros tecidos e órgãos (NELSON; COX, 2005). Os eicosanóides não são armazenados nas células, são sintetizados e liberados rapidamente (5 – 60 segundos) em resposta a estímulo hormonal extracelular (SMITH; MURPHY, 2016). São constituídos de três grupos: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.

Durante uma resposta inflamatória, a liberação e o metabolismo de AGPI Ω -6 produz prostaglandinas da série-2, leucotrienos da série-4, ácido 12-hidroxeicosatetraenoico (12-HETE) e tromboxanos A₂. Esses agentes são imunossupressores e atuam como potentes mediadores inflamatórios.

A prostaglandina E₂ (PGE₂) induz a febre, promove vasodilatação aumento da permeabilidade vascular, potencializa a dor e o edema. Além de possuir um efeito imunossupressor, devido à inibição da proliferação de linfócitos e células natural killer (NK) e

da produção de IL-2 e IFN- γ . Por outro lado, a PGE2 também possui características anti-inflamatórias quando inibe a produção de TNF- α e IL-1 (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

O leucotrieno B4 (LTB4) aumenta a permeabilidade vascular, atuando como potente agente quimiotático para leucócitos, induzindo a liberação de enzimas lisossomais, aumenta a produção de TNF α , IL-1, IL-6, IL-12 e IFN- γ (ANDRADE; CARMO, 2006).

Em contraste, a liberação e o metabolismo de AGPI Ω -3 (especificamente o EPA) produz mediadores de menor atividade inflamatória. Estes compostos são anti agregantes e, em níveis normais, não são imunossupressores e vasos dilatadores. Incluem prostaglandinas da série-3, leucotrienos da série-5, ácido hidroxicicosapentaenóico (HEPE) e tromboxanos A3 (CASE et al., 2010; ROSYCHUK et al., 2000).

Os AGPI Ω 3 são substratos para a formação das resolvinas, termo relacionado aos produtos formados na fase de resolução da inflamação. As resolvinas foram primeiramente descritas para indicar a formação de moléculas mediadoras com capacidade anti-inflamatória e com propriedades imunomodulatórias, incluindo a redução da migração de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias reduzindo a resposta inflamatória. As resolvinas da série E são formadas principalmente a partir do EPA e as resolvinas da série D principalmente a partir do DHA (BARBALHO et al., 2011).

Uma nova classe de mediadores lipídicos do tipo pró-resolvinas formadas a partir de DHA por macrófagos foi recentemente identificada. A descoberta desta substância foi feita a partir de estudos que utilizaram exsudatos colhidos de ratos sofrendo de peritonite. A atividade destas substâncias, nominadas maresinas, tem potencial próximo ao das resolvinas da série E (NORLING; SERHAN, 2010).

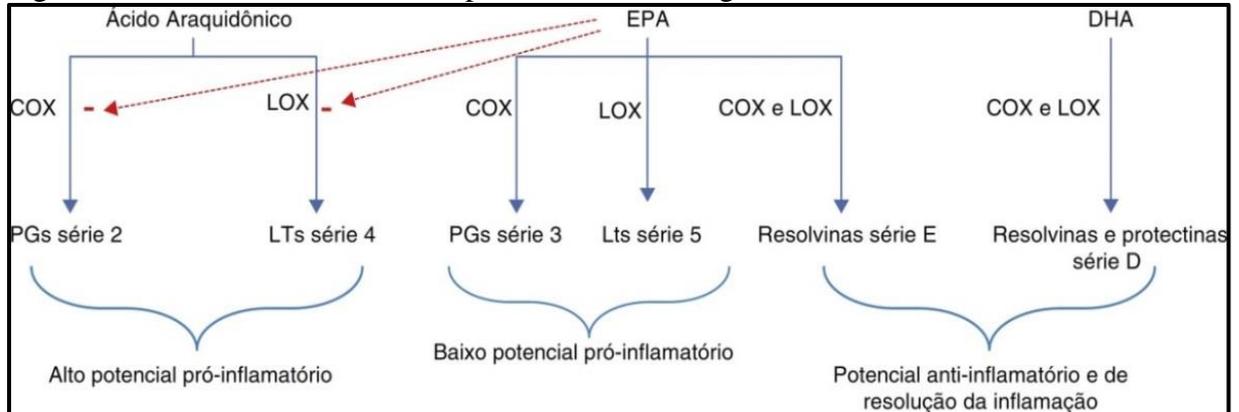
O início e o fim do processo inflamatório são de extrema importância para o organismo. O início é imprescindível para que seja feita a defesa ao trauma ou ao microrganismo invasor, e o término é necessário para que não sejam maximizadas as reações inflamatórias e outros danos tissulares sejam desencadeados, o que culminaria em uma doença.

O perfil de eicosanóides sintetizados é determinado pela disponibilidade e tipo de AGPI precursores nas membranas celulares, assim como pela atividade dos sistemas enzimáticos metabólicos envolvidos. Os AGPI Ω -6 e Ω -3 produzem diferentes famílias de eicosanóides (Figura 2), além de competir pelas mesmas rotas metabólicas (CASE et al., 2010).

A incorporação de EPA e DHA na dieta pode influenciar a estrutura lipídica das membranas celulares e as respostas fisiológicas que dependem destas membranas, como é o caso dos mecanismos de sinalização celular. Os AGPI Ω 3 obtidos da dieta podem colaborar

com a diminuição dos processos inflamatórios e diminuir a incidência de doenças relacionadas à inflamação.

Figura 2: Síntese de eicosanóides a partir de AGPI ômega 6 e 3.



Fonte: Borges et al. 2014.

Wander et al. (1997) avaliaram a inclusão de óleo de peixe em substituição ao óleo de milho em dietas comerciais úmidas para Beagles entre 9.5 e 11.5 anos de idade. Vinte animais foram divididos em três tratamentos com diferentes relações $\Omega 6:\Omega 3$ (31:1; 5,4:1 e 1,4:1). Após 8 semanas de alimentação com as dietas experimentais foi verificado aumento na concentração plasmática de $\Omega 3$ nos animais que consumiram uma dieta com maior inclusão de óleo de peixe. Também foi observada redução na produção de PGE2 por células mononucleadas no grupo com relação $\Omega 6:\Omega 3$ de 1,4:1. Se um aumento no consumo $\Omega 3$ altera a produção de eicosanóides então, também é esperado que altere a produção de citocinas. Como as células do sistema imunológico são a principal fonte e o principal alvo das citocinas, a mudança na produção de citocinas pode ter grande impacto na resposta imune.

LeBlanc et al. (2008) estudaram a inclusão de óleo de girassol, óleo de peixe e óleo de peixe + vitamina E na dieta de cães. Foram utilizados 15 cães sem raça definida de 1 a 4 anos de idade. Após 12 semanas consumindo as dietas, os cães foram desafiados com injeção intravenosa de LPS de *Escherichia coli*. Houve redução na concentração de PGE2, interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1) séricas no grupo que recebeu o óleo de peixe na dieta, comparados ao grupo com inclusão de óleo de girassol e óleo de peixe mais vitamina E.

Monócitos e macrófagos são as principais células produtoras de IL-1, produzindo principalmente IL-1 β , enquanto os queratinócitos produzem IL-1 α . As atividades biológicas primordiais da IL-1 incluem a estimulação de células CD4+ a secretar IL-2 e produzir receptores para a IL-2; proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias. Estimula a

adesão de leucócitos, aumenta a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais, inibe a proliferação das células endoteliais, aumenta a atividade de coagulação (AREND, 1991). A IL-1 também estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda (MONROY et al., 1992).

A IL-6 pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo as células B, T e monócitos as principais fontes. Os estímulos para a sua síntese são IL-1, LPS e TNF- α . A IL-6 controla a resposta imune antígeno específica e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação, além de estimular a produção de proteínas da fase aguda nos hepatócitos. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (HEINRICH et al., 1990).

Em estudo conduzido com suínos em fase de terminação, foi avaliado o efeito da inclusão de óleo de linhaça em dietas com sebo bovino como fonte de lipídeo sobre a resposta imunológica dos animais. Os suínos foram desafiados com LPS de *Escherichia coli*. Foi verificada redução na concentração sérica de cortisol, TNF- α e PGE2 nos animais que receberam óleo de linhaça como fonte de ômega 3 em relação ao grupo alimentado somente com sebo bovino (UPADHAYA et al., 2015).

Os AGPI ômega-3 são conhecidos por reduzirem competitivamente a biossíntese de PGE2 pela redução da disponibilidade de enzimas necessárias para a conversão de ácidos graxos ômega-6 em ácido araquidônico, que é um precursor para a produção de PGE2 (WALL et al., 2010).

Recentemente foi realizado um estudo com Beagles adultos avaliando a inclusão de óleo de soja + DHA e sebo bovino na ração desses animais. Não foi relatada rejeição das dietas pelos animais e o escore fecal foi similar entre os tratamentos. As concentrações séricas de superóxido dismutase, glutathione peroxidase e TBARS não diferiram entre as dietas. Estes resultados foram inesperados, uma vez que o consumo de alimentos ricos em AGPI poderia aumentar a atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao aumento do estresse oxidativo (PACHECO et al., 2018). A ausência de resultados significativos também poderia ser explicada pelo fato de não ter sido aplicado nenhum tipo de desafio nos cães.

As doses e as fontes de ômega 3 empregadas nos estudos com cães são bastante variáveis e imprecisamente definidas. Sugere-se que o fornecimento de óleo de peixe deve ser de 1 grama para cada 4,5 kg de peso corporal, pois para exercerem efeito são necessários ao menos 50 a 60 mg de EPA mais DHA por quilograma de peso corporal (FREEMAN, 2010)

2.3 Minerais (Zinco e Selênio)

O zinco (Zn) é um importante oligoelemento envolvido na formação de mais de 300 tipos de metaloenzimas que interferem nos processos bioquímicos de todo o organismo (KOO et al., 2014). Essas metaloenzimas estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento, síntese de DNA, metabolismo de carboidratos e proteínas, imunidade, funções neurosensoriais e antioxidantes, além de outros processos celulares importantes (WOOD, 2000).

Todos os animais necessitam de um suprimento contínuo de Zn na dieta devido às reservas limitadas desse mineral prontamente disponível no organismo. A exigência de Zn varia com a função do animal e a natureza de sua dieta. Animais jovens em crescimento e adultos em reprodução requerem níveis mais elevados de Zn do que adultos em manutenção (NRC, 2006).

O sistema imunológico é um dos principais sistemas beneficiados pela suplementação de Zn. O Zn interfere no sistema imune através de diferentes mecanismos, pois exerce efeito sobre a estabilidade da membrana dos linfócitos, assim como sobre diferentes enzimas. Mantém a estabilidade da membrana celular, prevenindo a lesão peroxidativa, protegendo a célula do estresse oxidativo induzido pelas citocinas no processo inflamatório (KOURY; DONANGELO, 2003; MOCHEGANI et al., 2000). Outro papel importante do Zn se dá pelo fato de as células do sistema imune apresentarem altas taxas de proliferação e, este mineral estar envolvido na tradução, transporte e replicação do DNA. Durante a deficiência de Zn, alguns estudos demonstraram uma diminuição na razão CD4:CD8, além da diminuição de precursores de linfócitos-T citotóxicos. O desequilíbrio do sistema imunológico pode ser afetado por essa modificação nas proporções de linfócitos, afetando sua resposta e sua regulação (SALGUEIRO et al., 2000).

As células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e as células natural killer, constituem a primeira linha de defesa do corpo e são conhecidos como resposta imune celular não-específica (BONHAM et al., 2002). Esses mediadores são afetados pelo Zn durante sua deficiência em animais e humanos (FRAKER et al., 1978; SINGH et al., 1993).

A resposta imune celular específica inclui o sistema de linfócitos T e B. Estas células são responsáveis pela síntese de anticorpos, pelo estabelecimento de resistência e morte do microrganismo invasor (BONHAM et al., 2002). A função das células T foi afetada em humanos com deficiência moderada de Zn. A participação desse mineral na resposta imune celular específica é realizada através do seu papel na expansão clonal de linfócitos (SHANKAR; PRASAD, 1998), pela inibição da apoptose (ZALEWSKI, 1996) e pela

manutenção da integridade da membrana celular, através da ligação do zinco ao grupamento tiol (KING; KEEN, 2003).

O zinco e o cobre participam da composição da enzima superóxido dismutase (SOD). A superóxido dismutase é responsável por acelerar a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é então reduzido pela glutatona peroxidase em água (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Isso evita que o radical livre ataque lipídeos de membrana, resultando na produção de compostos como o malondialdeído (MDA) (MACMILLAN-CROW; CRUTHIRDS, 2001).

She et al. (2017) avaliaram a inclusão de diferentes níveis e fonte de Zn para leitões desmamados com 28 dias de idade. Os animais foram distribuídos em 3 grupos. Controle: dieta deficiente em Zn (24 mg/kg de suplementação de Zn); Controle + 120 mg/kg de ZnSO₄; Controle + 120 mg/kg de Zn complexado com proteínas. Verificou-se que a deficiência de Zn aumentou a concentração de MDA no fígado e baço e reduziu Cu-Zn SOD e Mn SOD no baço e fígado, confirmando que a inclusão do mineral na dieta aumenta a proteção das células contra peroxidação lipídica. Melhorar a resistência oxidativa é uma das rotas pelas quais o Zn é conhecido por beneficiar o sistema imunológico (HILL et al., 2014). Outros dados interessantes foram encontrados nesse estudo: aumento na concentração no baço de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10), além de redução de IFN- γ , maior população de linfócitos T CD4⁺ e menor população de CD8⁺.

IL-4 e IL-10 são citocinas anti-inflamatórias secretadas principalmente por linfócitos T ativados (SOUZA et al., 2008). Aumento da produção de IL-4 e IL-10 implica em melhor proteção contra possíveis causas da inflamação. Além disso, IL-4 e IL-10 são considerados importantes fatores de crescimento para linfócitos T ativados por antígenos e são citocinas chave no ciclo de proliferação de linfócitos T.

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória e também é secretado por linfócitos T ativados. Tem sido demonstrado que o IFN- γ pode modular a secreção de quimiocinas em resposta às outras citocinas e afetar a adesão celular e a transmigração (SHE et al., 2017).

As células T auxiliares (Th), como os linfócitos T CD4⁺, desempenham um papel fundamental nos processos intermediários da resposta imune. O linfócito T CD8⁺ é principalmente citotóxico, pode matar as células-alvo diretamente. Portanto, uma alta relação CD4⁺: CD8⁺ indica bom funcionamento do sistema imune.

Avaliando a inclusão de Zn na dieta de leitões de 28 dias de idade, Pei et al. (2019) encontraram aumento na concentração de IgA e redução de IgM no sangue, além de menor

contagem de *Escherichia coli* no ceco, cólon e reto quando o Zn foi incluído em alta dosagem (3000 mg/kg ZnO) ou quando incluído em baixa dosagem porém, na forma de nano partículas (450 mg/kg), comparados à dieta controle com 100 mg/kg de ZnO.

Os anticorpos séricos são componente essencial da imunidade inata e adaptativa (MANZ et al., 2005). O aumento de IgA e redução de IgM relatado no estudo acima pode ser resultado do mecanismo pelo qual a IgM aparece antes da IgA durante a resposta imunológica e tem uma meia-vida mais curta. Assim, a concentração de IgM diminuiu mais cedo do que a IgA e, altas doses de Zn promovem esse estágio do processo imunológico, mas o mecanismo exato permanece incerto (DARDENNE, 2002).

O selênio (Se) é um oligoelemento essencial principalmente para proteção contra o estresse oxidativo (TINGGI, 2008). As recomendações atuais incluem uma margem de segurança para evitar a perda de proteção antioxidante em baixas concentrações e o risco de toxicidade do Se em altas concentrações. Sabe-se que a produção de sinais tóxicos na maioria das espécies ocorre em dietas que contenham 5 ppm (5000 ppb) de Se (SAAD, 2005).

A suplementação de Se tem principalmente a função imune estimulante, que é medida por uma gama de parâmetros, incluindo proliferação de células T, atividade de células NK, funções de células imunes inatas, entre outros.

O Se e a vitamina E juntos são necessários para o correto funcionamento do sistema imune do animal. Três mecanismos determinam o efeito imunomodulatório do Se: 1) efeitos anti-inflamatórios; 2) sistema antioxidante; e 3) propriedades citostáticas e anticancerígenas. Melhora na resposta imunológica e proteção contra certas infecções virais são observadas quando doses suplementares de Se são administradas, conferindo adicionais benefícios à saúde (MATEOS et al., 2004). A deficiência de Se pode afetar tanto a imunidade natural quanto a imunidade adquirida (SURAI, 2003).

Os efeitos biológicos do Se são exercidos principalmente por sua incorporação em selenoproteínas. Essas por sua vez estão envolvidas na ativação, proliferação e diferenciação de células que conduzem respostas imunes inatas e adaptativas. Nas células, o Se dietético pode influenciar várias funções efetoras dos leucócitos, incluindo adesão, migração, fagocitose e secreção de citocinas.

A suplementação alimentar com Se também demonstrou restaurar o declínio relacionado à idade nas respostas proliferativas de linfócitos à estimulação de mitógenos (através da regulação positiva dos receptores de IL-2) em camundongos (ROY et al., 1995) e na função das células NK em idosos (RAVAGLIA et al., 2000). É provável que o Se exerça seu

efeito alterando o status redox das células (MCKENZIE et al., 1998) ou atendendo aos crescentes requisitos de selenoproteínas da células imunes ativadas.

As selenoproteínas são necessárias para o equilíbrio do sistema antioxidante, o metabolismo normal da tireóide, ocorrência de reações redox, para adequado funcionamento do sistema imune, e formação de espermatozoides (RAYMAN, 2000). A atividade redox das selenoproteínas pode ocorrer na sinalização dentro das células (tioredoxinas redutases) ou na proteção das células contra danos oxidativos (glutationas peroxidases e selenoproteínas K, R e W) (BEHNE; KYRIAKOPOULOS, 2001).

Nos mamíferos, cinco de um total de sete glutathiona peroxidases identificadas contém Se como selenocisteína (GPx1–4 e GPx6) e outras duas contendo enxofre como cisteína no local ativo (PAPP et al., 2007). Elas são responsáveis por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos à água ou o correspondente, protegendo as células contra oxidação (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2006).

A GSH-Px 1 é encontrada no citosol de todas as células do organismo e, além de sua função antioxidante, parece ser uma forma de armazenagem de Se no organismo. A GSH-Px 2 ou gastrintestinal é específica do trato gastrintestinal e a GSH-Px 3 ou plasmática ou extracelular é encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos. A GSH-Px 4 atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas (RAYMAN, 2000).

A selenoproteína K tem uma função antioxidante no coração (LU et al., 2006) mas também está presente no músculo esquelético, pâncreas, fígado e placenta (KRYUKOV et al., 2003). A selenoproteína R catalisa a redução da metionina oxidada e é necessária para o reparo de proteínas danificadas por oxidação (KIM; GLADYSHEV, 2004). A selenoproteína W possui ação antioxidante e é encontrada nos músculos cardíacos e esqueléticos (BECKETT; ARTHUR, 2005).

As fontes de Se para a produção de selenoproteínas podem ser orgânicas: selenocisteína e selenometionina ou inorgânicas: selenito e selenato (BEHNE; KYRIAKOPOULOS, 2001). A maior vantagem em se suplementar animais com Se orgânico não está na maior absorção, pois as formas inorgânicas também são bem aproveitadas e suprem as deficiências e, sim, na melhoria do status antioxidante que, muitas vezes, não é atingido com a suplementação de Se inorgânico (PEHRSON, 1998).

Atualmente, a maioria dos alimentos secos e enlatados para cães usa um tipo inorgânico de Se, selenito de sódio ou selenato de sódio. Além do Se presente nos ingredientes dos

alimentos, fontes adicionais desse mineral são incluídas nas formulações da dieta. Como o Se inorgânico não pode ser armazenado no corpo, as formas orgânicas estão sendo cada vez mais usadas, pois são mais seguras e eficazes (SHARADAMMA et al., 2011).

Broome et al. (2004) forneceram 0, 50 ou 100 µg de Se na forma de cápsulas a seres humanos diariamente por 15 semanas e constataram que a suplementação aumentou as porcentagens totais de células T e de células CD4+. A proliferação das células T ocorreu mais rapidamente em indivíduos suplementados do que nos que receberam placebo sugerindo que os grupos que receberam Se tiveram a habilidade em aumentar a resposta imune.

Putarov (2014) investigou a inclusão de selenito de sódio ou Se-levedura em rações para cães adultos nas seguintes dosagens: 0,33 ppm, 0,66 ppm ou 0,99 ppm. O Se em doses superiores aos valores mínimos recomendados não influenciou a resposta imunológica de cães adultos, a qual também não foi influenciada pelas fontes de Se.

2.4 Vitaminas (Ácido ascórbico e Tocoferol)

Vitamina E é um termo genérico para os derivados tocol e tocotrienol que exibem atividade biológica do alfa-tocoferol. Todos os oito isômeros do tocoferol são isolados de alimentos de origem vegetal. O alfa-tocoferol tem grupos metil nos carbonos 5, 7 e 8 dos anéis fenólicos do 6-cromanol e seu sítio biologicamente ativo da molécula é o grupo 6-hidroxil no anel fenólico, o qual é capaz de doar hidrogênio na reação com os radicais livres.

No metabolismo normal, em contato com radicais livres, o alfa-tocoferol é reversivelmente oxidado ao radical alfa-tocoferil cromanoxi e, posteriormente, reduzido por agentes como a glutathione e ácido ascórbico. Desta forma, é importante que as concentrações plasmáticas de ascorbato e glutathione também estejam adequadas. Outro caminho seguido pelo alfa-tocoferil cromanoxi é o seu metabolismo hepático (NRC, 2006).

Os compostos antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos (dismutases, catalases, peroxidases ou redutases) ou não enzimáticos (endógenos ou exógenos). São antioxidantes não enzimáticos e produzidos endogenamente, o ácido lipoico, arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, complexos proteína-metais, ferritina, etc. Dentre antioxidantes adquiridos pela dieta, os mais comumente encontrados nos alimentos são a vitamina E, vitamina C (também produzida endogenamente), carotenoides, oligoelementos (cobre, ferro, zinco, selênio e manganês), flavonoides, dentre outros (PHAM-HUY et al., 2008).

A vitamina E é o maior antioxidante lipossolúvel no plasma, eritrócitos e demais tecidos, nos quais sua principal função é o sequestro de radicais livres para prevenir a oxidação dos

AGPI das membranas celulares. Também apresenta funções na modulação da síntese de prostaglandinas, no entanto, a função antioxidante parece ser a principal (NRC, 2006).

A quantidade de vitamina E exigida nos alimentos depende da taxa de produção de radicais livres pelo organismo, da composição de AGPI na dieta e outros compostos dietéticos como o Se, por exemplo, necessário para a síntese de glutathione peroxidase (NRC, 2006). A recomendação da Association of American Food Control Officials (AAFCO, 2010) mínima de 50 UI de alfa-tocoferol por quilograma de alimento (UI/kg).

As informações sobre toxicidade da vitamina E são pouco estudadas em cães, no entanto, sabe-se que a utilização de elevadas concentrações nos alimentos prejudica a absorção das vitaminas A e K, apesar de estudos com dosagens extremamente elevadas em cães terem falhado em demonstrar efeitos tóxicos. Em humanos, a ingestão de aproximadamente 75 UI/kg melhorou a condição de saúde de pacientes (DEVARAJ et al., 2007).

O sistema imunológico é particularmente sensível aos efeitos do estresse oxidativo. As células deste sistema dependem fortemente da comunicação célula-célula, particularmente via receptores ligados à membrana, para trabalhar efetivamente. As membranas celulares são ricas em AGPI, os quais quando oxidados, prejudicam a fluidez de membrana e conseqüentemente a cascata de sinalização intracelular pela qual as células se comunicam (HUGHES, 1999).

Brady et al. (1979) avaliaram a suplementação de vitamina E (50 UI/kg) na dieta de ratos que sofreram estresse intencional por exercício forçado (natação). Foi observado que a suplementação reduziu os níveis de antioxidante e de TBARS no fígado vinte e quatro horas após o stress por exercício, indicando que a vitamina E na dieta reduziu o efeito peroxidativo do exercício.

Zhao et al. (2011) estudaram o efeito da suplementação de vitamina E na dieta de pintinhas de 1 dia até 47 dias de vida. Todos os animais foram vacinados contra o vírus da Doença de New Castle, Influenza Aviária e Doença Infecciosa da Bursa de Fabricius. Trinta e seis dias após a última vacinação as aves foram desafiadas com injeção intra-abdominal de *Escherichia coli*. A inclusão de vitamina E (40 e 100 UI/kg) aumentou os títulos de anticorpos contra Doença de New Castle e Influenza Aviária. Também foi verificada redução na relação heterofilo: linfócito 72 horas após o desafio pela *Escherichia coli*. O heterofilo é o principal leucócito nas aves, são células fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória e estão envolvidos no ataque a bactérias por meio de quimiotaxia, opsonização, fagocitose e lise (CAPITELLI; CROSTA, 2013). Em geral, se considera que os heterofilos das aves correspondem aos neutrófilos dos mamíferos. Uma alta relação entre heterofilo e linfócitos

indica uma situação de estresse, sendo que a proporção normal está em torno de 1:2. (MACARI, 2002).

Devido a carência de trabalhos com cães avaliando a influência da suplementação de vitamina E sobre parâmetros imunológicos, os trabalhos acima foram escolhidos para relatar que existem estudos em outras espécies que relatam a eficácia dessa vitamina sobre o sistema imune.

A vitamina C (ácido ascórbico) é uma importante vitamina hidrossolúvel que possui funções antioxidantes, anticarcinogênicas e imunomoduladoras no organismo (VILLACORTA et al., 2007), podendo restaurar as habilidades antioxidantes da vitamina E, sugerindo que uma de suas principais funções é reciclar o radical tocoferil. Nesse sistema, a vitamina E provavelmente atua como antioxidante primário e a vitamina C pode regenerar o radical produzido pela vitamina E (WENK et al., 2000). Dessa maneira, a molécula regenerada de vitamina E está novamente disponível para ação antioxidante ou pode ser armazenada (EICHENBERGER et al., 2004).

Adicionalmente é relatado na literatura que a vitamina C auxilia nas funções dos fagócitos, na produção de citocinas, na proliferação de linfócitos T e na expressão gênica das moléculas de adesão dos monócitos (GREDEL, 2012; SORICE et al., 2014).

O efeito conjunto do ácido ascórbico e da vitamina E já é bem conhecido na literatura, evidenciando que a interação dessas vitaminas é essencial na inibição da peroxidação dos lipídios da membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998). O ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno combinados tem uma ação mais efetiva, isso porque esses nutrientes podem interagir no ambiente celular e intensificar a defesa antioxidante (NIKI et al., 1995) resultando, por exemplo, em proteção contra danos oxidativos nas células (ANDERSON, 1996; COZZI et al., 1997; POOL-ZOBEL et al., 1997). A vitamina E age protegendo a membrana da célula rica em lipídios prevenindo a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Uma falha para evitar a oxidação pode resultar em perda da integridade de membrana e provocar a ruptura celular. A vitamina E não pode ser sintetizada pelo corpo e, por esta razão, é considerada um nutriente essencial da dieta. Já a vitamina C age como antioxidante dentro e fora da célula e pode ser sintetizada pelos cães, entretanto a suplementação pode ser benéfica, particularmente em momentos de stress (NRC, 2006).

Hesta et al. (2009) investigaram a capacidade da vitamina C em aumentar o potencial antioxidante e imunomodulador em cães saudáveis. Quinze cães foram testados quanto aos efeitos da vitamina E administrada por via oral (60 mg dl- α acetato de tocoferil) em combinação

com vitamina C (0, 30 ou 60 mg de ácido ascórbico). Não houve evidências de que o tratamento dietético alterou as concentrações plasmáticas de vitamina C, as concentrações de TBARS, as subpopulações de linfócitos, exceto pelo número de linfócitos CD4+ que aumentaram com a suplementação de vitamina C. Não houve efeito da vitamina C na concentração sérica de IgA e IgG.

Khazaie et al. (2019) avaliaram o efeito da suplementação de vitamina C (100 ou 200 mg/kg) em ratos Wistar desafiados com diazinon (DZN), um pesticida organofosforado que pode causar estresse oxidativo em diferentes tecidos. O tratamento com vitamina C apresentou efeitos benéficos contra o estresse oxidativo nos tecidos, especialmente no tecido cerebral, através da eliminação de radicais livres. O cérebro é altamente sensível a danos oxidativos devido ao seu alto teor AGPI, que podem ser prontamente transformados em peróxidos. Além disso, utiliza quantidades excessivas de oxigênio e contém níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes (JAFARI et al., 2012).

2.5 Prebióticos

Prebióticos são definidos como ingredientes seletivamente fermentados que permitem alterações específicas, tanto na composição quanto na atividade da microbiota gasiotatointestinal que confere benefícios à saúde e bem-estar ao hospedeiro (ROBERFROID, 2007).

Componentes prebióticos promovem benefícios ao sistema imune, combatem microrganismos patogênicos, produzem ácidos graxos de cadeia curta promovendo acidificação do cólon e regulam o tempo de trânsito intestinal (SAAD et al., 2015).

Segundo Wang (2009), existem alguns critérios básicos para classificação de componentes alimentares como prebióticos. Os ingredientes prebióticos devem ser resistentes à digestão nas seções superiores do trato digestório. Como resultado, os prebióticos atingem o intestino grosso, onde podem ser seletivamente fermentados por bactérias intestinais potencialmente benéficas. A fermentação pode levar a mudanças nos processos metabólicos e melhorar o funcionamento do sistema imunológico, exercendo assim um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro.

O mananoligossacarídeo (MOS) é derivado da parede celular externa de leveduras e tem sido utilizado como um potencial prebiótico para melhorar o estado de saúde em muitas espécies, incluindo cães. Apresentam capacidade de modular o sistema imunológico e a

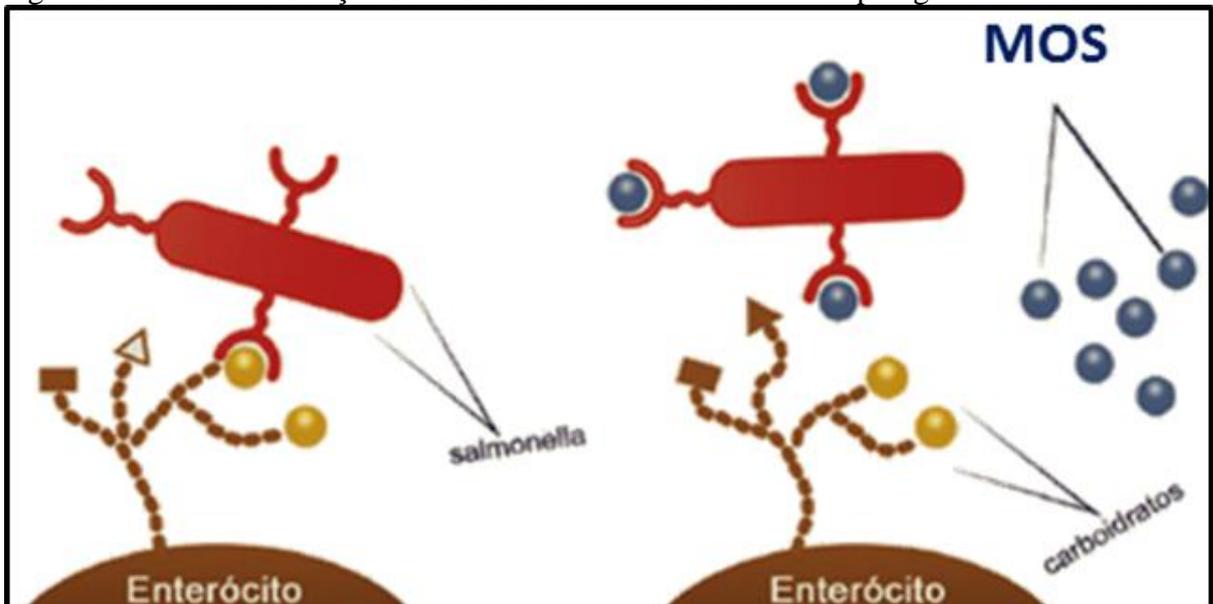
microbiota intestinal, ligam-se a uma ampla variedade de micotoxinas e preservam a integridade da superfície de absorção intestinal (BORGES et al., 2003; MONTEIRO, 2004).

As bactérias patogênicas colonizam o trato gastrointestinal prendendo-se à superfície das células epiteliais e os MOS previnem esta colonização, bloqueando a aderência das bactérias patogênicas ao ocupar os receptores das células epiteliais intestinais (BORGES et al., 2003).

A colonização do epitélio intestinal por microrganismos patogênicos ocorre quando estes proliferam em número suficiente para produzir um quadro clínico de doença. Especificamente importantes são as salmoneloses causadas pela *Salmonella* spp. que, durante o processo de proliferação microbiana, atacam as células epiteliais ligando-se a elas por meio de uma fímbria em sítios de ligação específicos ricos em resíduos de manose (MILES, 1993). Essa semelhança entre os sítios de ligação dos enterócitos, ricos em manose, com os mananoglicosacarídeos adicionados à dieta dos animais diminui a fixação de patógenos à mucosa, facilitando a sua expulsão juntamente com o quimo alimentar através do tubo digestivo por mecanismos fisiológicos normais.

Os MOS são capazes de se ligarem à fímbria das bactérias e inibir a colonização do trato gastrointestinal por microrganismos patógenos (Figura 3) (MARTIN, 1994).

Figura 3: Mecanismo de ação do MOS sobre a adesão de bactérias patogênicas nos enterócitos.



Fonte: Adaptado de <http://www.yes.ind.br/produtos/yes-mos-pets/>.

A dominância e a persistência da microbiota desejável pode ser efetivada quando os microrganismos fixam-se no epitélio intestinal, multiplicando-se mais rapidamente do que a

sua eliminação pelo peristaltismo intestinal, como é o caso das bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Enterococcus* (SILVA, 2000).

A microbiota eutrófica inibe o crescimento de bactérias indesejáveis, estimula a produção de ácidos graxos voláteis, principalmente o ácido lático, produzido em grandes quantidades por bifidobactérias (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*). Esses ácidos orgânicos determinam a redução do pH com a inibição do crescimento de bactérias patogênicas e estímulo à proliferação de enterócitos, favorecendo a integridade da parede celular e otimizando a capacidade de absorção intestinal. Valores de 5% a 10% das necessidades energéticas dos carnívoros podem sofrer a influência da ação dos microrganismos, principalmente na formação de ácidos graxos voláteis de rápida absorção e utilizados como energia (FERNANDEZ; CRESPO, 2003).

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

Um mecanismo de ação para MOS sobre o sistema imune envolve algumas proteínas séricas denominadas coletinas, as quais atuam como opsoninas, se ligando à partículas que apresentam manose em sua estrutura, o que favorece a fagocitose por células do sistema imune inato ou ativo o sistema complemento (EPSTEIN et al., 1996). Vários microrganismos, incluindo vírus, fungos e bactéria, contém manose como estrutura semelhante à encontrada no MOS. Assim, este composto pode atuar como adjuvante no combate a algumas infecções através da estimulação de proteínas que se ligam à manose (FRANKLIN et al., 2005).

Além disso, o MOS pode ser reconhecido como um antígeno estranho no intestino, estimulando a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos com capacidade de secreção de IgA, uma imunoglobulina importante para a imunidade de mucosa, uma vez que inibe a ligação de bactérias e toxinas ao epitélio intestinal, aumenta a secreção de muco e previne inflamações que causam danos ao tecido epitelial (MCKAY; PERDUE, 1993). Swanson et al. (2002) em estudo com cães, observaram que a associação de frutoligossacarídeos (FOS) e MOS foi capaz de aumentar a IgA ileal, o que sugere uma resposta imune local aumentada e uma maior proteção contra a invasão de patógenos.

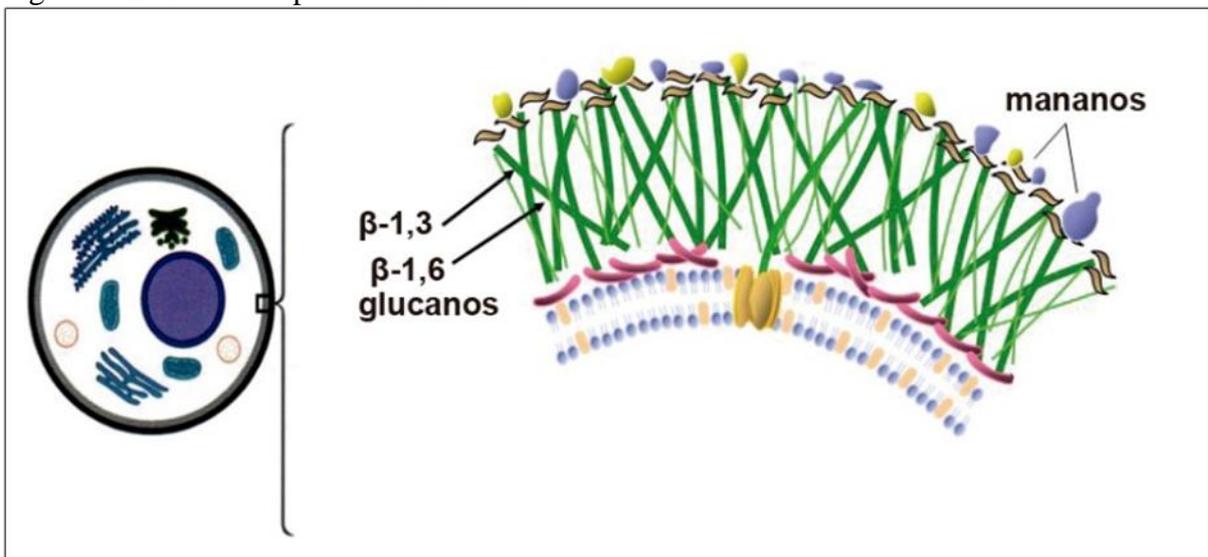
Com relação aos efeitos do MOS sobre a produção de citocinas, Che et al. (2012) observaram que a adição de MOS à dieta, na proporção de 0,04%, resultou em maiores

concentrações séricas de IL-1 β , IL-12 e haptoglobina em suínos experimentalmente infectados com o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva, o que sugere um importante papel do MOS como adjuvante na promoção de uma resposta imune inata e mediada por células T.

Pawar et al. (2017) investigaram os efeitos da inclusão de MOS (15g/kg) em dietas caseiras para cães da raça Spitz. Os animais consumiram as dietas por 150 dias e foram desafiados com inoculação subcutânea do antígeno *Leptospira*. Foi verificada maior % de linfócitos T CD4+ e maior relação CD4+:CD8+ no grupo suplementado com MOS, em relação à um grupo controle. Além disso, foi observada uma tendência (P = 0.084) de maior contração de IgG sérica 7, 14 e 28 dias após o desafio.

Outra fonte de prebióticos muito utilizada na nutrição animal são os beta-glucanos derivados de fungos e leveduras. A parede celular de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, é constituída principalmente por mananoproteínas, β -1,3 e β -1,6-glucano e quitina (Figura 4) (LIPKE; OVALLE, 1998). Enquanto os beta-glucanos e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem sua forma, as manonoproteínas e sua porção de carboidrato são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio e determinam a especificidade antigênica da levedura (RUIZ-HERRERA, 1991). Ambos os tipos de polissacarídeos constituintes principais da parede célula das leveduras, tem sido reconhecidos como capazes de modular o sistema imune por meio de interações específicas com várias células imunocompetentes (MEDZHITOV; JANEWAY JR, 2000).

Figura 4: Estrutura da parede celular de levedura.



Fonte: Adaptado de <http://www.yes.ind.br/produtos/yes-fix-suinos/>.

Os beta-glucanos ativam o sistema imunológico inato em humanos e outros mamíferos, em aves, peixes e até crustáceos (ZENTEK et al., 2002).

Os macrófagos possuem receptores que reconhecem especificamente β - (1,3 e 1,6) glucanos, pois ocorrem naturalmente nas paredes celulares de muitas bactérias e fungos. O sistema imunológico inato os reconhece como um desafio e responde montando uma resposta imune (SMITH; CHARTER, 2010).

Os β -glucanos aumentam as atividades de macrófagos, neutrófilos, células NK, células T e células B. Como adjuvantes da vacina, eles potencializam respostas imunológicas humorais e celulares a antígenos microbianos e tumorais e aumentam não especificamente a resistência do hospedeiro à doença. Esse amplo espectro de atividades pode ser atribuído principalmente à ativação de macrófagos.

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que os β -glucanos aumentam a fagocitose de macrófagos e a produção de citocinas. O β -glucano, extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (β -1,3-glucano com longos ramos de β -1,6-glucano), é usado como imunomodulador para melhorar o estado de saúde animal, principalmente devido à sua capacidade de aumentar a resistência do hospedeiro a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias (BOHN; BEMILLER, 1995; DI LUZIO, 1983).

Haladová et al. (2009) estudaram o efeito do beta-glucano sobre parâmetros imunológicos específicos e não específicos na espécie canina, com o uso de uma solução concentrada deste suplemento, a qual foi fornecida a filhotes de cães de várias raças. Observaram aumento de parâmetros imunológicos inespecíficos, tais como atividade funcional de fagócitos e linfócitos. Também foi notado aumento no título de anticorpos contra o vírus da raiva, após vacinação.

Stuyven et al. (2010) avaliaram o uso de beta-glucano obtido de *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de tabletes (225 mg por cão), por quatro semanas e encontraram efeitos sobre a imunidade humoral, com aumento de IgM sérica e diminuição de IgA no soro e nas mucosas.

Lin et al. (2019) também investigaram suplementação via oral (125, 250 ou 500 mg/d) de um produto de fermentação de levedura em Beagles adultos. A porcentagem de células NK e células apresentadoras de antígenos não foram alteradas pela suplementação. Entretanto, a secreção de IFN- γ , as células citotóxicas e helper, além da dosagem de IgE séricas aumentaram linearmente com a suplementação.

Os frutooligosacarídeos (FOS) não são digeríveis pelas enzimas dos mamíferos e, conseqüentemente, atingem o cólon e servem como fonte de substrato altamente digerível para as bactérias. Mais especificamente, o FOS estimula seletivamente o crescimento de bifidobactérias, um gênero bacteriano associado à saúde intestinal (SWANSON et al., 2010).

Os FOS são altamente fermentáveis por espécies microbianas, incluindo numerosas espécies de bifidobactérias e algumas espécies de lactobacilos e bacteroides (HIDAKA et al., 1986). As espécies incapazes de fermentar o FOS incluem *E. coli*, *C. perfringens* (HIDAKA et al., 1986) e *Salmonella* spp. (HARA et al., 1994).

Uma pesquisa com camundongos indicou que o uso de frutooligosacarídeo aumentou as concentrações de IgA, interferon γ , e das interleucina 5, 6, 10, além do tamanho da placa de Peyer (HOSONO et al., 2003).

Shang et al.(2015) investigaram os efeitos da inclusão de 0,5% de FOS na dieta de pintinhos de corte de 1 dia até 21 dias de idade. Os animais foram desafiados com LPS de *Salmonella Enteritidis*. A suplementação reduziu a contagem de heterócitos, mas aumentou a de monócitos. Houve aumento de IgY sérica (semelhante à IgG dos mamíferos), que é o anticorpo predominante nas aves contra infecção sistêmica (DANKOWIAKOWSKA et al., 2013). Também foi observado aumento da expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-10 e IFN γ no íleo dos animais suplementados.

2.6 Extratos Vegetais

Os extratos vegetais são metabólitos vegetais secundários que podem ser obtidos naturalmente a partir de materiais vegetais ou sintetizados quimicamente. Os extratos de plantas tem sido de interesse em potencial por um longo tempo devido a seus efeitos antimicrobianos (BAYDAR et al., 2004), anti-inflamatórios (LANG et al., 2004), antioxidantes (DUNDAR et al., 2008) e antivirais (SÖKMEN et al., 2004).

Curcuma longa (ou *Curcuma domestica*) é um arbusto perene endêmico da Índia, a parte do vegetal com maior utilização é o rizoma, que pode ser consumido fresco ou seco. Para fins de conservação, esse rizoma é desidratado e moído, gerando um pó de coloração dourada.

A curcumina é o componente majoritário dos rizomas de *C. longa*, sendo responsável por cerca de 2% do seu peso seco. Atualmente a curcumina pode ser obtida comercialmente como uma mistura de três componentes: curcumina (~77%); desmetoxicurcumina (~17%); e bisdesmetoxicurcumina (~3%) (GOEL et al., 2008).

Pesquisas mostram que a curcumina é uma molécula altamente pleiotrópica capaz de interagir com vários alvos moleculares envolvidos na inflamação. A curcumina modula a resposta inflamatória através da regulação negativa da atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), lipooxigenase, da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), inibe a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e das interleucinas (IL) -1, -2, -6, -8 e -12 (ABE et al., 1999; GOEL et al., 2008).

A curcumina possui um grande número de alvos moleculares, o que explica essa ampla variedade de efeitos. Podemos dividir os alvos em duas categorias: aqueles que a curcumina liga-se diretamente modulando sua atividade e outra categoria que envolve modulação indireta ou secundária. As enzimas como a ciclooxigenase-2 (COX2) e a lipooxigenase (LOX) (HONG et al., 2004) encontram-se dentre os alvos diretos da curcumina. Os alvos indiretos podem ser regulados positiva ou negativamente dependendo do alvo e da célula. Esse tipo de ação ocorre, por exemplo, através de sua ação sobre fatores de transcrição como o NF-kB.

A curcumina como agente antioxidante ocorre de maneira direta agindo como sequestrador de radicais livres, tais como peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, e ligando-se à cátions divalentes como ferro e cobre (BARZEGAR; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2011). De maneira indireta a curcumina altera os níveis de compostos do sistema de limpeza, por exemplo, ativando o fator de transcrição Nrf-2 que, por sua vez, vai induzir o aumento da expressão de diversos genes como o da enzima glutationa-S-transferase (BALOGUN et al., 2003).

Devido a sua atividade antioxidante, a curcumina protege os animais dos danos cognitivos, melhorando a memória de ratos. Em modelo de excitotoxicidade cerebral induzido pela hemocisteína ela apresentou proteção na memória espacial e na memória aversiva (AWASTHI et al., 2010).

A curcumina reduz a inflamação e a neurodegeneração diminuindo a interleucina 1 β (IL-1 β) e o marcador astrocitário GFAP (BEGUM et al., 2008). Assim como outros anti-inflamatórios não-esteroidais, a curcumina mostrou-se capaz de suprimir a transcrição do fator NF-kB, que controla a expressão de genes como a ciclooxigenase-2 e ciclina D1, levando a inibição da proliferação de células tumorais (TAKADA et al., 2004). Outro estudo mostrou que os níveis neuronais de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de peroxinitrito foram significativamente inibidas após o tratamento com a curcumina (DOHARE et al., 2008).

As pimentas pertencem à família das solanáceas (Solanaceae) e seus frutos apresentam alta diversidade genética em termos de cor, tamanho, forma, composição química e grau de

pungência (CHUAH et al., 2008). Entre as espécies domesticadas do gênero *Capsicum* são *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (OLIVEIRA et al., 2000).

As pimentas (*Capsicum* spp.) são conhecidas por serem boas fontes de diferentes fitoquímicos, incluindo vitamina C, compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2011). Sabe-se que esses compostos apresentam alta atividade antioxidante (MATERSKA; PERUCKA, 2005). É a única planta capaz produzir capsaicinóides, responsáveis por seu sabor quente característico. Também são descritas como o vegetal com o maior conteúdo de vitamina C (LEE; KADER, 2000).

Os compostos fenólicos presentes na pimenta podem neutralizar os radicais livres e modular a atividade de enzimas envolvidas nos processos de desintoxicação, oxidação e redução. Além disso, eles podem fortalecer o sistema imunológico regulando a expressão gênica, a sinalização celular e o metabolismo hormonal e também influenciando a proliferação e apoptose celular (ABADIO FINCO et al., 2012).

Apesar dos relatos na literatura sobre os benefícios sobre o sistema imune e defesas antioxidantes dos extratos vegetais, os estudos com inclusão desses compostos da dieta de cães ainda são escassos, mas representam uma possibilidade ainda pouco explorada.

Song et al. (2010) avaliando o efeito extratos de etanol de sementes de pimenta vermelha no sistema antioxidante e dano oxidativo em ratos alimentados com dieta com rica em gordura e colesterol, encontraram que essa suplementação resultou em aumento significativo das atividades da glutathione peroxidase e da catalase hepática, além de valores reduzidos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado dos animais. Esses resultados sugerem que os extratos de etanol de sementes de pimenta vermelha podem reduzir o dano oxidativo, pela ativação do sistema de defesa antioxidante em ratos.

Liu e Song et al. (2013) investigaram o efeito de diferentes extratos vegetais (alho, cúrcuma e pimenta) na dieta de leitões recém desmamados e experimentalmente infectados por *Escherichia coli*. A inclusão dos extratos vegetais diminuiu a incidência de diarreia, aumentou a altura das vilosidades no íleo e reduziu as concentrações séricas de TNF- α e haptoglobina.

Em estudo semelhante foi avaliada a inclusão dos três extratos vegetais (alho, cúrcuma e pimenta) na dieta de leitões de 21 dias recém-desmamados, e desafiados com o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória. A inclusão do extrato de alho aumentou a contagem de linfócitos B e de linfócitos T CD8+, em comparação ao grupo controle. O desafio com o vírus aumentou a carga viral sérica, as concentrações séricas de TNF- α e IL-1 β no dia 7 após inoculação, ainda houve aumento de proteína C reativa e haptoglobina séricas no dia 14 após o

desafio viral. Entretanto, a inclusão dos extratos vegetais reverteu esse aumento, reduzindo os parâmetros citados e, ainda, aumentando a concentração de IL-10. Em conclusão, os resultados indicam que a suplementação com extratos vegetais reduz os efeitos adversos da infecção viral, melhorando as respostas imunológicas dos animais (LIU; CHE; et al., 2013).

Os óleos essenciais são bastante estudados em animais de produção, devido a pressão para a redução no uso de antibióticos no sistema de produção animal, entretanto, é uma possibilidade promissora e ainda pouco explorada nos alimentos para cães.

Os óleos essenciais são uma mistura que inclui álcoois, aldeídos, ácidos, fenóis, terpenos e acetona. Além disso, alguns estudos de laboratório mostraram que esses compostos, extraídos de espécies de *Thymus*, tem funções antimicrobianas e antioxidantes (DORMAN; DEANS, 2000), enquanto outros, extraídos da espécie *Mentha*, tem função anti-inflamatórias (ARUMUGAM et al., 2008; MOGOSAN et al., 2017).

Os óleos essenciais de orégano (OEO) são isolados de plantas de *Origanum vulgare* (folhas e flores). Os principais constituintes nutracêuticos são carvacrol e timol (SIVROPOULOU et al., 1996).

Liu et al. (2019) avaliaram os efeitos do óleo essencial de carvacrol administrado por via oral sobre a resposta imune e a expressão de genes relacionados à inflamação em frangos de corte desafiados pelo lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados mostraram que o carvacrol inibiu a expressão gênica de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no intestino delgado.

2.7 Considerações Finais

Diante do exposto, nota-se a importância das pesquisas visando melhor elucidar os efeitos da inclusão de aditivos nutracêuticos com potencial de modulação do sistema imune e da função antioxidante. Ainda é preciso avaliar a combinação desses nutracêuticos em uma mesma dieta, visto que seus efeitos podem ser potencializados quando em combinação na forma de um *blend*.

Por último ressalta-se a relevância dos estudos com cães idosos, visto que o aumento na expectativa de vida dos mesmos implica em maior longevidade e maior tempo na permanência na fase de vida senil do cão.

REFERÊNCIAS

- AAFCO, A. O. A. F. C. O.-. **Dogs and cats nutrient profiles. In: AAFCO official publication.** Washington, D.C. AAFCO, p. 169-183. 2010.
- ABADIO FINCO, F. D.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.; TSENG, W.-H. et al. Antioxidant activity and characterization of phenolic compounds from bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) fruit by HPLC-DAD-MS n. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, 60, n. 31, p. 7665-7673, 2012.
- ABE, Y.; HASHIMOTO, S.; HORIE, T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Pharmacological research**, 39, n. 1, p. 41-47, 1999.
- ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L. A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeno and Serrano peppers. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, 59, n. 1, p. 163-173, 2011.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- ANDRADE, P. d. M. M.; CARMO, M. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Revista Mn-Metabólica**, 8, n. 3, p. 135-143, 2006.
- AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **The Journal of clinical investigation**, 88, n. 5, p. 1445-1451, 1991.
- ARUMUGAM, P.; PRIYA, N. G.; SUBATHRA, M.; RAMESH, A. Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. **Environmental toxicology and pharmacology**, 26, n. 1, p. 92-95, 2008.
- AWASTHI, H.; TOTA, S.; HANIF, K.; NATH, C. et al. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. **Life sciences**, 86, n. 3-4, p. 87-94, 2010.
- BALOGUN, E.; HOQUE, M.; GONG, P.; KILLEEN, E. et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochemical journal**, 371, n. 3, p. 887-895, 2003.
- BARBALHO, S. M.; BECHARA, M. D.; QUESADA, K. R.; GOULART, R. A. Papel dos ácidos graxos ômega 3 na resolução dos processos inflamatórios. **Medicina (Ribeirão Preto)**, 44, n. 3, p. 234-240, 2011.

BARZEGAR, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. **PloS one**, 6, n. 10, p. e26012, 2011.

BAUER, J. E. Therapeutic use of fish oils in companion animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 239, n. 11, p. 1441-1451, 2011.

BAYDAR, N. G.; ÖZKAN, G.; SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food control**, 15, n. 5, p. 335-339, 2004.

BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **Journal of endocrinology**, 184, n. 3, p. 455-465, 2005.

BEGUM, A. N.; JONES, M. R.; LIM, G. P.; MORIHARA, T. et al. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 326, n. 1, p. 196-208, 2008.

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Mammalian selenium-containing proteins. **Annual review of nutrition**, 21, n. 1, p. 453-473, 2001.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate polymers**, 28, n. 1, p. 3-14, 1995.

BONHAM, M.; O'CONNOR, J. M.; HANNIGAN, B. M.; STRAIN, J. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? **British Journal of Nutrition**, 87, n. 5, p. 393-403, 2002.

BORGES, F.; SALGARELLO, R.; GURIAN, T. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. **SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO**, 3, p. 21-60, 2003.

BORGES, M. C.; SANTOS, F. d. M. M.; TELLES, R. W.; CORREIA, M. I. T. D. et al. Polyunsaturated omega-3 fatty acids and systemic lupus erythematosus: what do we know?☆. **Revista brasileira de reumatologia**, 54, p. 459-466, 2014.

BRADY, P. S.; BRADY, L. J.; ULLREY, D. E. Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. **The Journal of nutrition**, 109, n. 6, p. 1103-1109, 1979.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. 2006.

BROOME, C. S.; MCARDLE, F.; KYLE, J. A.; ANDREWS, F. et al. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. **The American journal of clinical nutrition**, 80, n. 1, p. 154-162, 2004.

CALDER, P. C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 79, n. 3-5, p. 101-108, 2008.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, 16, n. 1, p. 71-120, 2013.

CASE, L. P.; DARISTOTLE, L.; HAYEK, M. G.; RAASCH, M. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals**. Elsevier Health Sciences, 2010. 0323071473.

CHUAH, A. M.; LEE, Y.-C.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H. et al. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. **Food chemistry**, 111, n. 1, p. 20-28, 2008.

COZZI, R.; RICORDY, R.; AGLITTI, T.; GATTA, V. et al. Ascorbic acid and beta-carotene as modulators of oxidative damage. **Carcinogenesis**, 18, n. 1, p. 223-228, 1997.

DANKOWIAKOWSKA, A.; KOZŁOWSKA, I.; BEDNARCZYK, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics in Poultry—mode of action, limitation, and achievements. **Journal of Central European Agriculture**, 14, n. 1, p. 467-478, 2013.

DARDENNE, M. Zinc and immune function. **European journal of clinical nutrition**, 56, n. 3, p. S20-S23, 2002.

DEVARAJ, S.; TANG, R.; ADAMS-HUET, B.; HARRIS, A. et al. Effect of high-dose α -tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. **The American journal of clinical nutrition**, 86, n. 5, p. 1392-1398, 2007.

DI LUZIO, N. R. Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, 4, p. 344-347, 1983.

DOHARE, P.; VARMA, S.; RAY, M. Curcuma oil modulates the nitric oxide system response to cerebral ischemia/reperfusion injury. **Nitric Oxide**, 19, n. 1, p. 1-11, 2008.

DORMAN, H. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUNDAR, E.; OLGUN, E. G.; ISIKSOY, S.; KURKCUOGLU, M. et al. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 59, n. 6, p. 399-408, 2008.

DZANIS, D. A. N. Necessidades nutricionais e manejo dietético. *In*: HOSKINS, J. D. **Geriatrics e gerontologia do cão e do gato**. 2 ed. São Paulo: Roca. p. 21-32, 2008.

EICHENBERGER, B.; PFIRTER, H.; WENK, C.; GEBERT, S. Influence of dietary vitamin E and C supplementation on vitamin E and C content and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in different tissues of growing pigs. **Archives of animal nutrition**, 58, n. 3, p. 195-208, 2004.

EPSTEIN, J.; EICHBAUM, Q.; SHERIFF, S.; EZEKOWITZ, R. A. B. The collectins in innate immunity. **Current opinion in immunology**, 8, n. 1, p. 29-35, 1996.

FERNANDEZ, J.; CRESPO, N. New advances in the application of probiotics. **International Pig Topics**, 18, p. 11-13, 2003.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **nature**, 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FRAKER, P. J.; DEPASQUALE-JARDIEU, P.; ZWICKL, C. M.; LUECKE, R. W. Regeneration of T-cell helper function in zinc-deficient adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 75, n. 11, p. 5660-5664, 1978.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GIUNTA, S. et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of ageing and development**, 128, n. 1, p. 92-105, 2007.

FRANKLIN, S.; NEWMAN, M.; NEWMAN, K.; MEEK, K. Immune parameters of dry cows fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. **Journal of dairy science**, 88, n. 2, p. 766-775, 2005.

FREEMAN, L. M. Beneficial effects of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. **Journal of Small Animal Practice**, 51, n. 9, p. 462-470, 2010.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**, 19, p. 611-621, 2006.

GEY, F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **BioFactors**, 7, n. 1-2, p. 113-174, 1998.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, 75, n. 4, p. 787-809, 2008.

GOLDSTON, R. T.; HOSKINS, J. D. **Geriatrics & gerontology of the dog and cat**. Philadelphia Saunders, 1995. 426 p.

GREDEL, S. **Nutrição e imunidade no homem**. 2 ed. Bélgica: Ilsi Europe Concise Monograph Series, 2012. 32 p.

HALADOVÁ, E.; MOJŽIŠOVÁ, J.; SMRČO, P.; ONDREJKOVÁ, A. et al. The effect of β (1, 3/1, 6) d-glucan on selected non-specific and specific immunological parameters in dogs after vaccination. **Folia Veterinaria**, 53, n. 1, p. 43-46, 2009.

HARA, H.; LI, S.-T.; SASAKI, M.; MARUYAMA, T. et al. Effective dose of lactosucrose on fecal flora and fecal metabolites of humans. **Bifidobacteria and Microflora**, 13, n. 2, p. 8-63, 1994.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical journal**, 265, n. 3, p. 621-636, 1990.

HESTA, M.; OTTERMANS, C.; KRAMMER-LUKAS, S.; ZENTEK, J. et al. The effect of vitamin C supplementation in healthy dogs on antioxidative capacity and immune parameters. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 93, n. 1, p. 26-34, 2009.

HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKUNAGA, T. et al. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria and Microflora**, 5, n. 1, p. 37-50, 1986.

HILL, G.; MAHAN, D.; JOLLIFF, J. Comparison of organic and inorganic zinc sources to maximize growth and meet the zinc needs of the nursery pig. **Journal of animal science**, 92, n. 4, p. 1582-1594, 2014.

HOGENESCH, H.; THOMPSON, S.; DUNHAM, A.; CEDDIA, M. et al. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. **Veterinary immunology and immunopathology**, 97, n. 1-2, p. 77-85, 2004.

HONG, J.; BOSE, M.; JU, J.; RYU, J.-H. et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related β -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A 2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinogenesis**, 25, n. 9, p. 1671-1679, 2004.

HOSONO, A.; OZAWA, A.; KATO, R.; OHNISHI, Y. et al. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 67, n. 4, p. 758-764, 2003.

HUGHES, D. A. Effects of carotenoids on human immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**, 58, n. 3, p. 713-718, 1999.

JAFARI, M.; SALEHI, M.; ASGARI, A.; AHMADI, S. et al. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. **Environmental toxicology and pharmacology**, 34, n. 3, p. 876-887, 2012.

KHAZAIE, S.; JAFARI, M.; HEYDARI, J.; ASGARI, A. et al. Modulatory effects of vitamin C on biochemical and oxidative changes induced by acute exposure to diazinon in rat various tissues: prophylactic and therapeutic roles. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 103, n. 5, p. 1619-1628, 2019.

KHIL, J. **The effect of pre-and probiotics and components of beef on colon cancer risk in rats.** University of Minnesota, 2001. 0493041915.

KIM, H.-Y.; GLADYSHEV, V. N. Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. **Molecular biology of the cell**, 15, n. 3, p. 1055-1064, 2004.

KIM, J.; MULLAN, B.; PLUSKE, J. **Impact of the systemic response to stressors and subclinical and clinical infection on intestinal barrier function and growth in pigs.** *In*: XIV., M. P. P. Proceedings of the 14th Australasian Pig Science Association (APSA) Biennial Conference. Melbourne, Australia. 61-76. 2013.

KING, J. C.; KEEN, C. L. Zinco. *In*: SHILS, M. E. e. a. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** São Paulo: Manole, p.239-56. 2003.

São Paulo: Manole. v. 1, p. 239-256, 2003.

KOO, O. J.; PARK, S. J.; LEE, C.; KANG, J. T. et al. Production of mutated porcine embryos using zinc finger nucleases and a reporter-based cell enrichment system. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 27, n. 3, p. 324, 2014.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, 16, p. 433-441, 2003.

KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, 300, n. 5624, p. 1439-1443, 2003.

LANG, A.; LAHAV, M.; SAKHNINI, E.; BARSHACK, I. et al. Allicin inhibits spontaneous and TNF- α induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. **Clinical nutrition**, 23, n. 5, p. 1199-1208, 2004.

LEBLANC, C. J.; HOROHOV, D. W.; BAUER, J. E.; HOSGOOD, G. et al. Effects of dietary supplementation with fish oil on in vivo production of inflammatory mediators in clinically normal dogs. **American journal of veterinary research**, 69, n. 4, p. 486-493, 2008.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest biology and technology**, 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

LIN, C.-Y.; ALEXANDER, C.; STEELMAN, A. J.; WARZECHA, C. M. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. **Journal of animal science**, 97, n. 4, p. 1586-1599, 2019.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of bacteriology**, 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LIU, S.; SONG, M.; YUN, W.; LEE, J. et al. Effect of carvacrol essential oils on immune response and inflammation-related genes expression in broilers challenged by lipopolysaccharide. **Poultry science**, 98, n. 5, p. 2026-2033, 2019.

LIU, Y.; CHE, T.; SONG, M.; LEE, J. et al. Dietary plant extracts improve immune responses and growth efficiency of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of animal science**, 91, n. 12, p. 5668-5679, 2013.

LIU, Y.; SONG, M.; CHE, T.; ALMEIDA, J. et al. Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of animal science**, 91, n. 11, p. 5294-5306, 2013.

LU, C.; QIU, F.; ZHOU, H.; PENG, Y. et al. Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. **FEBS letters**, 580, n. 22, p. 5189-5197, 2006.

MACARI, M. L., B.C. . Fisiologia cardiovascular. *In*: MACARI, M. F., R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2 ed. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista. p. 17-36, 2002.

MACMILLAN-CROW, L. A.; CRUTHIRDS, D. L. Manganese superoxide dismutase in disease. **Free radical research**, 34, n. 4, p. 325-336, 2001.

MANSFIELD, K.; SAYERS, R.; FOOKS, A.; BURR, P. et al. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. **Veterinary Record**, 154, n. 14, p. 423-426, 2004.

MANZ, R. A.; HAUSER, A. E.; HIEPE, F.; RADBRUCH, A. Maintenance of serum antibody levels. **Annu. Rev. Immunol.**, 23, p. 367-386, 2005.

MARTIN, S. C. **Potential for manipulating the gastrointestinal microflora: A review of recent progress.** *In: Biotechnology in the Feed Industry Proceedings of 10Th Annual Symposium.* Nottingham University Press. London. 155-166. 1994.

MATEOS, G. G.; VALENCIA, D. G.; MORENO, E. J. Microminerales en alimentacion de monogastricos. Aspectos Tecnicos y Consideraciones Legales. **XX CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, Barcelona**, p. 275-323, 2004.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L.). **Journal of Agricultural and food Chemistry**, 53, n. 5, p. 1750-1756, 2005.

MCKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. **Digestive diseases and sciences**, 38, n. 8, p. 1377-1387, 1993.

MCKENZIE, R. C.; RAFFERTY, T. S.; BECKETT, G. J. Selenium: an essential element for immune function. **Immunology today**, 19, n. 8, p. 342-345, 1998.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MILES, R. D. **Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: Natural ways to prevent colonization by pathogens.** *In: Biotechnology in the Feed Industry Proceedings of 9th Annual Symposium.* Nottingham University Press. London 133-150. 1993.

MOCHEGANI, E.; MUZZIOLI, M.; GIACCONI, R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. **Trends in Pharmacological Sciences**, 21, n. 6, p. 205-208, 2000.

MOGOSAN, C.; VOSTINARU, O.; OPREAN, R.; HEGHES, C. et al. A comparative analysis of the chemical composition, anti-inflammatory, and antinociceptive effects of the essential oils from three species of *Mentha* cultivated in Romania. **Molecules**, 22, n. 2, p. 263, 2017.

MONROY, R. L.; SKELLY, R. R.; DAVIS, T. A.; MACVITTIE, T. J. Therapeutic evaluation of interleukin-1 for stimulation of hematopoiesis in primates after autologous bone marrow transplantation. **Biotherapy**, 4, n. 2, p. 97-108, 1992.

MONTEIRO, J. R. M. Probióticos e Prebióticos para cães e gatos. *In: Anais: IV Simpósio sobre nutrição de animais de estimação*, 2004, Campinas - SP. p. 49-59.

NATIONAL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. National Academies Press, 2006. (RESEARCH COUNCIL. 0309086280.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4 ed. New York: Freeman and Company, 2005.

NIKI, E.; NOGUCHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. **The American journal of clinical nutrition**, 62, n. 6, p. 1322S-1326S, 1995.

NORLING, L.; SERHAN, C. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. **Journal of internal medicine**, 268, n. 1, p. 15-24, 2010.

NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. National Research Council: Academic Press, 2006.

OLIVEIRA, A. d.; SILVA, A. d.; LOPES, C.; RIBEIRO, C. d. C. et al. Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil. **Brasília: Embrapa**, 2000.

PACHECO, G. F.; BORTOLIN, R. C.; CHAVES, P. R.; MOREIRA, J. C. et al. Effects of the consumption of polyunsaturated fatty acids on the oxidative status of adult dogs. **Journal of animal science**, 96, n. 11, p. 4590-4598, 2018.

PAWAR, M. M.; PATTANAIK, A. K.; SINHA, D. K.; GOSWAMI, T. K. et al. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of animal science and technology**, 59, n. 1, p. 1-7, 2017.

PEHRSON, B. Countering selenium deficiency: organic versus inorganic sources. **Feed international**, 16, p. 20-22, 1998.

PEI, X.; XIAO, Z.; LIU, L.; WANG, G. et al. Effects of dietary zinc oxide nanoparticles supplementation on growth performance, zinc status, intestinal morphology, microflora population, and immune response in weaned pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 99, n. 3, p. 1366-1374, 2019.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**, 4, n. 2, p. 89, 2008.

POOL-ZOBEL, B.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I. et al. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, 18, n. 9, p. 1847-1850, 1997.

PUTAROV, T. C. **Ações antioxidantes e imunológicas do selênio em cães.** 2014. (Tese (doutorado)) -, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

RAVAGLIA, G.; FORTI, P.; MAIOLI, F.; BASTAGLI, L. et al. Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y. **The American journal of clinical nutrition**, 71, n. 2, p. 590-598, 2000.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The lancet**, 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **The Journal of nutrition**, 137, n. 3, p. 830S-837S, 2007.

ROSYCHUK, R.; SCOTT-FIESELER, K.; WHITE, S.; SHACKELFORD, S. Nutritional management of canine atopy in 47 dogs: a retrospective study. **Recent Advances in canine and feline Nutrition**, 3, p. 287-291, 2000.

ROY, M.; KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L.; WISHE, H.; COHEN, M. et al. Supplementation with selenium restores age-related decline in immune cell function. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 209, n. 4, p. 369-375, 1995.

RUIZ-HERRERA, J. **Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly.** Boca Raton, EUA: CRC press, 1991. 0849366720.

SAAD, F. Minerais quelatados para cães e gatos. **I Simpósio de Produção,, Nutrição e Alimentação de cães e gatos da Universidade Estadual de Londrina. Paraná, 2005.**

SAAD, F. M. d. O. B.; FERREIRA, L. G.; ZANGERONIMO, M. G.; DO PRADO SAAD, C. E. Nutrição e imunidade em animais de companhia. **Caderno de Ciências Agrárias**, 7, p. 22-40, 2015.

SALGUEIRO, M.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; CREMASCHI, G. et al. Zinc status and immune system relationship. **Biological trace element research**, 76, n. 3, p. 193-205, 2000.

SHANG, Y.; REGASSA, A.; KIM, J. H.; KIM, W. K. The effect of dietary fructooligosaccharide supplementation on growth performance, intestinal morphology, and immune responses in broiler chickens challenged with Salmonella Enteritidis lipopolysaccharides. **Poultry science**, 94, n. 12, p. 2887-2897, 2015.

SHANKAR, A. H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **The American journal of clinical nutrition**, 68, n. 2, p. 447S-463S, 1998.

SHARADAMMA, K.; PURUSHOTHAM, B.; RADHAKRISHNA, P.; ABHILEKHA, P. et al. Role of selenium in pets health and nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**, 5, n. 1, p. 64-70, 2011.

SHE, Y.; HUANG, Q.; LI, D.; PIAO, X. Effects of proteinate complex zinc on growth performance, hepatic and splenic trace elements concentrations, antioxidative function and immune functions in weaned piglets. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 30, n. 8, p. 1160, 2017.

SILVA, E. **Probióticos e prebióticos na alimentação de aves**. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. Campinas. 242-251. 2000.

SINGH, A.; EVANS, P.; GALLAGHER, K. L.; DEUSTER, P. A. Dietary intakes and biochemical profiles of nutritional status of ultramarathoners. **Medicine and science in sports and exercise**, 25, n. 3, p. 328-334, 1993.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, 44, n. 5, p. 1202-1205, 1996.

SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional Food Product Development**. Nova Jersey, EUA: Blackwell Publishing Ltd, 2010.

SMITH, W. L.; MURPHY, R. C. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. In: **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**: Elsevier. p. 259-296, 2016.

SÖKMEN, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; GULLUCE, M. et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of Origanum acutidens. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, 52, n. 11, p. 3309-3312, 2004.

SONG, W.-Y.; KU, K.-H.; CHOI, J.-H. Effect of ethanol extracts from red pepper seeds on antioxidative defense system and oxidative stress in rats fed high-fat· high-cholesterol diet. **Nutrition research and practice**, 4, n. 1, p. 11-15, 2010.

SORICE, A.; GUERRIERO, E.; CAPONE, F.; COLONNA, G. et al. Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 14, n. 5, p. 444-452, 2014.

SOUZA, K. L.; GURGUL-CONVEY, E.; ELSNER, M.; LENZEN, S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. **Journal of endocrinology**, 197, n. 1, p. 139-150, 2008.

SPARKES, A. H. Feeding old cats - An update on new nutritional therapies. **Topics in companion animal medicine**, 26, n. 1, p. 37-42, 2011.

STUYVEN, E.; VERDONCK, F.; VAN HOEK, I.; DAMINET, S. et al. Oral administration of β -1, 3/1, 6-glucan to dogs temporally changes total and antigen-specific IgA and IgM. **Clinical and vaccine immunology**, 17, n. 2, p. 281-285, 2010.

SURAI, P. F. Selenium-vitamin E interactions: Does 1+ 1 equal more than 2? *In*: LYONS, T. e JACQUES, K. **Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries** Nottingham, UK: Nottingham University Press. p. 47-51, 2003.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L. et al. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **The Journal of nutrition**, 132, n. 5, p. 980-989, 2002.

TAKADA, Y.; BHARDWAJ, A.; POTDAR, P.; AGGARWAL, B. B. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF- κ B activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. **Oncogene**, 23, n. 57, p. 9247-9258, 2004.

TINGGI, U. Selenium: its role as antioxidant in human health. **Environmental health and preventive medicine**, 13, n. 2, p. 102-108, 2008.

TORREJON, C.; JUNG, U.; DECKELBAUM, R. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: actions and molecular mechanisms. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 77, n. 5-6, p. 319-326, 2007.

UPADHAYA, S.; KIM, J.; MULLAN, B.; PLUSKE, J. et al. Vitamin E and omega-3 fatty acids independently attenuate plasma concentrations of proinflammatory cytokines and prostaglandin E2 in Escherichia coli lipopolysaccharide-challenged growing-finishing pigs. **Journal of animal science**, 93, n. 6, p. 2926-2934, 2015.

VILLACORTA, L.; AZZI, A.; ZINGG, J.-M. Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. **Molecular aspects of medicine**, 28, n. 5-6, p. 507-537, 2007.

WALL, R.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition reviews**, 68, n. 5, p. 280-289, 2010.

WANDER, R. C.; HALL, J. A.; GRADIN, J. L.; DU, S.-H. et al. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. **The Journal of nutrition**, 127, n. 6, p. 1198-1205, 1997.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, 42, n. 1, p. 8-12, 2009.

WENK, G. L.; QUACK, G.; MOEBIUS, H.-J.; DANYSZ, W. No interaction of memantine with acetylcholinesterase inhibitors approved for clinical use. **Life sciences**, 66, n. 12, p. 1079-1083, 2000.

WOOD, R. J. Assessment of marginal zinc status in humans. **The Journal of nutrition**, 130, n. 5, p. 1350S-1354S, 2000.

ZALEWSKI, P. D. Zinc and immunity: implications for growth, survival and function of lymphoid cells. **Journal of Nutritional Immunology**, 4, n. 3, p. 39-101, 1996.

ZENTEK, J. r.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **The Journal of nutrition**, 132, n. 6, p. 1682S-1684S, 2002.

ZHAO, G.; HAN, M.; ZHENG, M.; ZHAO, J. et al. Effects of dietary vitamin E on immunological stress of layers and their offspring. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 95, n. 3, p. 343-350, 2011.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO - Aditivos nutracêuticos podem modular o sistema imune e a função antioxidante de cães idosos**

Artigo formatado segundo as normas do *Plos One*
(Versão preliminar).

Resumo

Com o objetivo de avaliar a imunidade de cães idosos alimentados com rações comerciais com a inclusão de aditivos nutracêuticos, vinte e quatro cães da raça American Foxhound com idade entre oito e 10 anos, de ambos os sexos, foram divididos em 3 grupos com 8 cães cada. Cada grupo recebeu um tipo de ração seca e extrusada sendo, controle - ração premium especial sem inclusão de aditivos nutracêuticos; tratamento 1 - ração super premium com a inclusão de selênio proteínato: 0,7373 ppm, zinco quelato com glicina: 230 ppm e vitamina C: 200mg/kg; tratamento 2 - ração super premium com a inclusão de selênio proteínato 0,7373 ppm, zinco quelato com glicina: 230 ppm, vitamina C: 200mg/kg, *Capsicum spp* + *Curcuma spp*: 0,02 %, eugenol + sacarina: 0,02 %, óleo de peixe: 0,25%, mananoligossacarídeo + frutoligossacarídeo: 0,40%. Todos os cães consumiram a dieta controle por 30 dias antes do início do experimento, após esse período, foram distribuídos nos tratamentos conforme descrito acima. Após 50 dias (dia 50 do experimento) consumindo as dietas foi realizado desafio antigênico com vacinação subcutânea contra *Leishmaniose* Visceral Canina, Leish-Tech (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea- SP). Após o desafio antigênico, os animais permaneceram recebendo as dietas experimentais por 21 dias, totalizando 71 dias de período experimental. Foram realizadas quatro coletas de sangue nos dias: 0 (um dia antes do início do fornecimento das rações experimentais), 50, 57 e 71 para a realização das análises de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), cortisol, interleucina 10 (IL-10), TNF- α , haptoglobina, mieloperoxidase (MPO), interferon gama e óxido nítrico. Não foi observada interação dieta x tempo ($p > 0,05$) para nenhuma variável. Entretanto, houve diferença ($p < 0,05$) entre as dietas e entre os tempos avaliados para o cortisol, com contraste significativo entre o grupo controle e entre os tratamentos 1 e 2. Para as variáveis SOD, IL-10 e TNF- α houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta. A resposta do MDA evidenciou diferenças ($p < 0,05$) entre as dietas avaliadas, com contraste significativo entre o controle e os tratamentos e entre os tratamentos 1 e 2. Na análise de MPO houve diferença ($p < 0,05$) entre as dietas com contraste significativo entre os tratamentos 1 e 2. De acordo com os resultados encontrados para os parâmetros de cortisol, MDA e MPO, conclui-se que a inclusão de aditivos nutracêuticos na dieta de cães idosos é eficaz em modular a resposta imune e melhorar as defesas antioxidantes.

Palavras-chave: Cão, Nutrição, Senilidade, Cúrcuma, Antioxidantes.

1 INTRODUÇÃO

Melhorias na nutrição, cuidados de saúde e manejo fizeram com que muitos cães vivessem cada vez mais. O envelhecimento traz consigo mudanças fisiológicas, mesmo em cães aparentemente saudáveis. O processo de envelhecimento está associado a uma grande variedade de mudanças fisiológicas, que comprometem a habilidade do corpo em responder ao estresse ou mudanças e contribui para a morbidade e mortalidade (SPARKES, 2011). Para que o envelhecimento ocorra da melhor forma possível são necessários cuidados, com especial atenção a nutrição do indivíduo.

O envelhecimento é um processo biológico complexo que determina a redução progressiva da capacidade de um indivíduo em manter a homeostase durante as situações de estresse fisiológico e ambiental (GOLDSTON; HOSKINS, 1995). É a soma dos efeitos deletérios do tempo nas funções celulares micro anatômicas e fisiológicas em cada indivíduo. Não se trata de uma doença específica, mas um complexo processo genético, biológico, nutricional, e todos esses fatores contribuem para uma progressiva regressão chamada de envelhecimento. Esses fatores afetam de várias formas o corpo, com progressivas e irreversíveis mudanças nos tecidos corporais e órgãos. Para alguns órgãos o nível da mudança pode ser rápido e dramático, enquanto para outros a mudança é muito menos significativa.

Esse processo é influenciado pelo tamanho, raça, genética, nutrição, meio ambiente e outros fatores. Segundo Sparkes (2011), existe uma forte evidência de que a manipulação da dieta dos cães pode modificar aspectos do processo de envelhecimento. Assim como em humanos e em outros animais, a imunocompetência dos cães cai com o passar dos anos. Células da resposta imune são as mais afetadas. Os cães idosos podem apresentar reduzida resposta mitogênica e hipersensibilidade do tipo I, porque a teoria dos radicais livres do envelhecimento prevê que o acumulado de efeitos de reações de radicais livres e seus subprodutos pode levar a danos e morte celular (CASE et al., 2010).

Durante o envelhecimento, os radicais livres provocam estresse oxidativo nas células e tecidos. As células do sistema imune são particularmente afetadas pelos radicais livres devido às suas altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados e porque alguns mecanismos do sistema imune são expostos diretamente à oxidação. Além disso, os radicais livres são considerados o principal fator na formação do câncer e do próprio envelhecimento (DZANIS, 2008).

A dieta com antioxidantes tem mostrado resultado no tratamento de doenças cognitivas. Com isso, as pesquisas com inclusão de aditivos que modulam ou estimulam o sistema imune

dos animais de companhia ganharam destaque. Alguns nutrientes tem a capacidade de interferir na resposta imune por apresentar efeito regulatório direto sobre os leucócitos, alterando os índices de proliferação, padrão de produção de citocinas e diferenciação de populações leucocitárias específicas (KIM et al., 2013).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os ingredientes e aditivos que incluídos na ração possam melhorar a qualidade de vida durante a senilidade dos cães, diminuindo ou prevenindo o progresso de alterações metabólicas e minimizando os sintomas clínicos do envelhecimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Archer Daniel Midland (ADM), conforme anexo. O experimento foi conduzido no Centro Nutricional da Archer Daniel Midland (ADM) Nutrição e Saúde Animal, em Três Corações - MG. Foram utilizados 24 cães da raça American Foxhound de oito a 10 anos de idade, de ambos os sexos e peso médio de $26,48 \text{ kg} \pm 2,60$. Para selecionar os 24 cães que compuseram o projeto, foram escolhidos 32 cães do canil da ADM, todos os cães foram testados sorologicamente contra Leishmaniose Visceral Canina, sendo também realizado hemograma para avaliar a saúde geral dos animais. Os animais positivos no teste sorológico ou com alterações no hemograma não foram utilizados no experimento para reduzir os fatores de confundimento. Após obtidos os resultados, foram selecionados 24 animais, dentre os testados, para permanecer no experimento.

2.2 Dietas experimentais

Os cães foram divididos em três grupos com oito cães em cada, de acordo com as dietas experimentais (Quadro 1). A análise bromatológica das dietas foi feita no laboratório comercial Upscience em Saint-Nolff, França (Tabela 2).

A quantidade de alimento fornecida foi calculada para cada animal de acordo com a fórmula de necessidade energética de manutenção $100 \times (\text{PV})^{0,75}$. Os cães foram alimentados uma vez ao dia às 11:30 da manhã pelo mesmo tratador. A água foi fornecida *ad libitum*.

Quadro 1: Composição básica das dietas experimentais e inclusão dos aditivos.

Tratamento	Composição básica
<p>Controle: Ração seca e extrusada premium especial</p>	<p>Arroz quebrado (15%), milho integral moído, farinha de vísceras de frango, farelo de soja, farinha de carne e ossos, gordura de frango, levedura seca de cervejaria, farelo de glúten de milho-60, carne bovina mecanicamente separada (3%), hidrolisado de frango e/ou subprodutos, fosfato bicálcico, semente de linhaça (1%), cloreto de sódio (sal comum), extrato de alho, cloreto de potássio, corante artificial vermelho 40, dióxido de titânio, aditivo antioxidante (BHA, BHT), vitamina A, vitamina B12, vitamina D, vitamina E, selenito de sódio, ácido fólico, ácido pantotênico, sulfato de cobre, cloreto de colina, sulfato ferroso, iodato de cálcio, óxido de manganês, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina H, vitamina K, vitamina PP, óxido de zinco.</p>
<p>T1: Ração seca e extrusada super premium</p>	<p>Farinha de vísceras de aves, Farinha de carne e ossos (5%), Farinha de peixe, Ovo em pó, Gordura de frango, Óleo de peixe refinado, Milho integral moído, Farelo de glúten de milho, Farelo de soja, Milho gérmen desengordurado, Quirera de arroz, Linhaça integral moída, Levedura seca de cervejaria, Extrato de Yucca (0,025%), Aditivos probióticos e prebióticos, Hexametáfosfato de sódio (0,03%), Cloreto de sódio (sal comum) Cloreto de potássio, Propionato de cálcio, Cloreto de Colina, Fosfato bicálcico, Antioxidantes (DL-alfa-tocoferol e extrato de alecrim), Palatabilizante a base de fígado de frango, Ácido fólico, Ácido pantotênico, Vitamina A, Vitamina B1, Vitamina B12, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina D3, Vitamina H, Vitamina K3, Vitamina PP, Vitamina E, Vitamina C, Complexo cobre aminoácido, Complexo ferro aminoácido, Complexo manganês aminoácido, proteinato de selênio, Complexo zinco aminoácido, Iodato de cálcio.</p>
<p>T2: Ração seca e extrusada super premium</p>	<p>Farinha de vísceras de aves, Farinha de carne e ossos (5%), Farinha de peixe, Ovo em pó, Gordura de frango, Óleo de peixe refinado, Milho integral moído, Farelo de glúten de milho, Farelo de soja, Milho gérmen desengordurado, Quirera de arroz, Linhaça integral moída, Levedura seca de cervejaria, Extrato de Yucca (0,025%), Aditivos probióticos e prebióticos, Hexametáfosfato de sódio (0,03%), Cloreto de sódio (sal comum) Cloreto de potássio, Propionato de cálcio, Cloreto de Colina, Fosfato bicálcico, Antioxidantes (DL-alfa-tocoferol e extrato de alecrim), Palatabilizante a base de fígado de frango, Ácido fólico, Ácido pantotênico, Vitamina A, Vitamina B1, Vitamina B12, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina D3, Vitamina H, Vitamina K3, Vitamina PP, Vitamina E, Vitamina C, Complexo cobre aminoácido, Complexo ferro aminoácido, Complexo manganês aminoácido, proteinato de selênio, Complexo zinco aminoácido, Iodato de cálcio.</p>

Tabela 1: Inclusão de aditivos nutracêuticos nas dietas experimentais.

Tratamentos	Inclusão de aditivos
Controle: ração seca extrusada premium especial	Sem inclusão
T1: ração seca extrusada super premium	Selênio proteinato*: 0,7373 ppm; Zinco quelato com glicina*: 230 ppm; Vitamina C: 200mg/kg
T2: ração seca extrusada super premium	Selênio proteinato*: 0,7373 ppm; Zinco quelato com glicina*: 230 ppm; Vitamina C: 200mg/kg; <i>Capsicum spp</i> + <i>Curcuma spp</i> *: 0,02%; Eugenol e sacarina*: 0,02 %; Óleo de peixe*: 0,25%; Mananoligossacarídeo: 0,25%; Frutoligossacarídeo: 0,15%

*Pancosma, Valinhos-SP.

Tabela 2: Composição nutricional das dietas experimentais*.

Componentes	Controle	Tratamento 1	Tratamento 2
Umidade %	8	6,5	6,7
Proteína Bruta %	24,7	29,8	29,6
Extrato Etéreo %	16,4	15,6	16
Fibra Bruta %	1,6	1,2	1,2
Ômega 3 (Total mg/100g)	232	399	550
Ômega 6 (Total mg/100g)	3270	3320	3707
Cobre mg/kg	20	27	27
Selênio ug/kg	603	313	362
Vitamina B1 mg/Kg	8,2	16,6	14,2
Vitamina B12 g/100g	7,9	21,5	13,8
Vitamina B6 mg/kg	9,7	13,8	15,1
Vitamina C mg/kg	<60	263	275
Vitamina D3 ug/100g	1,5	4,1	3,2
Vitamina A UI/g	15,3	13,5	14,0
Vitamina E mg/Kg	335,7	421,5	397,5
Zinco mg/Kg	167	287	281

*Análises feitas no laboratório comercial Upscience, Saint-Nolff, França.

2.3 Processamento das dietas

A aplicação dos ingredientes testados foi realizada na cobertura das rações, junto à aplicação do palatilizante líquido.

Os ingredientes foram pesados individualmente em béqueres, utilizando uma balança de precisão, sendo os béqueres identificados de acordo com o tratamento.

Foi adicionado 500g do palatilizante de forma gradativa, de 50 em 50 gramas até completar 500g. Os ingredientes foram misturados no béquer utilizando uma colher, até que a mistura ficasse completamente homogênea. A mistura foi então aquecida até a temperatura entre 40°C e 45°C e misturada novamente até o momento da cobertura das rações.

A mistura dos ingredientes foi aplicada à ração utilizando uma betoneira, de forma a assegurar que a cobertura da ração ficasse homogênea.

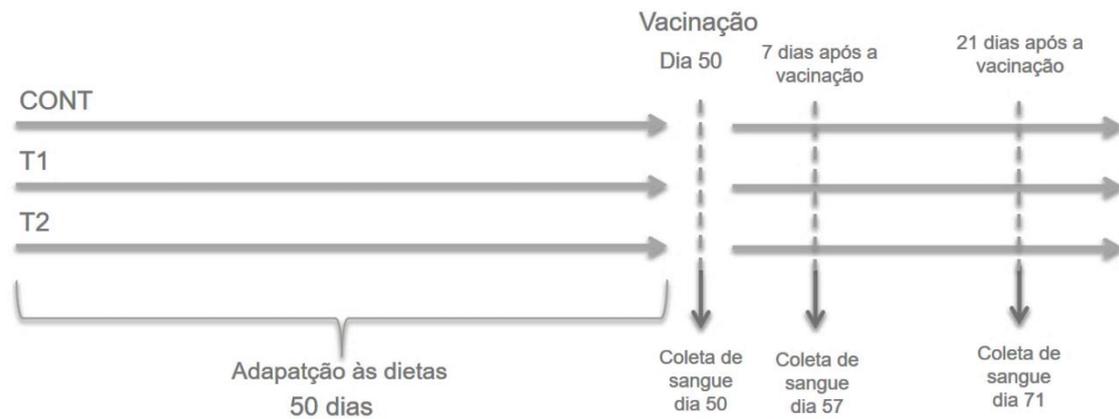
2.4 Procedimento experimental

Todos os cães consumiram a dieta controle por 30 dias antes do início do experimento (período considerado como *wash out*). Após esse período, os cães foram distribuídos nos tratamentos experimentais (controle, tratamento 1 ou tratamento 2). Após 50 dias (dia 50 do experimento) consumindo as dietas foi realizado desafio antigênico com vacinação subcutânea contra *Leishmaniose* Visceral Canina, Leish-Tech (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea- SP). A vacina foi escolhida com base no histórico de vacinação e nenhum dos animais utilizados no experimento havia sido vacinado contra *Leishmaniose* anteriormente. Todos os animais, inclusive os do grupo controle, foram vacinados. O objetivo da vacinação foi promover estímulo no sistema imune antígeno-específica nos cães, para avaliar os possíveis efeitos dos nutracêuticos incluídos na dieta.

Após o desafio antigênico, os animais permaneceram recebendo as dietas experimentais por 21 dias, totalizando 71 dias de período experimental.

Foram realizadas quatro coletas de sangue, sendo uma no dia 0 (um dia antes do início do fornecimento das dietas testadas) e aos 50, 57 e 71 dias. Os dias de coleta foram escolhidos de acordo com a resposta provocada pelo desafio da vacinação. No dia 57 (sete dias após a vacinação) o objetivo foi avaliar a resposta mais aguda e rápida frente ao desafio. A última coleta de sangue correspondeu ao 21º dia após a vacinação, onde se tem o pico de produção de anticorpos e pode-se observar uma resposta mais tardia induzida pela vacinação (Figura 1) (FERREIRA et al., 2018).

Figura 1: Cronograma experimental.



As coletas de sangue foram realizadas na parte da manhã, sempre pela mesma equipe. Os animais foram retirados individualmente das baias e foi realizada contenção mínima para reduzir o estresse durante a coleta de sangue.

Foi coletado vinte mililitros de sangue de cada cão por meio da veia jugular, após antissepsia com algodão embebido em álcool 70%. Imediatamente após a retirada, o sangue foi acondicionado em tubos coletores com EDTA para as análises de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), cortisol, interleucina 10, fator de necrose tumoral alfa, haptoglobina, mieloperoxidase, interferon gama e óxido nítrico. Os tubos com sangue foram mantidos refrigerados durante a coleta em caixa de isopor com gelo, até o processamento do material.

O sangue coletado foi centrifugado imediatamente após a coleta, a 1500 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma.

Foram pipetadas dez alíquotas de 300 microlitros de plasma cada, por animal. O material foi identificado e acondicionado em micro tubos. O plasma foi armazenado em freezer a -80°C na Universidade Federal de Lavras, até o final do período experimental.

Ao final do experimento as alíquotas de plasma foram descongeladas em temperatura ambiente e as análises foram realizadas através de kits comerciais de ELISA para malondialdeído e óxido nítrico (MyBioSource, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Superóxido dismutase e haptoglobina (Cloud Clone Corp., Katy, Texas, Estados Unidos). Cortisol (Cusabio Technology LLC, Houston, Estados Unidos), interleucina 10, TNF alfa e interferon gama (Fine Test, Wuhan, Hubei, China). Mieloperoxidase (Abbkine, Biomedicine Park, Wuhan, China).

Foi realizado teste de diluição das amostras para cada kit, para determinar a diluição que melhor se adequa a curva do parâmetro avaliado. Todo protocolo foi realizado de acordo com

o manual do fabricante. As análises foram realizadas em triplicata, exceto o kit de óxido nítrico que foi realizado em duplicata.

2.5 Análises estatísticas

Foi realizada a análise de variância para interleucina 10 (IL-10), superóxido dismutase (SOD), cortisol, haptoglobina, interferon gama, malondialdeído (MDA), fator de necrose tumoral (TNF) e mieloperoxidase (MPO) sob delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com três repetições, sendo análise em esquema de parcelas subdivididas no tempo com três tratamentos na parcela e quatro tempos (0, 50, 57 e 71 dias) nas subparcelas. Para a variável óxido nítrico (ON) foram apenas três tempos (50, 57 e 71 dias).

No presente estudo a análise de variância foi realizada utilizando a função *psub2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2021). Quando os tempos foram significativos ($p < 0,05$) pelo teste F da análise de variância utilizou-se o teste de Tukey e quando os tratamentos foram significativos se utilizou o teste de Tukey e contrastes ortogonais ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis plasmáticos de interleucina 10 (IL-10) foram semelhantes entre as dietas e diferentes entre os tempos de coleta ($p < 0,05$) (Tabela 3). Observou-se redução de IL-10 do dia 0 para o dia 50 (dia da vacinação) e posterior aumento do dia 50 para os dias 57 e 71, sendo os valores encontrados nos dias 57 e 71 semelhantes ao do dia 0.

Infere-se que a redução de IL-10 encontrada no dia 50 não tenha relação direta com a administração da vacina, pois a coleta de sangue para mensuração dessa citocina foi feita antes da imunização dos cães. Ainda assim, a resposta da IL-10 é relatada como mensurável dentro de aproximadamente 6 horas após um estímulo, atingindo concentrações máximas em 24 horas (BJERRE et al., 2004).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória secretada principalmente por linfócitos T ativados (SOUZA et al., 2008), que pode inibir a ativação de células imunes e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . O resultado é a supressão da resposta inflamatória (MOORE et al., 2001). Portanto, a IL-10 é crucial na regulação do equilíbrio entre patologia e proteção. O aumento da produção de IL-10 implica em melhor proteção contra possíveis causas de inflamação.

She et al. (2017) avaliaram a inclusão de diferentes fontes de zinco na dieta de leitões recém desmamados e encontraram maior concentração de IL-10 nos animais que consumiram dietas com zinco orgânico ou sulfato de zinco, em relação a um grupo com dieta deficiente em zinco. Assim, é possível inferir que o zinco tem grande participação na resposta imune de animais desafiados.

Jaguezeski et al. (2018) estudaram os efeitos da adição de 80 mg/kg/dia de curcumina na dieta de ovelhas leiteiras e encontraram aumento de IL-10. De forma semelhante, Gan et al. (2019) encontraram maiores valores de IL-10 no jejuno de leitões recebendo dietas suplementadas com 300 mg/kg de curcumina. No presente trabalho, os cães que consumiram o tratamento com inclusão de cúrcuma apresentaram níveis de IL-10 numericamente mais altos que os demais tratamentos. Entretanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Essa divergência nos resultados pode ser pelo fato de nos trabalhos citados acima o componente incluído na dieta foi a curcumina, um dos princípios ativos da cúrcuma. Já no presente estudo, a inclusão foi do ingrediente cúrcuma o que pode não ter sido eficaz em aumentar significativamente os níveis de IL-10 dos cães suplementados.

Não foi observada interação dieta x tempo ($p < 0,05$) para a variável cortisol (Tabela 3). Entretanto, houve diferença entre as dietas e entre os tempos de coleta, separadamente. Comparando-se entre as dietas, observou-se maiores níveis de cortisol no grupo controle em relação ao demais tratamentos. Quando feita a comparação por contrastes ortogonais o resultado é significativo entre o grupo controle e os tratamentos 1 e 2, sendo esses semelhantes entre si (Tabela 5). Também foi verificado aumento nos níveis de cortisol de todos os cães no tempo 50, dia em que ocorreu a vacinação dos animais.

Uma das maneiras de se avaliar o bem-estar dos animais é mediante análise dos níveis de cortisol sanguíneo, o qual pode ser considerado o maior indicador fisiológico do estresse em cães (VINCENT; MICHELL, 1992; HENNESSY et al., 1997).

O estresse agudo está relacionado com a ativação do sistema nervoso simpático e aumento dos níveis de catecolaminas no sangue, levando a alterações transitórias no número e na atividade dos leucócitos do plasma. Já o estresse persistente ou crônico é responsável pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com liberação do hormônio cortisol que está associado com diminuição das funções imunes, que podem perdurar por vários dias ou até meses (OPPERMANN et al., 2002).

O cortisol contribui para a diminuição da proliferação de linfócitos através da inibição de interleucina -1, interleucina -2 e interferon gama (IFN- γ), sendo assim seu maior efeito está

na imunidade celular (ELENKOV et al., 2000). Diante do exposto pode-se afirmar que níveis mais altos de cortisol além de indicarem nível inadequado de bem-estar, impactam negativamente no funcionamento do sistema imune.

Yah-Qiang et al. (2001) concluíram que ratos consumindo dietas deficientes em zinco apresentaram maior concentração plasmática de cortisol, em relação à ratos consumindo uma dieta balanceada em zinco. Esse resultado sugere que o zinco pode ter participação na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, contribuindo para a redução da concentração de cortisol.

Avaliando o sistema imune de poedeiras sob estresse térmico que receberam dietas com suplementação de curcumina por 42 dias, Liu et al. (2020) encontraram menores valores de corticosterona no soro das aves que foram alimentadas com 100, 150 ou 200 mg/kg de curcumina na dieta.

A redução de cortisol nos cães que consumiram a ração com cúrcuma, pode estar relacionada ao seu efeito na resposta inflamatória sérica. Os efeitos anti-inflamatórios da curcumina são mediados por sua capacidade de bloquear a ativação do fator nuclear kappa B em resposta a estímulos inflamatórios (SINGH; AGGARWAL, 1995) e de suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral- α , IL-1 β , IL-6, e IL-8 (ABE et al., 1999; JAGETIA; AGGARWAL, 2007).

Dessa forma compreende-se que uma menor concentração de cortisol, contribui para o melhor funcionamento do sistema imune dos cães. Assim, as células de defesa podem agir de forma eficaz na proteção do organismo. Ainda é possível inferir que alguns dos aditivos nutracêuticos incluídos nos tratamentos 1 e 2 podem ter contribuído para a redução do cortisol.

Não foram encontradas diferenças na concentração da proteína de fase aguda haptoglobina (Hp) entre os tratamentos e nos diferentes tempos de coleta de sangue (Tabela 3).

Durante a estimulação do sistema imunológico, citocinas são liberadas na circulação por células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, que induzem o fígado a produzir proteínas de fase aguda, como o Hp. A elevação da Hp em cães é ocasionada por processos inflamatórios, corticoterapia (SUBIELA et al., 2001), tripanossomíase, leishmaniose, trauma e síndrome de Cushing (CERÓN et al., 2005). A Hp pode ser detectada na circulação 24 horas após o trauma e suas concentrações chegam ao pico máximo em quatro dias, possui importante efeito imunomodulador (CERÓN et al., 2005).

Liu et al. (2013) observaram aumento na concentração de Hp de suínos desafiados e suplementados com extrato de pimentão na dieta, 14 dias após o desafio e encontraram que o

nível de Hp se manteve alto mesmo após o pico de 4 dias. Outros extratos vegetais foram utilizados (alho e cúrcuma), mas não se mostraram eficazes em elevar a concentração de Hp.

Tabela 3: Parâmetros da função imune de cães idosos recebendo dieta com diferentes aditivos nutracêuticos.

Variáveis	Tempo	Tratamentos			Média	EPM	p-valor*		
		Controle	1	2			Tempo	Dieta	D x T
Interleucina 10 (ng/ml)	0	403,25	487,00	525,50	471,92a	123,67	0,0013	0,1682	0,1276
	50	223,75	158,17	434,25	272,05b				
	57	355,00	467,50	498,25	440,25a				
	71	443,25	288,00	813,00	514,75a				
	Média	356,31	350,17	567,75					
Cortisol (ng/ml)	0	106,22	61,77	58,97	75,66a	10,43	0,0006	0,0500	0,3498
	50	82,60	88,55	53,87	75,00a				
	57	63,50	46,52	21,08	43,70b				
	71	47,15	37,67	36,85	40,55b				
	Média	74,87a	58,63ab	42,69b					
Haptoglobina (ng/ml)	0	74,30	78,39	63,77	72,16	7,31	0,9827	0,7631	0,9118
	50	80,87	71,50	74,01	75,46				
	57	80,71	59,90	79,80	73,47				
	71	69,48	76,14	67,18	70,93				
	Média	76,34	71,48	71,19					
Interferon gama (pg/ml)	0	124,02	164,50	68,32	118,95	127,05	0,7474	0,9496	0,3988
	50	216,22	331,17	101,00	216,13				
	57	209,02	68,75	334,37	204,05				
	71	188,87	73,60	307,47	189,98				
	Média	184,54	159,50	202,79					
Fator de necrose tumoral (TNF- α)	0	11,06	12,84	14,52	12,81b	43,03	<0,0001	0,3749	0,8338
	50	31,72	66,65	48,35	48,90b				
	57	236,80	288,90	213,42	246,37a				
	71	355,92	374,77	198,27	309,66a				
	Média	158,88	185,79	118,64					
Óxido nítrico (μ mol/ml)	0	-	-	-	-	2,57	0,2867	0,5997	0,0684
	50	34,70	22,03	22,60	26,44				
	57	20,44	21,27	20,50	20,74				
	71	18,60	32,63	23,42	24,88				
	Média	24,58	25,31	22,17					

* T – efeito do tempo; D – efeito da dieta; D x T – interação dieta e tempo.

Letras distintas minúsculas nas linhas são estatisticamente significativas ao teste de Tukey ($p < 0,05$); EPM: erro padrão da média.

O interferon gama (IFN- γ) é uma citocina pró-inflamatória secretada por linfócitos T ativados (SHE et al., 2017). No presente estudo não foram encontradas diferenças na concentração de IFN- γ entre os tratamentos e nos diferentes tempos (Tabela 3).

Zaine (2010) avaliou a inclusão de diferentes tipos de parede celular de levedura na dieta de cães desafiados com vacina contra Leptospirose, não houve alteração na concentração de IFN- γ entre os tratamentos, nem entre os tratamentos e o grupo controle.

Observou-se aumento ($p < 0,05$) dos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral alfa nos dias 57 e 71. Não houve efeito ($p > 0,05$) das dietas sobre esse parâmetro (Tabela 3).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta de fase aguda, é indetectável ou encontrado em baixas concentrações na circulação em condições normais, mas sua produção e secreção aumentam no quadro de inflamação (MEHAFFEY; MAJID, 2017).

Arjoonsingh et al. (2019) avaliaram a resposta inflamatória de cães da raça Beagle previamente vacinados e desafiados com cepas de *Leptospira*. Foi verificado aumento nos níveis de TNF alfa nos 7 dias após o desafio imunológico.

Liu et al. (2013) estudaram a inclusão de extratos de plantas (pimenta, alho ou cúrcuma) na dieta de leitões desmamados e infectados experimentalmente com o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína. Foi encontrado aumento na concentração de TNF alfa nos leitões que foram desafiados em relação a um grupo não desafiado. Além disso, dentro do grupo de animais desafiados foi verificado redução de TNF alfa nos leitões que consumiram as dietas com extrato de pimenta e de cúrcuma. É possível inferir que a inclusão de cúrcuma e pimenta contribuiu para reduzir a inflamação gerada pelo desafio induzido.

No presente trabalho a inclusão de aditivos nutracêuticos na dieta dos cães não foi eficaz em reduzir a concentração de TNF alfa. Entretanto, o aumento verificado nos dias 57 e 71 confirma que o desafio imunológico aplicado foi relevante e todos os cães passaram por uma resposta inflamatória.

O óxido nítrico (ON) é um componente citotóxico e citostático para diversos parasitas, com propriedades oxidativas e pró-oxidativas em doenças inflamatórias. Foi demonstrado que a interação entre ON e mieloperoxidase pode ter um efeito profundo na capacidade tóxica dos neutrófilos (BRUNET, 2001; KNAAPEN et al., 2005). Não foram encontradas diferenças nas concentrações plasmáticas de óxido nítrico entre os tratamentos (Tabela 4).

A MPO está envolvida na peroxidação lipídica, eliminação direta de óxido nítrico e inibição de óxido nítrico sintase (NICHOLLS; HAZEN, 2005). No presente estudo, somente os cães do tratamento 1 expressaram maior concentração de MPO no plasma, o que demonstra uma maior resposta imune frente ao desafio da vacinação. Também houve contraste significativo para essa variável entre os tratamentos 1 e 2 (Tabela 5). Esses resultados apontam que os nutracêuticos do tratamento 1 modularam a função antioxidantes, mas ainda não está claro

porque esse resultado não foi semelhante no tratamento 2, que possui maior composição de aditivos nutracêuticos.

Aşkar et al. (2019) encontraram maior concentração de MPO e ON no soro de cães naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina, em relação à cães saudáveis.

Foi verificada redução ($p < 0,05$) dos níveis plasmáticos de SOD nos dias 50, 57 e 71. Não houve efeito ($p > 0,05$) das dietas sobre a SOD plasmática dos cães (Tabela 4).

Os sistemas enzimáticos de defesa antioxidante geralmente atuam em conjunto e requerem cofatores. Existem quatro classes de SOD. Ferro SOD (FeSOD), manganês SOD (MnSOD), cobre-zinco SOD (Cu/ZnSOD) e níquel SOD (NiSOD), sendo Cu/Zn SOD, o mais abundante no citosol e no espaço extracelular (ABREU; CABELLI, 2010).

A SOD é responsável por acelerar a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é então reduzido pela glutatona peroxidase em água (FINKEL; HOLBROOK, 2000). O aumento da atividade da SOD nos tecidos pode indicar uma resposta adaptativa a uma situação de estresse ou potencial envolvimento da defesa antioxidante em condições de estresse (SURAI, 2016).

No presente trabalho, a redução da concentração de SOD encontrada nos dias 57 e 71 pode estar relacionada ao desafio imunológico sofrido pelos cães no dia 50. Cao et al. (2018), avaliaram a resposta antioxidante de leitões desafiados com LPS de *Escherichia coli* e de um grupo controle que recebeu solução de NaCl 0,9%. Houve redução da atividade da SOD no jejuno dos leitões desafiados, além de redução dos níveis de mRNA de genes relacionados a SOD (Cu/Zn-SOD e MnSOD).

Em estudo realizado com cães, Crnogaj et al. (2017) encontraram menores valores de atividade de SOD em cães naturalmente infectados por *Babesia canis canis*, independente da gravidade da doença.

De forma geral, os biomarcadores antioxidantes são reduzidos em condições associadas ao estresse oxidativo (PENG et al., 2000). Apesar disso, a redução no dia 50 não está relacionada ao desafio vacinal, pois a coleta de sangue foi feita antes da imunização e, ainda que tenha sido feita após, não haveria tempo hábil para resposta nos níveis plasmáticos de SOD.

Pereira et al. (2020) estudaram fontes de zinco em dietas para cães Beagles adultos. As dietas foram suplementadas com 75 mg/kg de sulfato de zinco (fonte inorgânica) ou proteínato de zinco (fonte orgânica), com ou sem inclusão de enzimas exógenas. Não houve alteração na atividade plasmática da enzima superóxido dismutase entre os tratamentos. Resultado

semelhante ao encontrado no presente trabalho onde mesmo com uma alta suplementação de zinco orgânico e frente a um desafio não houve alteração na resposta da SOD.

Tabela 4: Parâmetros antioxidantes de cães idosos recebendo dieta com diferentes aditivos nutracêuticos.

Variáveis	Tempo	Tratamentos			Média	EPM	p-valor*		
		Controle	1	2			Tempo	Dieta	D x T
Superóxido dismutase (ng/ml)	0	25,52	27,30	26,90	26,57a	0,44	<0,0001	0,7220	0,2216
	50	23,87	24,10	23,52	23,83b				
	57	20,10	19,87	20,90	20,29c				
	71	20,70	20,45	19,47	20,21c				
	Média	22,55	22,93	22,70					
Malondialdeído (nmol/ml)	0	4,33	4,18	4,32	4,27	0,13	0,0632	0,0038	0,2203
	50	4,63	4,56	4,28	4,49				
	57	5,62	4,30	5,16	5,02				
	71	4,57	3,72	5,03	4,44				
	Média	4,79a	4,19b	4,70a					
Mieloperoxidase (pg/ml)	0	10,92	16,17	10,80	12,63	3,02	0,6421	0,0338	0,6246
	50	13,40	18,97	12,30	14,89				
	57	9,67	22,42	10,65	14,25				
	71	9,22	20,62	8,92	12,92				
	Média	10,80b	19,55a	10,67b					

* T – efeito do tempo; D – efeito da dieta; D x T – interação dieta e tempo.

Letras distintas minúsculas nas colunas e nas linhas são estatisticamente significativas ao teste de Tukey ($p < 0,05$); EPM: erro padrão da média.

A concentração de malondialdeído (MDA) foi menor ($p < 0,05$) no tratamento 1, indicando menor formação de radicais livres, portanto, melhor efeito antioxidante nesse tratamento. Também é evidenciado na análise de contraste que houve diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os dois tratamentos avaliados (1 e 2), e entre os dois tratamentos, sendo a menor concentração de MDA encontrada no tratamento 1 (Tabela 5). Não houve efeito do tempo ($p > 0,05$) de coleta para esse parâmetro (Tabela 4).

Melhorar a resistência oxidativa é uma das rotas pelas quais o Zn é conhecido por beneficiar o sistema imunológico (HILL et al., 2014). She et al. (2017) avaliaram a inclusão de diferentes níveis e fontes de zinco para leitões desmamados com 28 dias de idade. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: dieta deficiente em zinco; suplementação com fonte de zinco inorgânico ou suplementação com zinco orgânico. Verificou-se redução na concentração de MDA no baço e fígado dos leitões que receberam dieta com suplementação de zinco orgânico. Confirmando que a inclusão do mineral na dieta aumenta a proteção das células contra peroxidação lipídica.

Tabela 5: Contrastes ortogonais dos parâmetros de função imune de cães idosos recebendo dieta com diferentes aditivos nutracêuticos.

Variáveis		Média	EPM	Valor-p [§]	Contraste Controle x Rações Testes ¹	Contraste Tratamento 1 x Ração Tratamento 2 ²
Interleucina 10	Controle	356,31	123,67	0,1682	0,4161 ^{ns}	0,1769 ^{ns}
	T1	350,17				
	T2	567,75				
SOD	Controle	22,55	0,44	0,7220	1,0000 ^{ns}	1,0000 ^{ns}
	T1	22,93				
	T2	22,70				
Cortisol	Controle	74,87	10,43	0,0500	0,0450*	0,1838 ^{ns}
	T1	58,63				
	T2	42,69				
Haptoglobina	Controle	76,34	7,31	0,7631	0,9499 ^{ns}	0,9709 ^{ns}
	T1	71,48				
	T2	71,19				
Interferon	Controle	184,54	127,05	0,9496	1,0000 ^{ns}	1,0000 ^{ns}
	T1	159,50				
	T2	202,79				
MDA	Controle	4,79	0,13	0,0038	0,0176*	0,0098*
	T1	4,19				
	T2	4,70				
TNF	Controle	158,88	43,03	0,3749	0,8699 ^{ns}	0,3506 ^{ns}
	T1	185,79				
	T2	118,64				
MPO	Controle	10,80	3,02	0,0338	0,1551 ^{ns}	0,0433*
	T1	19,55				
	T2	10,67				
Óxido Nítrico	Controle	24,58	2,57	0,5997	0,7666 ^{ns}	0,6917 ^{ns}
	T1	25,31				
	T2	22,17				

*Valor-p dos contrastes; §Valor-p da análise de variância dos tratamentos; ¹:Contraste das dietas controle × Testes (Tratamento 1 - T1 e Tratamento 2 - T2); ²: Contraste das dietas Ração Tratamento 1 × Ração Tratamento 2.EPM: Erro-padrão da média.

Khazaie et al. (2019) avaliaram o efeito da administração intraperitoneal de vitamina C em ratos Wistar desafiados com diazinon, um pesticida organofosforado que pode causar estresse oxidativo no organismo. O tratamento com vitamina C apresentou efeitos benéficos contra o estresse oxidativo, reduzindo os níveis de MDA, especialmente no tecido cerebral e fígado.

De forma semelhante Hidayatik et al. (2021) encontraram redução dos níveis de MDA no soro de ratos que sofreram estresse induzido, após suplementação de vitamina C e E por 4 semanas.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a inclusão dos aditivos nutracêuticos estudados na dieta de cães senis é eficaz em modular a resposta imune, como observado pela redução de cortisol. De modo que ambos os tratamentos se mostraram eficazes, em relação ao grupo controle. Além disso, com a inclusão dos aditivos nutracêuticos na dieta houve melhora da função antioxidante, visto pela redução de malondialdeído e aumento de mieloperoxidase. A modulação do sistema imune e função antioxidante através da dieta é uma ferramenta eficaz e viável que pode melhorar a qualidade de vida de cães senis.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; HASHIMOTO, S.; HORIE, T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Pharmacological research**, 39, n. 1, p. 41-47, 1999.
- ABREU, I. A.; CABELLI, D. E. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, 1804, n. 2, p. 263-274, 2010.
- ARJOONSINGH, V.; SUEPAUL, R.; ADESIYUN, A. Cytokines changes in beagle dogs vaccinated and challenged with virulent *Leptospira* strains. *In: Faculty of Medical Sciences, Research Day*. 2019.
- BJERRE, A.; BRUSLETTO, B.; HØIBY, E. A.; KIERULF, P. et al. Plasma interferon- γ and interleukin-10 concentrations in systemic meningococcal disease compared with severe systemic Gram-positive septic shock. **Critical care medicine**, 32, n. 2, p. 433-438, 2004.
- BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International immunopharmacology**, 1, n. 8, p. 1457-1467, 2001.
- CAO, S.; ZHANG, Q.; WANG, C.; WU, H. et al. LPS challenge increased intestinal permeability, disrupted mitochondrial function and triggered mitophagy of piglets. **Innate immunity**, 24, n. 4, p. 221-230, 2018.
- CASE, L. P.; DARISTOTLE, L.; HAYEK, M. G.; RAASCH, M. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals**. Elsevier Health Sciences, 2010. 0323071473.
- CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, 34, n. 2, p. 85-99, 2005.
- CRNOGAJ, M.; CERÓN, J. J.; ŠMIT, I.; KIŠ, I. et al. Relation of antioxidant status at admission and disease severity and outcome in dogs naturally infected with *Babesia canis canis*. **BMC veterinary research**, 13, n. 1, p. 1-9, 2017.
- DZANIS, D. A. N. Necessidades nutricionais e manejo dietético. *In: HOSKINS, J. D. Geriatria e gerontologia do cão e do gato*. 2 ed. São Paulo: Roca. p. 21-32, 2008.
- ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF- α /IL-10 balance: Clinical implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 917, n. 1, p. 94-105, 2000.
- FERREIRA, L. G.; ENDRIGHI, M.; LISENKO, K. G.; DE OLIVEIRA, M. R. D. et al. Oat beta-glucan as a dietary supplement for dogs. **PloS one**, 13, n. 7, p. e0201133, 2018.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **nature**, 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

GAN, Z.; WEI, W.; LI, Y.; WU, J. et al. Curcumin and resveratrol regulate intestinal bacteria and alleviate intestinal inflammation in weaned piglets. **Molecules**, 24, n. 7, p. 1220, 2019.

GOLDSTON, R. T.; HOSKINS, J. D. **Geriatrics & gerontology of the dog and cat**. Philadelphia Saunders, 1995. 426 p.

HIDAYATIK, N.; PURNOMO, A.; FIKRI, F.; PURNAMA, M. T. E. Amelioration on oxidative stress, testosterone, and cortisol levels after administration of Vitamins C and E in albino rats with chronic variable stress. **Veterinary World**, 14, n. 1, p. 137, 2021.

HILL, G.; MAHAN, D.; JOLLIFF, J. Comparison of organic and inorganic zinc sources to maximize growth and meet the zinc needs of the nursery pig. **Journal of animal science**, 92, n. 4, p. 1582-1594, 2014.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. "Spicing up" of the immune system by curcumin. **Journal of clinical immunology**, 27, n. 1, p. 19-35, 2007.

JAGUEZESKI, A. M.; PERIN, G.; BOTTARI, N. B.; WAGNER, R. et al. Addition of curcumin to the diet of dairy sheep improves health, performance and milk quality. **Animal Feed Science and Technology**, 246, p. 144-157, 2018.

KHAZAIE, S.; JAFARI, M.; HEYDARI, J.; ASGARI, A. et al. Modulatory effects of vitamin C on biochemical and oxidative changes induced by acute exposure to diazinon in rat various tissues: prophylactic and therapeutic roles. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 103, n. 5, p. 1619-1628, 2019.

KIM, J.; MULLAN, B.; PLUSKE, J. **Impact of the systemic response to stressors and subclinical and clinical infection on intestinal barrier function and growth in pigs**. In: XIV., M. P. P. Proceedings of the 14th Australasian Pig Science Association (APSA) Biennial Conference. Melbourne, Australia. 61-76. 2013.

KNAAPEN, A. M.; SCHINS, R. P.; BORM, P. J.; VAN SCHOOTEN, F. J. Nitrite enhances neutrophil-induced DNA strand breakage in pulmonary epithelial cells by inhibition of myeloperoxidase. **Carcinogenesis**, 26, n. 9, p. 1642-1648, 2005.

LIU, M.; LU, Y.; GAO, P.; XIE, X. et al. Effect of curcumin on laying performance, egg quality, endocrine hormones, and immune activity in heat-stressed hens. **Poultry science**, 99, n. 4, p. 2196-2202, 2020.

LIU, Y.; SONG, M.; CHE, T.; ALMEIDA, J. et al. Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of animal science**, 91, n. 11, p. 5294-5306, 2013.

MEHAFFEY, E.; MAJID, D. S. Tumor necrosis factor- α , kidney function, and hypertension. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 313, n. 4, p. F1005-F1008, 2017.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

- NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 25, n. 6, p. 1102-1111, 2005.
- PENG, J.; JONES, G. L.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free radical biology and medicine**, 28, n. 11, p. 1598-1606, 2000.
- PEREIRA, A. M.; GUEDES, M.; MATOS, E.; PINTO, E. et al. Effect of zinc source and exogenous enzymes supplementation on zinc status in dogs fed high phytate diets. **Animals**, 10, n. 3, p. 400, 2020.
- SHE, Y.; HUANG, Q.; LI, D.; PIAO, X. Effects of proteinate complex zinc on growth performance, hepatic and splenic trace elements concentrations, antioxidative function and immune functions in weaned piglets. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 30, n. 8, p. 1160, 2017.
- SINGH, S.; AGGARWAL, B. B. Activation of Transcription Factor NF- κ B Is Suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane)(*). **Journal of Biological Chemistry**, 270, n. 42, p. 24995-25000, 1995.
- SOUZA, K. L.; GURGUL-CONVEY, E.; ELSNER, M.; LENZEN, S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. **Journal of endocrinology**, 197, n. 1, p. 139-150, 2008.
- SPARKES, A. H. Feeding old cats - An update on new nutritional therapies. **Topics in companion animal medicine**, 26, n. 1, p. 37-42, 2011.
- SUBIELA, S. M.; TECLES, F.; PARRA, M.; CERÓN, J. **Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria**. In: Anales de Veterinaria de Murcia. 97-113. 2001.
- SURAI, P. F. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. **Journal of Animal Research and Nutrition**, 1, n. 1, p. 8, 2016.
- ZAINE, L. **Avaliação do efeito de derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre a resposta imune de cães adultos**. 57 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/11449/89204> >.

ANEXO



ARCHER DANIEL MIDLAND
CENTRO DE NUTRIÇÃO – ANIMAL NUTRITION
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "NEOMUNE", sob a responsabilidade de Moara Marina Belo Matos Silveira, Flávia Maria Borges de Oliveira Saad, Waleska Marques da Silva, Daniel de Souza Dias e Olivier Capet, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Centro de Nutrição da Archer Daniels Midland, por aprovação via e-mail, 21/11/2018.

Vigência da autorização: 01/12/2018 a 31/04/2019

Finalidade: Pesquisa Científica

Espécie/Linhagem/Raça: Cães/American Foxhound

Nº de animais aprovados: 24

Peso/idade: 27,6±2,6kg / 10 anos

Sexo: macho e fêmea

Origem dos animais: Centro de Nutrição - Archer Daniels Midland. Responsável: Waleska Marques da Silva

Waleska Marques da Silva
 Waleska Marques da Silva

Vice-presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Centro de Nutrição – Animal Nutrition – Brazil
 Archer Daniels Midland Company
 Rod. Fernão Dias, km 755 – Distrito Industrial
 Três Corações – MG