

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO 1,3/1,6 BETA-GLUCANO NO SISTEMA IMUNE
DE CADELAS SUBMETIDAS A OVÁRIO-HISTERECTOMIA**

Leandro Zaine

Médico veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO 1,3/1,6 BETA-GLUCANO NO SISTEMA IMUNE
DE CADELAS SUBMETIDAS A OVÁRIO-HISTERECTOMIA**

Leandro Zaine

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

Coorientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

2014

Zaine, Leandro
Z21e Efeito do 1,3/1,6 beta-glucano no sistema imune de cadelas submetidas a ovário-histerectomia / Leandro Zaine. -- Jaboticabal, 2014
xvii, 56 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Ricardo Souza Vasconcellos, Silvio Luis de Oliveira, Lucia Helena Faccioli
Bibliografia

1. Fagocitose. 2. Proteína C-reativa. 3. Levedura. 4. Imunidade. 5. Ex vivo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.084.5:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

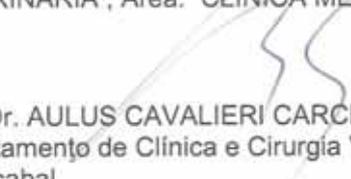
TÍTULO: EFEITO DO 1,3/1,6 BETA-GLUCANO NO SISTEMA IMUNE DE CADELAS SUBMETIDAS A OVÁRIO-HISTERECTOMIA

AUTOR: LEANDRO ZAINÉ

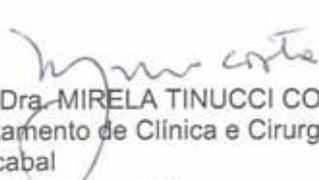
ORIENTADOR: Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

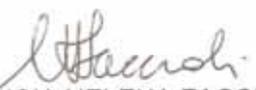
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

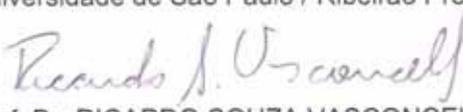
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. SILVIO LUIS DE OLIVEIRA

Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu


Profa. Dra. LUCIA HELENA FACCIOLI

Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. RICARDO SOUZA VASCONCELLOS

Universidade Estadual de Maringá / Maringá/PR

Data da realização: 03 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LEANDRO ZAINE – Nascido em 16 de junho de 1983, em Rio Claro, estado de São Paulo, filho de José Eduardo Zaine e Mariselma Ferreira Zaine, tornou-se graduado em Medicina Veterinária, em dezembro de 2006, pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – em Araçatuba, SP. Durante o curso de graduação, foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – na área de imunologia veterinária, de 2004 a 2005. Após completar a graduação, foi bolsista pela Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão – FUNEP – no ano de 2007, desenvolvendo projetos relacionados a nutrição de cães e gatos, em parceria com empresas privadas, sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Obteve a primeira colocação no processo seletivo do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, curso de mestrado, realizado de 2008 a 2010, sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, tendo iniciado as pesquisas envolvendo derivados de parede celular de levedura e a imunidade de cães. Iniciou o doutorado em março de 2010 e prosseguiu a linha de pesquisa, também aprofundando os conhecimentos em nutrição clínica de cães e gatos e tendo participado de 4 eventos da área na Europa e Estados Unidos.

EPÍGRAFE

“Não entregues tua alma à tristeza, não atormentes a ti mesmo em teus pensamentos. A alegria do coração é a vida do homem, e um inesgotável tesouro de santidade. A alegria do homem torna mais longa a sua vida. Tem compaixão de tua alma, torna-te agradável a Deus, e sê firme; concentra teu coração na santidade, e afasta a tristeza para longe de ti, pois a tristeza matou a muitos, e não há nela utilidade alguma. A inveja e a ira abreviam os dias, e a inquietação acarreta a velhice antes do tempo. Um coração bondoso e nobre banqueteia-se continuamente, pois seus banquetes são preparados com solicitude.”

(Livro do Eclesiástico, capítulo 30, versículos 22 a 27).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Eduardo e Mariselma, pelo amor, apoio, carinho e confiança.

Por me ensinarem a buscar ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu apoio e meu sustento em tudo na vida. Por me permitir conhecer a Sua vontade e trazer alegria ao meu coração. Mesmo nas dificuldades Ele sempre me sustentou, me conduzindo sob suas asas.

Também agradeço à minha família, sem a qual não teria chegado até aqui. Aos meus pais, José Eduardo e Mariselma, pelo incentivo para prosseguir nos estudos até o nível de doutorado. Também à minha avó Lígia, meus irmãos Gabriel e Daniel, minhas tias e primos, que sempre me acompanharam por toda a vida.

À minha namorada Fernanda, companheira de todos os momentos, por me fazer uma pessoa melhor a cada dia, pelo amor e pela esperança de construirmos um grande futuro juntos. Pela ajuda, inclusive, em coletas de sangue e processamento de amostras.

Aos meus amigos da Igreja, especialmente o Padre Paulo e a Denize, por todo o acolhimento, apoio e amizade, com vocês minha permanência em Jaboticabal foi melhor. E também à Irmã Terezinha, grande apoio e sustento nas orações.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi pelo exemplo pessoal e profissional de sucesso. Sua companhia e exemplo nos 7 anos em Jaboticabal me fizeram uma pessoa e um profissional melhor.

Ao meu coorientador, Prof. Helio José Montassier e toda a sua equipe, por ter disponibilizado seu laboratório para o nosso uso, sem o qual grande parte das análises realizadas não seria possível. Agradeço à Dra. Fátima, Lurdinha, Filipe, Ketherson, Romeu e Mariana.

Grande parte desse trabalho só foi possível graças às amigas e parceiras Thaila e Fernanda. Tanto esforço fizemos juntos para que tudo isso fosse viável. Muito obrigado por tudo!

Agradeço à nossa equipe de coleta e amigos do laboratório pela ajuda essencial, muitas vezes ainda de madrugada. Nosso agradecimento à Ana Paula, Bruna Agy, Bruna Ponciano, Katiani, Márcia, Mariana e Raquel. Também a meu amigo

Nycolas, socorro nas horas de aperto, pelas conversas intermináveis e força. Sem vocês nada disso seria possível.

Reconhecemos também a ajuda imprescindível dos funcionários dos laboratórios, Elaine e Diego e Renata. Especialmente, à Claudia Nogueira, pelo preparo de soluções, leitura de lâminas, ajuda nos cálculos e em tantas outras coisas, também por toda a amizade e apoio.

Um agradecimento especial ao Prof. Jeffrey Frederico Lui e toda sua equipe, por ter permitido o uso do espaço e dos animais da campanha de castração. Agradeço também aos cirurgiões e à equipe de apoio que realizaram as castrações. Que esse importante trabalho social possa continuar sendo realizado.

Também agradeço a todas as 28 cadelas utilizadas no experimento e seus proprietários. Como sempre foi enfatizado a eles, através do resultado da pesquisa com elas poderíamos ajudar na saúde de outros animais.

Outro grande agradecimento a quem sempre foi de grande auxílio nos momentos de dúvidas técnicas, à Iza e, especialmente à Wendy da USP Ribeirão Preto. Obrigado por tantos conhecimentos compartilhados, por tantas vezes. Agradeço às técnicas do citômetro de fluxo Fabiana e Denise, por tantas leituras, análises, interpretações e ideias.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Gilson Hélio Toniollo, Prof. Jeffrey Frederico Lui, Profa. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos e Profa. Luciana Domingues Oliveira; e de defesa Profa. Mirela Tinucci Costa, Prof. Ricardo Souza Vasconcellos, Prof. Silvio Luis de Oliveira e Profa. Lucia Helena Faccioli.

Ao Prof. Euclides Braga Malheiros pela ajuda e paciência nas análises estatísticas para interpretação dos resultados obtidos.

À Fapesp pela bolsa de estudo (nº processo Fapesp 2011/10641-8) concedida para a realização desse projeto. E também à Biorigin pelo apoio financeiro indispensável para a realização desta pesquisa.

À Mogiana Alimentos S/A, pela estrutura e manutenção do Laboratório de

Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.

Aos que eventualmente eu tenha esquecido, mas que tenham contribuído com a realização desse trabalho. A participação de vocês não é menos importante.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 1 |
| 3. OBJETIVOS | 7 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 8 |
| 4.1 Experimento 1 - Efeitos <i>ex vivo</i> do beta-glucano sobre leucócitos caninos | 8 |
| 4.2 Experimento 2 - - Avaliação dos efeitos imunológicos de beta-1,3/1,6-glucano em cadelas submetidas a ovário-histerectomia | 10 |
| 4.2.1 Delineamento experimental | 10 |
| 4.2.2 Seleção dos animais | 11 |
| 4.2.3 Dietas experimentais | 14 |
| 4.2.4 Manejo dos animais | 16 |
| 4.2.5 Procedimento cirúrgico | 17 |
| 4.2.6 Coletas de sangue | 17 |
| 4.2.7 Avaliação hematológica | 18 |
| 4.2.8 Fenótipo de leucócitos periféricos..... | 18 |
| 4.2.9 Avaliação da atividade fagocítica de leucócitos periféricos..... | 19 |
| 4.2.10 Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular | 20 |
| 4.2.11 Concentração de intermediários reativos do oxigênio (H ₂ O ₂) e nitrogênio (NO) | 18 |
| 4.2.12 Concentração de proteína C-reativa sérica | 20 |
| 4.2.13 Análise estatística | 21 |
| 5. RESULTADOS | 22 |
| 5.1 Experimento 1 - Efeitos <i>ex vivo</i> do beta-glucano sobre leucócitos caninos ... | 22 |
| 5.2 Experimento 2 - Avaliação do efeito de beta-1,3/1,6-glucano em cadelas submetidas a de ovário-histerectomia | 24 |
| 5.2.1 Avaliação hematológica..... | 24 |
| 5.2.2 Fenótipo de leucócitos periféricos | 27 |
| 5.2.3 Avaliação da atividade fagocítica de leucócitos periféricos..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 5.2.4 Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular | 33 |
| 5.2.5 Concentração de intermediários reativos do oxigênio (H ₂ O ₂) e do nitrogênio (NO) | 35 |
| 5.2.6 Concentração de proteína-C reativa sérica | 37 |
| 6. DISCUSSÃO | 38 |
| 7. CONCLUSÃO | 46 |
| 8. REFERÊNCIAS | 47 |
| APÊNDICE 1. Valores de referência para os parâmetros eritroleucométricos | 56 |



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

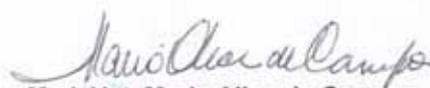
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 000618/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Efeitos da suplementação pré e pós-operatória de beta-1,3/1,6-glucano sobre parâmetros imunes de cadelas submetidas a ovariosalpingohisterectomia**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 10 de Fevereiro de 2011.

Jaboticabal, 11 de Fevereiro de 2011.



Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA



Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

EFEITO DO 1,3/1,6 BETA-GLUCANO NO SISTEMA IMUNE DE CADELAS SUBMETIDAS A OVÁRIO-HISTERECTOMIA

RESUMO- Estudos sobre os possíveis efeitos de beta-glucanos sobre a resposta imune têm sido realizados há muito tempo, pois a imunomodulação que eles podem causar pode auxiliar na resistência a doenças e, até mesmo, tumores. Assim sendo, foram realizados dois experimentos para avaliar a ação de um beta-glucano derivado da parede celular de levedura sobre parâmetros imunológicos na espécie canina. O experimento 1 avaliou a ação *ex vivo* do composto, leucócitos caninos receberam 3 doses de beta-glucano e foi encontrado que a substância estimulou, de maneira dose-dependente, a produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, em neutrófilos e monócitos. O experimento 2 estudou a ação da substância sobre parâmetros imunes de cadelas submetidas a uma situação de imunossupressão: anestesia e cirurgia de castração. Foram utilizadas 28 cadelas adultas de diferentes raças e divididas em três grupos: controle (CT – n=10), suplementadas com 0,1% de beta-glucano na dieta extrusada (BG-E – n=9) e suplementadas com a mesma dose, mas administrada em cápsulas (BG-C – n=9). As avaliações foram realizadas em quatro períodos, 14 dias antes da cirurgia, pré-operatório imediato, pós-operatório imediato e 14 dias após a cirurgia. Os testes realizados para se investigar os efeitos deste nutracêutico foram avaliação hematológica, imunofenotipagem de leucócitos periféricos, avaliação de fagocitose de leucócitos periféricos, dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares, determinação da produção de intermediários reativos do oxigênio (H₂O₂) e nitrogênio (NO), e dosagem de proteína-C reativa sérica. O tratamento BG-C levou a uma maior porcentagem de fagocitose de monócitos. Apenas as cadelas do grupo controle tiveram uma tendência a aumento da concentração de proteína C-reativa após a cirurgia. O procedimento cirúrgico foi capaz de alterar o número de células e função destas. Conclui-se que o beta-glucano atuou sobre a imunidade nos modelos de estudo propostos.

PALAVRAS-CHAVE: *ex vivo*, fagocitose, imunidade, levedura, proteína C-reativa

EFFECTS OF 1,3/1,6 BETA-GLUCAN ON THE IMMUNE SYSTEM OF BITCHES UNDERGOING OVARIOHYSTERECTOMY

ABSTRACT – Studies evaluating the effects of beta-glucans on the immune response have been made long ago; because of the immunomodulation that they cause can lead to increase resistance to infections and even to tumors. Thus, we conducted two experiments to evaluate the action of a yeast-derived beta-glucan in dogs. In the experiment 1 the *ex vivo* action was studied, canine leukocytes were treated with 3 different doses of beta-glucan and the results showed that the production of oxygen and nitrogen reactive species by neutrophils and monocytes was stimulated in a dose-dependent manner. In the experiment 2 the action of beta-glucan on immune parameters of bitches undergoing ovary-hysterectomy was evaluated, as a situation of immunosuppression. Twenty-eight bitches of different breeds were divided into three groups: control (CT – n=10), 0.1% beta-glucan in the extruded diet (BG-E – n=9) and supplemented with the same dose, but administered in capsules (BG-C – n=9). Evaluations were performed in four periods, 14 days before the surgery, immediate preoperative and postoperative and 14 days after the surgery. The tests performed included complete blood count, evaluation of leukocyte subsets, phagocytosis test, production of cytokines in supernatant of cell culture, production of oxygen and nitrogen reactive species and serum C-reactive protein. BG-C treatment lead to higher percentage of phagocytosis by monocytes. Only the control group tended to increase the concentration of C-reactive protein after the surgery. Surgical procedure was capable of changing the number of cells and their function. In conclusion, beta-glucan acted on the immunity considering the presented models.

KEY-WORDS: C-reactive protein, *ex vivo*, immunity, phagocytosis, yeast

LISTA DE TABELAS

| | | Página |
|-------------------|--|--------|
| Tabela 1. | Animais selecionados para utilização durante o experimento... | 13 |
| Tabela 2. | Fórmula das dietas experimentais..... | 15 |
| Tabela 3. | Composição química analisada das dietas experimentais. Valores sobre a matéria original | 16 |
| Tabela 4. | Concentração das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por neutrófilos e monócitos caninos, estimulados com beta-glucano..... | 23 |
| Tabela 5. | Peso corporal inicial e final das cadelas ao longo do experimento (média ± erro padrão)..... | 24 |
| Tabela 6. | Hemograma antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano..... | 26 |
| Tabela 7. | Fenótipo de leucócitos periféricos antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano, valores relativos e absolutos..... | 28 |
| Tabela 8. | Avaliação da atividade fagocítica das populações de polimorfonucleares e mononucleares (porcentagem média de células fagocitando), antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano..... | 31 |
| Tabela 9. | Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular, antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano..... | 34 |
| Tabela 10. | Determinação da produção de intermediários reativos do oxigênio (H ₂ O ₂) e do nitrogênio (NO)..... | 36 |
| Tabela 11. | Concentração de proteína C reativa sérica de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano..... | 37 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Contagem absoluta de leucócitos totais de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9)..... | 27 |
| Figura 2. Contagem absoluta de linfócitos T citotóxicos (CD5+CD8+) de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9). * Diferença significativa do tratamento BG-E, comparando-se com as avaliações anteriores (p<0,05)..... | 30 |
| Figura 3. Avaliação da atividade fagocítica de células polimorfonucleares de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9)..... | 32 |
| Figura 4. Avaliação da atividade fagocítica de células mononucleares de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9)..... | 32 |
| Figura 5. Dosagem de proteína C-reativa sérica de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9)..... | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|---|
| BG | <i>Beta-glucano</i> |
| BG-C | <i>Grupo beta-glucano em cápsulas</i> |
| BG-E | <i>Grupo beta-glucano extrusado</i> |
| CRP | <i>Proteína C-reativa</i> |
| CT | <i>Grupo controle</i> |
| EDTA | <i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i> |
| FEDIAF | <i>Federação europeia das indústrias de alimentos para animais de companhia (Fédération européenne de l'industriedes aliments pour animaux familiers)</i> |
| FITC | <i>Isotiocianato de fluoresceína</i> |
| H₂O₂ | <i>Peróxido de hidrogênio</i> |
| IL | <i>Interleucina</i> |
| LPS | <i>Lipopolissacarídeo bacteriano</i> |
| NRC | <i>National Research Council</i> |
| NO | <i>Óxido nítrico</i> |
| PBMC | <i>Células mononucleares do sangue periférico (Peripheral blood mononuclear cells).</i> |
| PE | <i>Ficoeritrina (Phycoerythrin)</i> |
| RPM | <i>Rotações por minuto</i> |
| TMB | <i>Tetramethylbenzidine</i> |
| TNF-α | <i>Fator de necrose tumoral alfa</i> |

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre a influência de nutrientes e nutracêuticos sobre a imunidade têm ganhado destaque recentemente. Procura-se entender como a dieta pode influenciar os mecanismos de defesa do organismo. Esta ação é exercida por vários nutrientes essenciais. Proteínas e aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas E, A e hidrossolúveis e alguns minerais já foram demonstrados como intrinsecamente relacionados à função imune.

Além dos nutrientes essenciais, outro grupo de substâncias pode atuar sobre a imunidade. Os nutracêuticos não são nutrientes essenciais, mas a ingestão deles pode levar à melhora de algumas funções no organismo, sendo alguns usados como imunomoduladores. Essas substâncias podem agir tanto sobre a imunidade celular como humoral, aumentando o número de células imunes, melhorando sua função e elevando a produção de anticorpos, dentre outros mecanismos.

Derivados da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm sido reconhecidos como detentores de algumas dessas propriedades, especialmente a fração beta-glucano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A parede celular de leveduras, como a *S. cerevisiae*, é constituída de mananoproteínas, beta-1,3 e beta-1,6-glucano e quitina (LIPKE; OVALLE, 1998). Enquanto os beta-glucanos e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem sua forma, as mananoproteínas e sua porção de carboidrato (alfa-d-manano) são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio e determinam a especificidade antigênica da levedura (RUIZ-HERRERA, 1992). Ambos os tipos de polissacarídeos constituintes principais da parede celular, beta-glucanos e alfa-mananos, têm sido reconhecidos como capazes de modular o sistema imune por meio de interações específicas com várias células imunocompetentes (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Os beta-glucanos possuem várias propriedades imunomodulatórias.

Eles agem estimulando o sistema imune, principalmente os macrófagos, exercendo efeito benéfico contra uma variedade de bactérias, vírus, fungos e parasitas (HUNTER; GAULT; BERNER, 2002; MANTOVANI et al., 2008). Seu efeito

imunoestimulante está relacionado à interação com receptores específicos presentes em células do sistema imune. Alguns receptores estão implicados no reconhecimento destas substâncias, entre eles o dectina-1 e o receptor de complemento 3 (CR3). O receptor dectina-1 reconhece variedade de glucanos de fungos e plantas com ligações beta-1,3 e beta-1,6. Este receptor não reconhece monossacarídeos ou carboidratos com ligações diferentes. Ele possui dois sítios de ligação, um reconhece ligantes endógenos de células T e o outro, carboidratos exógenos. Tais receptores estão também relacionados ao reconhecimento e fagocitose de *S. cerevisiae* íntegro (BROWN; GORDON, 2001).

O receptor dectina-1 é o principal receptor implicado na ligação de glucanos em camundongos, sendo expresso principalmente por células de origem mielóide, incluindo macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Seus sinais contribuem para a resposta destas células, incluindo fagocitose, *burst* oxidativo, degranulação de neutrófilos, destruição de fungos e a produção de mediadores lipídicos da inflamação, citocinas e quimiocinas, que recrutam e coordenam a ativação de outras células imunes (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009).

O receptor CR3 tem também atuação em células do sistema imune. Pode promover a adesão de neutrófilos a células tumorais opsonizadas com complemento e induzir à citotoxicidade dos neutrófilos (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009). Em leucócitos humanos ele é reconhecido como o principal receptor para as partículas de levedura (VAN BRUGGEN et al., 2009).

Os trabalhos que descrevem a resposta imune a glucanos podem ser, de certa forma, confusos, pois o que é observado para uma preparação de glucanos é inapropriadamente extrapolado para todas as outras formas. Quando se discute as funções imunomoduladoras de glucanos, comumente se considera o beta-1,3-glucano purificado da parede celular de fungos (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009).

Portanto, é imprescindível se observar a forma do beta-glucano empregado no estudo, pois é ela que determina seus efeitos. Preparações particuladas de beta-glucano derivadas da levedura *S. cerevisiae* são usadas com objetivo de imunomodulação (HUNTER; GAULT; BERNER, 2002). Por outro lado, as formas solúveis, principalmente o beta-1,4-glucano obtido a partir de vegetais como a aveia, tem efeitos diferentes dos provenientes de fungos. Descreve-se que essas formas

podem ter efeitos na redução do colesterol sanguíneo e da glicemia (KIM et al., 2006), sendo também considerados fatores anti-nutricionais por interferirem negativamente na digestibilidade e desempenho dos animais, sem, contudo, apresentarem nenhum efeito no sistema imune (TWOMEY et al., 2003). Desta forma, na presente revisão serão apenas abordados estudos e apresentados dados sobre os efeitos de 1,3 e 1,6 beta-glucano.

Muitos estudos têm abordado o uso de beta-glucano sobre a imunidade de seres humanos, animais de laboratório, animais de produção e, mais recentemente, cães. Em frangos de corte, após 42 dias de suplementação com 400 g de beta-glucano por tonelada de ração, obtido de uma fonte derivada de leveduras *S. cerevisiae*, com mais de 40% de pureza, houve aumento nas contagens de células CD8 e a expressão de TCR-1, tendo os autores concluído que a suplementação foi benéfica nesta espécie (CHAE et al., 2006). Camundongos que receberam beta-1,3-glucano na dose de 80 mg/kg apresentaram melhora na resposta proliferativa das células esplênicas a mitógenos de células B e células T, quando comparados ao grupo controle (SUZUKI et al., 1989). Também foi encontrado em camundongos estimulação de linfócitos T citotóxicos, células B e macrófagos, após suplementação oral com este composto (CROSS et al., 2001). Ainda em camundongos, investigou-se a atividade estimuladora de glucanos de levedura com relação à resposta a vacinação anti-rábica experimental. O que se encontrou foi um aumento da resistência à infecção e aumento da resposta imune, com maiores títulos de anticorpos. A melhor resposta deu-se com uma dose de 0,5 mg de 1,3-beta-glucano por camundongo, a cada três dias, por via intraperitoneal (TINO et al., 1993).

O beta-glucano também pode estimular a secreção de citocinas pelas células do sistema imunológico. Em revisão de estudos em seres humanos e animais de laboratório, Kim et al. (2006) encontraram estudos que demonstraram maior secreção de TNF- α e IL-1- β após suplementação injetável das formas beta-1,3 e/ou 1,6-glucano, o que promoveu secreção de anion superóxido e de peróxido de hidrogênio por neutrófilos e macrófagos e aumento da atividade das células *natural killer*, que contribuem para os efeitos germicidas e anti-carcinogênicos do composto.

Berner et al. (2005) estudaram, *in vitro*, a influência do beta-1,3-glucano microparticulado sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos

peritoneais de camundongos, demonstrando boa capacidade de fagocitose do glucano pelos macrófagos, que foram estimulados a secretar citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1.

Todas essas formas de estimulação da imunidade são mecanismos que podem auxiliar na resistência a infecções, conforme já demonstrado com infecções experimentais. Essas ações foram demonstradas contra leishmaniose visceral em hamsters. A administração intravenosa de glucano, antes ou depois da infecção por *Leishmania donovani* suprimiu significativamente a proliferação de formas amastigotas do parasita no baço e no fígado. Macrófagos peritoneais glucano-ativados *in vitro*, também reduziram a multiplicação intracelular do parasita (COOK; HOLLBROOK; DOUGHERTY, 1982).

Estudos em roedores demonstraram efeito positivo da aplicação de lentinan (constituído por beta-1,3-glucano obtido de cogumelos) em animais de laboratório infectados experimentalmente por *Listeria monocytogenes*. Após o tratamento, os macrófagos da medula óssea aumentaram a produção de óxido nítrico (NO) e a atividade citotóxica contra *L. monocytogenes* (KUPFAHL; GEGINAT; HOF, 2006). Em leitões recém-desmamados, a suplementação da dieta com beta-glucano de levedura (500 gramas por tonelada de ração) foi efetiva no aumento da resistência à infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica. Estes animais tiveram redução da excreção fecal desta bactéria e diminuição significativa da diarreia (STUYVEN et al., 2009).

Recentemente, três trabalhos avaliaram os efeitos da administração oral de beta-1,3/1,6-glucano sobre a imunidade de cães. Haladová et al. (2009) estudaram o efeito de beta-glucano derivado de cogumelo sobre parâmetros imunológicos específicos e não-específicos na espécie canina. Com o uso de solução concentrada deste suplemento, fornecida por via oral (2 mL para cada 5 kg de peso corporal – os autores não especificam a concentração do produto e nem o peso dos animais), a cães filhotes de várias raças. Os autores observaram aumento de parâmetros imunológicos avaliados, tais como atividade funcional de fagócitos e linfócitos. Também notaram aumento no título de anticorpos contra o vírus da raiva, após vacinação. Stuyven et al. (2010) avaliaram o uso de beta-glucano obtido de *S. 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. No primeiro estudo de inclusão de beta-glucano de levedura em alimento extrusado para cães, efeitos sobre a imunidade também foram notados. Observou-se que animais que receberam esta substância incorporada à dieta, na dose de 150 gramas por tonelada, tiveram aumento nas subpopulações linfocitárias de células T totais (CD5⁺), T helper (CD5⁺CD4⁺), T citotóxicos (CD5⁺CD8⁺) e linfócitos B (CD45⁺CD21⁺), aumento na resposta de hipersensibilidade tardia a inoculação de vacina polivalente e aumento na produção da citocina TNF- α em sobrenadante de cultura celular de mononucleares de sangue periférico (ZAINE, 2010).

Os benefícios da ingestão de beta-glucanos podem ser importantes em situações de estresse e imunossupressão, tais como em infecções, processos alérgicos e procedimentos cirúrgicos. Diversos trabalhos já relataram que a cirurgia e a ação de fármacos anestésicos levam a redução da resposta imune dos animais (SHEERAN; HALL, 1997; KELBEL; WEISS, 2001; SCHNEEMILCH; SCHILLING; BANK, 2004).

Reconhece-se, hoje, que o estresse cirúrgico é seguido por profundas alterações metabólicas e endócrinas, que já foram demonstradas como capazes de influenciar a resposta de defesa do organismo (OGAWA et al., 2000). Este provavelmente afeta diretamente o sistema imune ou o faz pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e o sistema nervoso simpático (WEISSMAN, 1980). Vários tipos de estresse, incluindo dor e cirurgia, podem induzir alterações na função imune *in vivo*, resultando em aumento da suscetibilidade a infecções e na progressão de tumores. Esses mecanismos que desregulam a função imune podem predispor os pacientes a infecções prolongadas, conseqüentemente o quadro pode evoluir para choque séptico e falência múltipla dos órgãos, com alta taxa de mortalidade (KELBEL; WEISS, 2001).

Os fármacos mais comumente usados em anestesia na medicina veterinária são drogas que alteram a função imune. A atividade imunossupressiva dos opióides já foi demonstrada desde o início do século XIX. Alguns opióides (morfina, fentanil) são mais imunossupressivos que outros (hidromorfona, tramadol, hidrocodona) (ODUNAYO et al., 2010). Os mecanismos precisos dessa ação não são bem identificados, mas assume-se que há estimulação do eixo HHA que leva à liberação de glicocorticóides e, então, imunossupressão.

A morfina pode inibir a proliferação e diferenciação de células progenitoras de macrófagos, a fagocitose de monócitos e macrófagos e a produção de IL-10 e IL-12 destas mesmas células. Além disso, a morfina inibe a atividade das células NK e as funções dos linfócitos T e B. Já o tramadol é considerado opióide com poucos efeitos imunossupressivos (KUROSAWA; KATO, 2008). A combinação de tiletamina e zolazepam, muito utilizada em medicina veterinária, acelera a peroxidação lipídica e desregula a defesa enzimática antioxidante no plasma sanguíneo, em estudo com ovelhas (CEYLAN; AYDILEK; IPEK, 2007).

Em pacientes imunossuprimidos a sepse decorrente de cirurgia pode ser problema importante. Foi demonstrado que a utilização de uma infusão intravenosa de beta-glucano de levedura (0,5mg/kg de peso corporal) pode ser benéfica para casos de pacientes em sepse, com alto risco de morte, como verificado em seres humanos com alto risco de desenvolverem tais complicações pós-operatórias infecciosas (BABINEAU et al., 1994). Estudo anterior também já havia demonstrado que a administração de beta-glucano foi capaz de prevenir infecções em pacientes com traumas múltiplos severos (FELIPPE JUNIOR et al., 1993).

Apesar destes efeitos positivos da ingestão de beta-glucano, poucos trabalhos abordaram mais claramente como estes são exercidos na espécie canina. Esta substância se mostra promissora como ferramenta alimentar para imunomodulação em cães, podendo ser benéfica à saúde do animal pela possibilidade de melhorar sua resistência a doenças e auxiliar no controle da imunossupressão causada pelo procedimento cirúrgico e anestesia. Em relação ao beta-glucano derivado de *S. cerevisiae*, este se destaca em importância no Brasil por ser co-produto do mercado sucro-alcooleiro. Sua produção e purificação em escala comercial é hoje tecnologia na qual nosso país se destaca no cenário mundial.

A castração é hoje procedimento rotineiro adotado pela maioria dos proprietários de fêmeas da espécie canina. Esta intervenção pode proporcionar modelo para estudos de nutracêuticos em situações reais, sem a necessidade de se recorrer à indução de estresse ou sofrimento desnecessário aos animais. Testar a imunossupressão induzida por este tipo de cirurgia pode ser útil tanto para se criar modelo de estudo da ação de nutracêuticos sobre a imunidade, como para o próprio

entendimento das implicações da anestesia e cirurgia sobre o status imune das cadelas.

Desta forma, é hipótese da presente pesquisa que o procedimento cirúrgico e a anestesia durante a castração induzem nas cadelas redução de sua resposta imune. Esta redução, ou imunossupressão, pode ser medida e torna-se modelo natural de estudo de intervenções nutricionais com vistas à imunomodulação de cães. Nas condições da castração de cadelas, o consumo anterior e no pós-operatório de beta-1,3/1,6-glucano derivado da parede celular de *S. cerevisiae* aumenta a imunidade ou reduz os efeitos imunodepressores, melhorando com isto a saúde dos animais.

3. OBJETIVOS

A presente Tese teve por objetivo avaliar *ex vivo* e *in vivo* a ação do beta-1,3/1,6-glucano derivado de levedura sobre a imunidade de cães adultos. No estudo *ex vivo*, foi avaliada a capacidade do composto estimular as células imunes de cães a produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O estudo *in vivo* avaliou o efeito do consumo de beta-glucano sobre parâmetros imunes de cadelas submetidas a cirurgias de ovário-histerectomia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento 1 - Efeitos *ex vivo* do beta-glucano sobre leucócitos de cães

Foi realizado ensaio preliminar para avaliação *ex vivo* do efeito de beta-1,3/1,6-glucano de *S. cerevisiae*. Para isto, os efeitos da substância foram avaliados em cultura de leucócitos de cães. Para o teste foram obtidos 24 mL de sangue periférico de cinco cães Beagle adultos, coletados em tubos de ensaio estéreis contendo heparina (Hepamax-S®, Blausiegel, Cotia, SP, Brasil). Os cães doadores de sangue eram alimentados com ração extrusada balanceada para cães adultos e que não continha beta-glucano, levedura ou seus derivados em sua composição.

As amostras obtidas foram submetidas à separação celular para obtenção dos halos relativos às populações de neutrófilos e monócitos. Em tubos cônicos de 15 mL foram colocados 4,5 mL de Histopaque® 1119 e 3 mL de Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA), e 6 mL de sangue total. Os tubos foram centrifugados à 700 x G, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi possível a observação de dois halos de células. Os anéis ricos em células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares foram coletados separadamente e lavados por pelo menos duas vezes com meio de cultura RPMI simples à 4°C (400 x G por 10 minutos) e, quando necessário, foi realizada a lise das hemácias com 2 mL de solução de ACK (cloreto de amônio, 0,15M; bicarbonato de potássio 10mM; EDTA 0,1mM) por 2 minutos. Ao final da lavagem o *pellet* foi desmanchado e as células ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 40 mg/mL de gentamicina e 10% de soro heterólogo inativado (Fetal Bovine Serum, Life Technologies, Carlsbad, EUA). A contagem, identificação e viabilidade dos neutrófilos e das células mononucleares do sangue periférico (PMBC) foi realizada através da coloração em azul tripan 0,2% (alíquotas de 50 µL da suspensão celular foram diluídas em 450 µL de corante) e contagem em câmara de Neubauer.

Um total de 2×10^5 células foi incubado por poço, sendo incubados 10 poços com polimorfonucleares e outros 10 poços com mononucleares para cada cão. Para cada tipo celular, dois poços foram empregados como controle negativo, sendo as

células incubadas somente com meio completo de cultura celular (MCCC), constituído do meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 40 mg/mL de gentamicina e 10% de soro heterólogo inativado (Fetal Bovine Serum, Life Technologies, Carlsbad, EUA). Outros dois poços foram empregados como controles positivo, quando as células foram incubadas em presença de 20 µg de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; *E. coli* Lipopolysaccharide L2654, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os tratamentos consistiram em concentrações crescentes de uma fonte solúvel de beta-1,3/1,6-glucano (Macrogard, Biorigin, Lençóis Paulista, Brasil), correspondente a 2, 16 e 64 µg do produto por poço, sendo estas doses adaptadas de trabalhos semelhantes encontrados na literatura (XU et al., 2011; CHANPUT et al., 2012). Para alcançar estas concentrações, uma amostra do produto foi pesada e diluída em RPMI-1640 de forma que atingisse a maior concentração. As outras concentrações foram obtidas após diluições seriadas. Antes do uso na cultura, as soluções foram submetidas à autoclavagem (120°C, 1 atm, 30 min).

Após a adição dos estímulos as placas foram incubadas por 18 horas à 37°C com 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific Revco, Mod. RCO3000T-9-ABC, Waltham, MA, EUA). Após incubação, foi realizada dosagem de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas respectivas placas.

A produção de H₂O₂ no sobrenadante da cultura celular, foi quantificada segundo método descrito por Pick e Keisari (1980) e adaptado por Pick e Mizel (1981). Após as 18 horas de incubação, adicionou-se 100 µL de solução tampão em cada poço. A solução tampão foi constituída de 7,8 mL de água destilada, 0,8 ml de solução A (800 mL de água destilada; 80 g de NaCl; 2,0 g de KCl; 2,0 g de KH₂PO₄; 11,5 g de Na₂HPO₄), 0,1ml de solução B (100 mL de água destilada; 1,0 g CaCl₂), 0,1 mL de solução C (100mL de água destilada; 1,0 g MgCl₂), 0,1 mL de vermelho fenol (100mL de água destilada; 1,0 g de vermelho fenol), 0,1 mL de peroxidase (10 mg de peroxidase; 2,0 mL de tampão fosfato) e 1,0 mL de glicose (100 mL de água destilada, 1,0 g de glicose). Todas as soluções estavam à temperatura ambiente no momento do ensaio. À cada poço foi acrescentado 1µL de forbol mirestato acetato (PMA) e a placa incubada por 1 hora, à 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 1 hora a reação foi bloqueada com 10 µL de NaOH 1N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (iMark Microplate Absorbance Reader 168-1135, Bio-rad, Hercules, California, EUA)

com filtro de 630 nm. Os resultados foram expressos em nanomols (nM) de $\text{H}_2\text{O}_2/5 \times 10^5$ células, à partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída por concentrações molares conhecidas de H_2O_2 variando de 0,5 a 16,0 nM.

A produção de NO^-2 foi dosada pelo método colorimétrico baseado na reação de GRIESS (GUEVARA et al., 1998). Aos sobrenadantes foi adicionado 100 μL de reagente de GRIESS, que continha n-(1-naftil)-etil-enediamina (NEED - Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) diluído a 0,1% em água destilada, e sulfanilamida (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) diluída a 1% em H_2PO_4 5%. Os reagentes NEED e sulfanilamida foram misturados em volumes iguais no momento da reação. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (iMark Microplate Absorbance Reader 168-1135, Bio-rad, Hercules, California, EUA) à 550 nm. Os resultados foram expressos em μM de NO por 5×10^5 células, por 36 horas de incubação, comparando-se a densidade óptica com uma curva padrão de concentrações conhecidas de NO_2^- , variando de 0,78 a 100 μM .

Os resultados obtidos foram analisados pelo procedimento GLM do *software* SAS (v. 9.0, SAS Institute, Cary, NC, EUA). As médias dos grupos foram submetidas à análise de regressão polinomial para determinar os efeitos lineares ou quadráticos da adição de beta-glucano à cultura celular, adotando-se a probabilidade de 5% adotada como significativa. Também foi a análise por contrastes ortogonais para se avaliar a diferença entre as concentrações de beta-glucano e o controle positivo (LPS).

4.2 Experimento 2 - Avaliação dos efeitos imunológicos de beta-1,3/1,6-glucano em cadelas submetidas a ovário-histerectomia

4.2.1 Delineamento experimental

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos, sendo:

- Grupo controle (CT) - não recebeu beta-glucano, alimentadas com ração extrusada sem beta-glucano;
- Grupo beta-glucano extrusado (BG-E) - alimentadas com ração extrusada contendo 0,1% da fonte de beta-glucano em sua composição;

- Grupo beta-glucano em cápsulas (BG-C) – alimentadas com ração extrusada sem beta-glucano, mas receberam diariamente na hora da refeição cápsula de gelatina contendo o ingrediente beta-glucano em quantidade equivalente a 0,1% da quantidade consumida de alimento.

Quatro avaliações do sistema imune foram realizadas em cada uma das cadelas:

- 14 dias antes da cirurgia (dia -14);
- Pré-operatório imediato (período de preparação do animal, imediatamente antes da medicação pré-anestésica – de 20 a 40 minutos antes da cirurgia);
- Pós-operatório imediato (imediatamente após o término do procedimento cirúrgico – de 5 a 15 minutos após a sutura de pele);
- 14 dias após a cirurgia (dia +14).

4.2.2 Seleção dos Animais

Foram recrutados animais das campanhas de castração realizadas pela parceria entre a FCAV/Unesp e a Associação Protetora dos Animais (APA) de Jaboticabal-SP. Foram contatados por telefone 92 proprietários. Devido a fatores como idade inferior a um ano, infestação por carrapatos, baixo peso corporal (inferior a 7 kg, impossibilitando coletar volumes adequados de sangue), estro, consumo de dieta caseira ou por discordância do proprietário quanto ao protocolo experimental, a maioria não pôde ser incluída no estudo. Assim, 43 cadelas foram submetidas aos exames de triagem para serem incluídas no experimento. No entanto, seis foram descartadas por apresentarem alterações aos exames físicos e/ou laboratoriais. Com isto, 37 fêmeas foram incluídas no estudo.

Ao longo do experimento nove proprietários não conseguiram conduzir adequadamente o protocolo de estudo, seus animais tiveram que ser desligados por não ingerirem adequadamente a ração experimental ou por terem sido alimentados com outros tipos de alimento durante o período. Dessa forma, finalizaram o experimento 10 cadelas no grupo controle, nove no grupo que recebeu o beta-glucano em cápsulas (BG-C) e nove no grupo que recebeu o beta-glucano incorporado à ração

extrusada (BG-E). A lista dos animais que participaram do experimento está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Animais selecionados para utilização durante o experimento.

| Identificação | Grupo¹ | Raça | Peso (kg) | ECC² | Idade (anos) |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|------------------------|---------------------|
| E4 | BG-C | SRD | 17,8 | 4 | 1 |
| E6 | BG-C | SRD | 12,1 | 4 | 1 |
| E10 | BG-C | SRD | 12,3 | 5 | 1 |
| E13 | BG-C | SRD | 16,2 | 5 | 1 |
| E14 | BG-C | SRD | 10,7 | 3 | 3 |
| E19 | BG-C | Teckel | 7,2 | 5 | 2 |
| E28 | BG-C | Pitbull | 30 | 5 | 3 |
| E35 | BG-C | SRD | 8,4 | 5 | 4 |
| E37 | BG-C | Poodle | 7,8 | 6 | 5 |
| E1 | BG-E | SRD | 12,4 | 4 | 1 |
| E9 | BG-E | SRD | 8,8 | 5 | 2 |
| E12 | BG-E | SRD | 17 | 4 | 3 |
| E16 | BG-E | Teckel | 7 | 3 | 4 |
| E21 | BG-E | Australian Cattle Dog | 18,9 | 5 | 1 |
| E24 | BG-E | Australian Cattle Dog | 18,1 | 5 | 2 |
| E25 | BG-E | SRD | 19,9 | 5 | 4 |
| E26 | BG-E | Labrador Retriever | 24,5 | 4 | 1 |
| E27 | BG-E | Labrador Retriever | 27,1 | 4 | 1 |
| E2 | CT | SRD | 8,9 | 5 | 1 |
| E3 | CT | Teckel | 8,7 | 5 | 1 |
| E5 | CT | SRD | 16,8 | 3 | 3 |
| E11 | CT | SRD | 11,3 | 5 | 1 |
| E15 | CT | SRD | 11,1 | 5 | 6 |
| E17 | CT | Teckel | 8,2 | 6 | 4 |
| E20 | CT | SRD | 7,9 | 4 | 3 |
| E29 | CT | SRD | 10,8 | 4 | 3 |
| E33 | CT | SRD | 11,2 | 5 | 2 |
| E34 | CT | SRD | 10,5 | 5 | 2 |

¹ – CT: grupo controle; BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração; BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas.

² – Escore de condição corporal (LAFLAMME, 2007).

4.2.3 Dietas experimentais

Foi formulado um alimento para manutenção de cães adultos, segundo as recomendações do FEDIAF (2013). Esta formulação foi desdobrada em dois tratamentos, um sem beta-glucano (controle) e outro com beta-glucano. Amido de milho foi empregado para fechar a formulação sem beta-glucano (Tabela 2). A fonte de beta-glucano utilizada foi obtida da parede celular da levedura *S. cerevisiae*, por um processo de purificação que obtém produto com pelo menos 60% de pureza (Macrogard®, Biorigin, Lençóis Paulista, Brasil).

As rações foram produzidas na fábrica de rações da FCAV – UNESP, campus de Jaboticabal. Após a pesagem e mistura dos ingredientes, estes foram moídos em moinho de martelos (Model 4, D'Andrea, Limeira, Brasil) em peneira com furos de 0,8mm. As rações foram então extrusadas em extrusora de rosca simples (Mab 400S, Extrucenter, Monte Alto, Brazil), com capacidade de processamento de 150 quilogramas de ração/hora. O processo de produção foi controlado com ajustes na densidade (g/L) dos *kibbles* a cada 20 minutos. O pré-condicionador foi mantido à temperatura de 90°C. Água, vapor, velocidade da rosca e o fluxo de ração foram ajustados de acordo com a dieta. A temperatura no interior do canhão da extrusora foi mantida entre 120°C e 135°C. A fórmula das dietas experimentais encontra-se na Tabela 2 e a composição química analisada das rações se na Tabela 3.

Tabela 2. Fórmula das dietas experimentais.

| Ingrediente | Quantidade (%) |
|--|-----------------------|
| Farinha de vísceras de frango | 35,0 |
| Quirera de arroz | 30,0 |
| Milho | 22,8 |
| Óleo vísceras frango | 6,6 |
| Polpa de beterraba | 2,0 |
| Palatabilizante líquido | 2,0 |
| Sal | 0,3 |
| Cloreto de potássio | 0,4 |
| Antifúngico ¹ | 0,1 |
| Premix vitamínico-mineral ² | 0,55 |
| Antioxidante ³ | 0,04 |
| Ingrediente beta-glucano ⁴ | 0 – 0,1 |
| Amido de milho | 0 – 0,1 |

¹ Mold Zap Aquativa, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda, Araucária, PR: propionato de amônio, propanodiol, ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido fórmico, sorbato de potássio, veículo q.s.p;

² Adição por quilograma de produto: Ferro 100 mg, Cobre 10 mg, Manganês 10 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Selênio 0,3 mg, Vitamina A 18000 UI, Vit. D 1200 UI, Vit. E 200 UI, Tiamina 6 mg, Riboflavina 10 mg, Ácido pantotênico 40 mg, Niacina 60 mg, Piridoxina 6 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,1 mg e Colina 2500 mg.

³ Banox, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda, Araucária, PR: BHA, BHT, galato de propila e carbonato de cálcio.

⁴ Macrogard, Biorigin S/A, Lençóis Paulistas, SP (Lote Q112026, purificado com 68,8% de beta-1,3/1,6-glucano. Informado pelo fabricante).

Tabela 3. Composição química analisada das dietas experimentais¹. Valores sobre a matéria original.

| Item | Dieta experimental | |
|---|--------------------|-------------------|
| | Controle | Beta-glucano |
| Matéria seca (%) | 94,0 | 94,6 |
| Matéria Mineral (%) | 7,0 | 7,5 |
| Proteína bruta (%) | 28,1 | 28,7 |
| Extrato etéreo ácido (%) | 13,2 | 13,6 |
| Fibra bruta (%) | 3,4 | 3,5 |
| Energia Metabolizável (kcal/g) ² | 3,77 | 3,78 |
| Beta-1,3/1,6-glucano (%) ³ | 0,0 | 0,07 ³ |

¹ - n=2; CV < 5%

² - Estimada segundo NRC (2006).

³ - Com base em laudo de análise do produto empregado (Macrogard, Biorigin S/A, Lençóis Paulistas, SP).

4.2.4 Manejo dos animais

Os animais foram mantidos em suas residências, sendo manejados e alimentados pelos proprietários. Após entrevista e aquiescência do proprietário em participar do estudo, este foi convidado a assinar termo de consentimento. Na sequência, as cadelas foram submetidas a exame físico e laboratorial (hemograma). Após comprovado o bom estado de saúde, foi marcada a cirurgia de castração. Os proprietários receberam, então, a respectiva ração experimental e foram orientados a alimentar seus animais com a ração (ou a ração mais a cápsula para o grupo BG-C) por um período de 28 dias, iniciando-se 14 dias antes da cirurgia e terminando 14 dias após o procedimento de castração. A quantidade de alimento fornecida foi calculada de acordo com a recomendação de energia metabolizável para manutenção (95 kcal/kg^{0,75}) e a energia metabolizável da ração, estimada a partir de sua composição química analisada (NRC, 2006). Esta quantidade total diária foi dividida em duas refeições. Os proprietários receberam um pote-medida com a quantidade indicada de alimento a ser fornecido. No tratamento BG-C, cápsulas de gelatina foram aviadas em farmácia de manipulação contento a quantidade exata do produto a ser fornecida por dia. As cadelas foram pesadas a cada duas semanas e, se necessário, a quantidade

de alimento foi reajustada de forma que elas mantivessem o peso corporal constante.

4.2.5 Procedimento cirúrgico

As cirurgias de ovário-histerectomia foram realizadas no Centro de Esterilizações da Associação Protetora dos Animais (CEAPA), localizado no Setor de Cunicultura, do departamento de Zootecnia, da FCAV/Unesp. As cadelas foram mantidas em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 4 horas. Receberam medicação pré-anestésica com morfina 0,5 mg/kg e acepromazina 0,05 mg/kg por via intramuscular e a anestesia foi feita com Zoletil (Tiletamina + Zolazepam, Virbac, São Paulo, SP) 5 a 10 mg/kg pela mesma via de aplicação e, então, foi realizada a ovário-histerectomia. No pós-operatório imediato, os animais receberam, por via intramuscular, penicilina 40.000 UI/kg e dipirona 25 mg/kg. Após 48 horas, começaram a receber cefalexina (25 mg/kg a cada 12 horas) por 7 dias, e, se apresentassem sinais de dor, dipirona (25 mg/kg), ambas por via oral. Os proprietários foram orientados a fazer antisepsia diária da ferida cirúrgica com digluconato de clorexidina (10 mg/mL). A retirada dos pontos da sutura foi feita após 7 a 10 dias.

4.2.6 Coletas de sangue

Em cada uma das avaliações, 30 mL de sangue foram retirados por venipunção direta da veia jugular. Imediatamente após a coleta, o sangue foi aliquotado da seguinte maneira: 25 mL colocados em tubos contendo heparina (24 mL para a separação celular + 1 mL para o ensaio de fagocitose); 1 mL armazenado em tubo contendo o anticoagulante EDTA (para avaliação hematológica e imunofenotipagem dos leucócitos) e outros 4 mL mantidos em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro (para dosagem de proteína C-reativa, sendo este obtido após centrifugação à 1800 RPM, por 10 minutos). Na quase totalidade das vezes (exceto no dia da cirurgia) as coletas foram realizadas na residência dos proprietários e as amostras sanguíneas mantidas em isopor contendo gelo até posterior processamento. O tempo entre a coleta e o processamento das amostras foi de duas a quatro horas. Todos os testes propostos foram realizados nos quatro períodos de coleta, para todos os animais.

4.2.7 Avaliação hematológica

As coletas foram realizadas sempre no período da manhã, entre às 06h00 e 11h30. As alíquotas sanguíneas com EDTA foram submetidas às contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, a taxa de hemoglobina e o volume globular com auxílio de um contador veterinário automático de células ABC Vet (Horiba ABX Brasil, São Paulo). A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida utilizando-se de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de Metanol – May Grunwald – Giemsa. A fórmula leucocitária absoluta foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias, por uma regra de três direta.

Estes exames foram feitos no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – Unesp, campus de Jaboticabal.

4.2.8 Fenótipo dos leucócitos periféricos

Os efeitos do beta-glucano sobre as subpopulações leucocitárias foram avaliados por citometria de fluxo, quantificando-se os linfócitos T totais (CD5⁺), T auxiliares (CD5⁺CD4⁺), T citotóxicos (CD5⁺CD8⁺), linfócitos B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) no sangue periférico.

Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a coleta do sangue. Para tanto, as alíquotas do sangue periférico foram encaminhadas ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. À cada tubo foi adicionado 100 µL de sangue com EDTA. Então, adicionaram-se dois µL dos respectivos anticorpos (AbD Serotec, Raileigh, EUA), conforme esquema:

1. Só células: não se colocou anticorpo.
2. Isotipo controle: IgG1 PE + IgG2a FITC
3. CD5/CD4: CD5 FITC + CD4 PE.
4. CD5/CD8: CD5 FITC + CD8 PE.
5. CD21/CD14: CD21 PE + CD14 A647.

Após isto, os tubos foram incubados por 20 minutos à 4°C, protegidos da luz. Um mililitro de solução 1:10 do tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado a cada tubo, seguido da homogeneização e incubação por dez minutos à 4°C, protegidos da luz. Posteriormente, realizou-se a

lavagem do material com PBS (Tampão fosfato-salino; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) por três vezes, que consistiu na centrifugação à 500 x G por três minutos, desprezando-se o sobrenadante e adicionando-se dois mililitros de PBS.

Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 500 µL de PBS + 1% de formol à 40% nos cinco tubos e as amostras submetidas a análise no citofluorômetro (FACSCanto®, Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, EUA) para classificação e contagem das subpopulações linfocitárias. As porcentagens de células foram aplicadas às contagens de leucócitos do hemograma para obtenção dos valores absolutos. Os resultados foram expressos tanto como valores percentuais, quanto valores absolutos.

A relação CD4:CD8 também foi calculada, dividindo-se, individualmente, as contagens de CD5⁺CD4⁺ pelas de CD5⁺CD8⁺.

4.2.9 Avaliação da atividade fagocítica de leucócitos periféricos

O ensaio de fagocitose foi realizado com sangue heparinizado, através de kit comercial pHrodo *E. coli* BioParticles (cat. A10025, Molecular Probes, Inc., Oregon, EUA). O método baseia-se na mensuração da atividade fagocítica das células presentes no sangue total por meio da acidificação do corante pHrodo que, quando dentro do fagossomo, emite seu máximo de fluorescência devido ao pH ácido.

O protocolo de marcação consistiu na incubação de 100 µL das amostras de sangue heparinizado com 20 µL das biopartículas provenientes do kit (foi estabelecida uma relação partícula-fagócito de 20:1). Após homogeneização, os tubos foram, incubados à 37°C por 15 minutos, sendo posteriormente realizada a lise de hemácias e lavagens. Controles negativos foram realizados em amostras de sangue contendo a biopartícula, mas incubadas em gelo; ou em amostras que não foram incubadas com a biopartícula.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto®, Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, EUA) e os resultados são apresentados como a porcentagem de células positivas para cada marcação, dentro das populações de neutrófilos ou monócitos (as populações foram classificadas de

acordo com o volume celular e complexidade interna), indicando a proporção de células que realizaram a fagocitose da biopartícula.

4.2.10 Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular

Após a separação celular por diferença de gradientes e ajuste da suspensão celular para 2×10^6 células por mililitro, as PBMC foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços. As células foram submetidas ou não a estímulo com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$, *E. coli* Lipopolysaccharide L2654 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e Concanavalina A ($0,5 \mu\text{g/mL}$, Concanavalin A, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) incubadas em estufa por 72 horas a 37° , em tensão de 5% de CO_2 (Thermo Fisher Scientific Revco, Mod. RCO3000T-9-ABC, Waltham, MA, EUA). Após esse período foi realizada a centrifugação das placas e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -70°C até posterior análise.

As citocinas TNF- α (somente na cultura estimulada com LPS), IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ (somente na cultura estimulada com Concanavalina A) foram dosadas através de kits de ELISA DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, EUA), desenvolvidos para a quantificação de citocinas em sobrenadantes de culturas celulares, específicos para a espécie canina.

4.2.11 Concentração de intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO)

Estas análises foram realizadas apenas para as células polimorfonucleares (neutrófilos), sendo o protocolo de obtenção das células e dosagem conforme descrito no item 4.1. Algumas adaptações foram realizadas, sendo que o número de células polimorfonucleares utilizadas foi maior (5×10^5 células por poço) e também foi aumentado o tempo de incubação (36 horas). Os protocolos de dosagem se mantiveram inalterados.

4.2.12 Concentração de proteína C-reativa sérica

As amostras de sangue, coletadas sem anticoagulante, foram submetidas a centrifugação para separação do soro (conforme descrito anteriormente) e armazenadas à -20°C até posterior análise. Nestas amostras foi quantificada a

proteína C-reativa por um kit comercial de imunoenensaio (Cod. EIA-4694, CRP (canine) ELISA, DRG International, Inc., EUA).

As amostras de soro foram previamente diluídas (1:500) e, então, transferidas em duplicata à placa de 96 poços, juntamente com quatro diluições da curva padrão. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com solução tampão (PBS + 0,05% de Tween 20, pH 7,4) e foi adicionado o anticorpo conjugado. Após mais 30 minutos de incubação, as placas foram lavadas da mesma forma e foi adicionada a solução de substrato (TMB) e, após 10 minutos, a reação foi parada pela adição de solução de ácido fosfórico. A leitura foi realizada com filtro de 450nm (iMark Microplate Absorbance Reader 168-1135, Bio-rad, Hercules, California, EUA) e a concentração sérica foi calculada à partir de uma equação logística de 4 parâmetros, considerando a concentração da amostra padrão. Os resultados foram expressos como $\mu\text{g/mL}$ de soro.

4.2.13 Análise estatística

Foi empregado delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições para o grupo controle e nove repetições para os outros dois tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade e homocedasticidade das variâncias. Análise de covariância (ANCOVA) de medidas repetidas foi empregada para avaliar os efeitos no tempo (pré-operatório, pós-operatório e +14) dentro de cada tratamento, sendo os valores da coleta basal (momento -14) usado como covariável. Quando foram encontradas diferenças significativa na avaliação de tempo ou tratamento na ANCOVA, utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias, adotando-se a probabilidade de 5% como significativa. As análises foram realizadas com auxílio do software SAS (v. 9.0, SAS Institute, Cary, NC, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Experimento 1 - Efeitos *ex vivo* do beta-glucano sobre leucócitos caninos

A produção de NO e de H₂O₂ em cultura celular foi aumentada pela adição de beta-glucano, para os dois tipos celulares estudados (Tabela 4). Foi verificado um aumento linear ($p < 0,05$) induzido pelo beta-glucano para a produção de NO (apenas neutrófilos) e de H₂O₂ (neutrófilos e monócitos). O contraste ortogonal mostrou que a comparação das doses de beta-glucano com o estímulo por LPS, foi significativamente diferente, sendo que os valores do controle positivo (LPS) ficaram acima dos outros valores.

Tabela 4. Concentração das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por neutrófilos e monócitos caninos, estimulados com beta-glucano.

| | NO ($\mu\text{M}/2 \times 10^5$ células) ¹ | | | | | | Contrastes (Valor de P) | | |
|-------------|---|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------|-------------------------|------------|--|
| | 20 μg LPS | Controle Negativo | 2 μg BG | 16 μg BG | 64 μg BG | BG x LPS | Linear | Quadrático | |
| Neutrófilos | 3,59 \pm 0,43 | 2,46 \pm 0,33 | 1,88 \pm 0,16 | 2,39 \pm 0,28 | 3,06 \pm 0,41 | 0,005 | 0,040 | 0,863 | |
| Monócitos | 3,61 \pm 0,45 | 2,32 \pm 0,20 | 1,94 \pm 0,20 | 2,90 \pm 0,25 | 2,73 \pm 0,41 | 0,004 | 0,168 | 0,101 | |
| | H ₂ O ₂ (nM/2 x 10 ⁵ células) ¹ | | | | | | Contrastes (Valor de P) | | |
| | 20 μg LPS | Controle Negativo | 2 μg BG | 16 μg BG | 64 μg BG | BG x LPS | Linear | Quadrático | |
| Neutrófilos | 4,56 \pm 0,15 | 1,59 \pm 0,18 | 1,99 \pm 0,21 | 2,69 \pm 0,24 | 3,11 \pm 0,35 | <0,001 | <0,001 | 0,034 | |
| Monócitos | 2,89 \pm 0,16 | 1,86 \pm 0,15 | 1,72 \pm 0,18 | 1,99 \pm 0,11 | 2,54 \pm 0,17 | <0,001 | 0,002 | 0,984 | |

¹ Valores médios \pm erro padrão da média, n=5 por tratamento. BG= beta-1,3/1,6-glucano. LPS= lipopolissacarídeo bacteriano – controle positivo. NO= óxido nítrico. H₂O₂ = peróxido de hidrogênio.

5.2 Experimento 2 - Avaliação do efeito de beta-1,3/1,6-glucano em cadelas submetidas a ovário-histerectomia

As dietas foram bem consumidas e os cães mantiveram o peso corporal, com os ajustes de quantidade de alimento sendo realizados individualmente. Os proprietários relataram que a produção de fezes foi normal, com fezes firmes, sem diarreia. Os animais também não apresentaram vômito. O peso médio dos grupos se manteve o mesmo do início ao fim do experimento (Tabela 5).

Todas as cadelas tiveram uma boa recuperação pós-cirúrgica, com cicatrização adequada da ferida cirúrgica, verificada na avaliação final, duas semanas após o procedimento.

Tabela 5. Peso corporal inicial e final das cadelas ao longo do experimento (média \pm erro padrão).

| Item | CT ¹ | BG-E | BG-C | Valor de P |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|
| <i>Peso (kg)</i> | | | | |
| Inicial | 10,75 \pm 0,90 | 15,73 \pm 2,42 | 15,19 \pm 2,28 | 0,15 |
| Final | 10,70 \pm 0,89 | 15,73 \pm 2,44 | 15,44 \pm 2,27 | 0,13 |
| Valor de P | 0,67 | 1,00 | 0,53 | |

¹ – CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

5.2.1 Avaliação hematológica

Os resultados das contagens de hemácias, leucócitos totais, eosinófilos, linfócitos e hematócrito estão apresentados na Tabela 6. Os dados referentes às contagens de basófilos, neutrófilos bastonetes, mielócitos, metamielócitos e monócitos não foram apresentados, pois seus valores se mantiveram dentro dos parâmetros de normalidade e não foram influenciados pelos tratamentos.

Para nenhum dos dados avaliados houve interação entre tratamento e momento de avaliação ($p > 0,05$). Observou-se uma queda significativa em todos os parâmetros analisados no momento pós-operatório, sendo que os valores retornaram

ao mesmo patamar da avaliação pré-operatória, à última avaliação, 14 dias após a cirurgia. Para a contagem de hemácias e eosinófilos, os valores médios do grupo BG-E foram significativamente maiores que os dos outros grupos avaliados. À contagem de leucócitos totais (Figura 1), ambos os grupos que receberam a suplementação de beta-glucano tiveram valores médios maiores que os encontrados no grupo controle. Os valores de normalidade adotados estão apresentados no Apêndice 1.

Tabela 6. Hemograma antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano.

| Item | Pré-operatório | Pós-operatório | Dia + 14 | Média | Valor de P |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|
| <i>Hemácias (x10⁶/μL)</i> | | | | | |
| CT ¹ | 7,35 | 5,44 | 7,09 | 6,63 ^A | - |
| BG-E | 7,60 | 5,87 | 7,42 | 6,96 ^B | - |
| BG-C | 7,14 | 5,27 | 6,81 | 6,41 ^A | - |
| Média | 7,36 ^a | 5,52 ^b | 7,11 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,008 | |
| CV (%) ² | | | | 9,33 | |
| <i>Hematócrito (%)</i> | | | | | |
| CT | 49,57 | 37,03 | 47,97 | 44,83 ^{AB} | - |
| BG-E | 50,78 | 39,48 | 50,14 | 46,87 ^A | - |
| BG-C | 47,48 | 35,37 | 46,49 | 43,10 ^B | - |
| Média | 49,27 ^a | 37,28 ^b | 48,25 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,006 | |
| CV (%) ² | | | | 8,93 | |
| <i>Leucócitos</i> | | | | | |
| CT | 10,41 | 6,56 | 9,82 | 8,92 ^B | - |
| BG-E | 11,69 | 7,96 | 11,94 | 10,67 ^A | - |
| BG-C | 12,30 | 7,47 | 11,97 | 10,55 ^A | - |
| Média | 11,44 ^a | 7,31 ^b | 11,39 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,034 | |
| CV (%) ² | | | | 25,93 | |
| <i>Eosinófilos (célx x10³/μL)</i> | | | | | |
| CT | 0,80 | 0,34 | 0,80 | 0,64 ^B | - |
| BG-E | 1,20 | 0,64 | 1,62 | 1,15 ^A | - |
| BG-C | 0,68 | 0,38 | 0,99 | 0,65 ^B | - |
| Média | 0,89 ^a | 0,45 ^b | 1,14 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,001 | |
| CV (%) ² | | | | 64,49 | |
| <i>Neutrófilos segmentados (célx x10³/μL)</i> | | | | | |
| CT | 6,73 | 5,04 | 6,34 | 6,04 ^A | - |
| BG-E | 7,01 | 5,01 | 6,81 | 6,28 ^A | - |
| BG-C | 7,96 | 4,59 | 7,60 | 6,72 ^A | - |
| Média | 7,23 ^a | 4,88 ^b | 6,92 ^a | | 0,002 |
| Valor de P | - | - | - | 0,616 | |
| CV (%) ² | | | | 38,83 | |
| <i>Linfócitos (célx x10³/μL)</i> | | | | | |
| CT | 3,18 | 1,69 | 3,37 | 2,75 ^A | - |
| BG-E | 2,92 | 1,83 | 3,22 | 2,72 ^A | - |
| BG-C | 2,64 | 1,91 | 3,05 | 2,53 ^A | - |
| Média | 2,91 ^a | 1,81 ^b | 3,29 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,754 | |
| CV (%) ² | | | | 42,65 | |

¹ – CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

² – CV: coeficiente de variação.

^{A,B} - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,05).

^{a,b} - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,05).

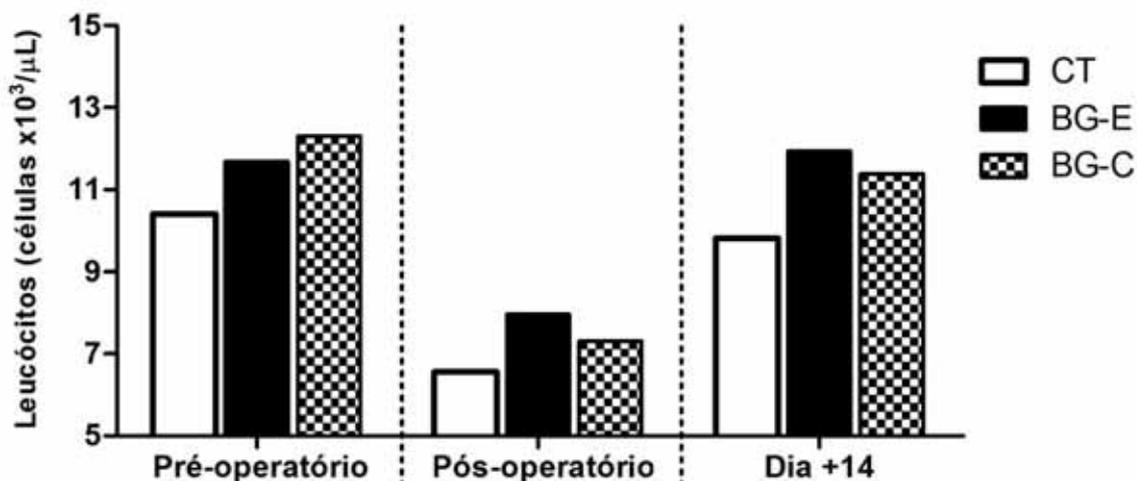


Figura 1. Contagem absoluta de leucócitos totais de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

5.2.2 Fenótipo dos leucócitos periféricos

Os dados referentes às análises das subpopulações leucocitárias estão apresentados na Tabela 7. Houve interação entre tratamento e momento de avaliação para as subpopulações relativas de linfócitos T citotóxicos (CD5⁺CD8⁺) (p=0,042) e na relação CD4:CD8 (p=0,025). Houve tendência à interação entre tratamento e momento de avaliação para as contagens absolutas de linfócitos T citotóxicos (CD5⁺CD8⁺) (p=0,161) e de monócitos (CD14⁺) (p=0,218). A contagem relativa de células CD5⁺CD8⁺ mostrou que ambos os grupos suplementados com beta-glucano tiveram valores menores que o grupo controle, no momento pré-operatório; notou-se também que para o grupo BG-E o valor encontrado na última avaliação foi significativamente maior que no momento pré-operatório. Já a contagem absoluta deste mesmo tipo celular evidenciou, também para o grupo BG-E, um aumento na contagem, significativamente maior que os valores encontrados nas avaliações anteriores (Figura 2). A relação CD4:CD8 foi influenciada pelos tratamentos e momentos de avaliação, sendo que no momento pós-operatório o grupo BG-E apresentou valores maiores que CT; além disso, o grupo BG-E teve uma diminuição

significativa desta medida, quando se comparou o momento pós-operatório com o dia +14.

Tabela 7. Fenótipo dos leucócitos periféricos antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano, valores relativos e absolutos.

| Item | Subpopulação (%) | | | Média | Valor de P |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------|
| | Pré-operatório | Pós-operatório | Dia + 14 | | |
| <i>CD5⁺ (%)</i> | | | | | |
| CT ¹ | 74,78 | 73,24 | 72,10 | 73,38 ^A | - |
| BG-E | 71,60 | 70,95 | 75,49 | 72,66 ^A | - |
| BG-C | 73,60 | 61,29 | 71,57 | 68,51 ^A | - |
| Média | 73,32 ^a | 68,49 ^a | 72,75 ^a | | 0,349 |
| Valor de P | - | - | - | 0,370 | |
| CV (%) ² | | | | 16,67 | |
| <i>CD5⁺ (céls x 10³/μL)</i> | | | | | |
| CT ¹ | 2,53 | 1,17 | 2,36 | 2,02 ^A | - |
| BG-E | 2,23 | 1,28 | 2,84 | 2,12 ^A | - |
| BG-C | 1,86 | 1,27 | 2,30 | 1,81 ^A | - |
| Média | 2,20 ^a | 1,24 ^b | 2,50 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,572 | |
| CV (%) ² | | | | 47,36 | |
| <i>CD5⁺CD4⁺ (%)</i> | | | | | |
| CT | 39,88 | 41,59 | 36,53 | 39,33 ^A | - |
| BG-E | 36,94 | 39,41 | 42,38 | 39,58 ^A | - |
| BG-C | 40,58 | 37,51 | 35,58 | 37,89 ^A | - |
| Média | 39,13 ^a | 39,50 ^a | 38,17 ^a | | 0,832 |
| Valor de P | - | - | - | 0,735 | |
| CV (%) ² | | | | 18,90 | |
| <i>CD5⁺CD4⁺ (céls x 10³/μL)</i> | | | | | |
| CT | 0,97 | 0,53 | 0,90 | 0,80 ^A | - |
| BG-E | 0,81 | 0,45 | 1,16 | 0,81 ^A | - |
| BG-C | 0,74 | 0,46 | 0,71 | 0,63 ^A | - |
| Média | 0,84 ^a | 0,48 ^b | 0,92 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,278 | |
| CV (%) ² | | | | 49,31 | |
| <i>CD5⁺CD8⁺ (%)</i> | | | | | |
| CT | 23,19 ^{Aa} | 23,92 ^{Aa} | 17,57 ^{Aa} | 21,56 | 0,155 |
| BG-E | 13,95 ^{Ba} | 15,07 ^{Aa} | 23,41 ^{Aa} | 17,48 | 0,038 |
| BG-C | 15,86 ^{Ba} | 17,21 ^{Aa} | 16,39 ^{Aa} | 16,49 | 0,942 |
| Média | 17,67 | 18,73 | 19,12 | | |
| Valor de P | 0,044 | 0,060 | 0,164 | | |
| CV (%) ² | | | | 39,49 | |

Cont...

| | | | | | |
|--|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------|
| <i>CD5⁺CD8⁺ (cél/s/μL)</i> | | | | | |
| CT | 0,61 ^{Aa} | 0,24 ^{Aa} | 0,47 ^{Aa} | 0,44 | 0,044 |
| BG-E | 0,33 ^{Ab} | 0,25 ^{Ab} | 0,71 ^{Aa} | 0,43 | 0,015 |
| BG-C | 0,30 ^{Aa} | 0,23 ^{Aa} | 0,36 ^{Aa} | 0,30 | 0,717 |
| Média | 0,41 | 0,24 | 0,52 | | |
| Valor de P | 0,101 | 0,994 | 0,106 | | |
| CV (%) ² | | | | 73,18 | |
| <i>Relação CD4:CD8</i> | | | | | |
| CT | 2,00 ^{Aa} | 1,96 ^{Aa} | 2,61 ^{Aa} | 2,19 | 0,303 |
| BG-E | 2,96 ^{Ab} | 3,61 ^{Bab} | 1,92 ^{Aa} | 2,83 | 0,010 |
| BG-C | 2,58 ^{Aa} | 2,50 ^{ABa} | 1,96 ^{Aa} | 2,35 | 0,443 |
| Média | 2,51 | 2,69 | 2,16 | | |
| Valor de P | 0,183 | 0,007 | 0,291 | | |
| CV (%) ² | | | | 38,10 | |
| <i>CD21⁺ (%)</i> | | | | | |
| CT | 15,12 | 16,70 | 16,40 | 16,07 ^A | - |
| BG-E | 13,58 | 11,95 | 13,60 | 13,05 ^{AB} | - |
| BG-C | 6,70 | 13,35 | 11,54 | 10,53 ^B | - |
| Média | 0,11 ^a | 0,42 ^a | 0,52 ^a | | 0,565 |
| Valor de P | - | - | - | 0,095 | |
| CV (%) ² | | | | 50,06 | |
| <i>CD21⁺ (cél/s x 10³/μL)</i> | | | | | |
| CT | 0,40 | 0,32 | 0,49 | 0,40 ^A | - |
| BG-E | 0,41 | 0,21 | 0,34 | 0,32 ^A | - |
| BG-C | 0,21 | 0,27 | 0,59 | 0,36 ^A | - |
| Média | 0,34 ^{ab} | 0,26 ^b | 0,47 ^a | | 0,132 |
| Valor de P | - | - | - | 0,687 | |
| CV (%) ² | | | | 81,87 | |
| <i>CD14⁺ (%)</i> | | | | | |
| CT | 5,88 | 5,92 | 5,25 | 5,68 ^A | - |
| BG-E | 9,31 | 10,51 | 3,03 | 7,62 ^A | - |
| BG-C | 2,94 | 5,21 | 5,08 | 4,41 ^A | - |
| Média | 6,04 ^a | 7,21 ^a | 4,45 ^a | | 0,353 |
| Valor de P | - | - | - | 0,266 | |
| CV (%) ² | | | | 100,10 | |
| <i>CD14⁺ (cél/s x 10³/μL)</i> | | | | | |
| CT | 0,70 ^{Aa} | 0,59 ^{Aa} | 0,44 ^{Aa} | 0,58 | 0,668 |
| BG-E | 1,16 ^{Aa} | 0,72 ^{Aa} | 0,26 ^{Aa} | 0,71 | 0,030 |
| BG-C | 0,42 ^{Aa} | 0,46 ^{Aa} | 0,62 ^{Aa} | 0,50 | 0,786 |
| Média | 0,76 | 0,59 | 0,44 | | |
| Valor de P | 0,064 | 0,696 | 0,557 | | |
| CV (%) ² | | | | 90,55 | |

¹ – CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

² – CV: coeficiente de variação.

^{A,B} - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

^{a,b} - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

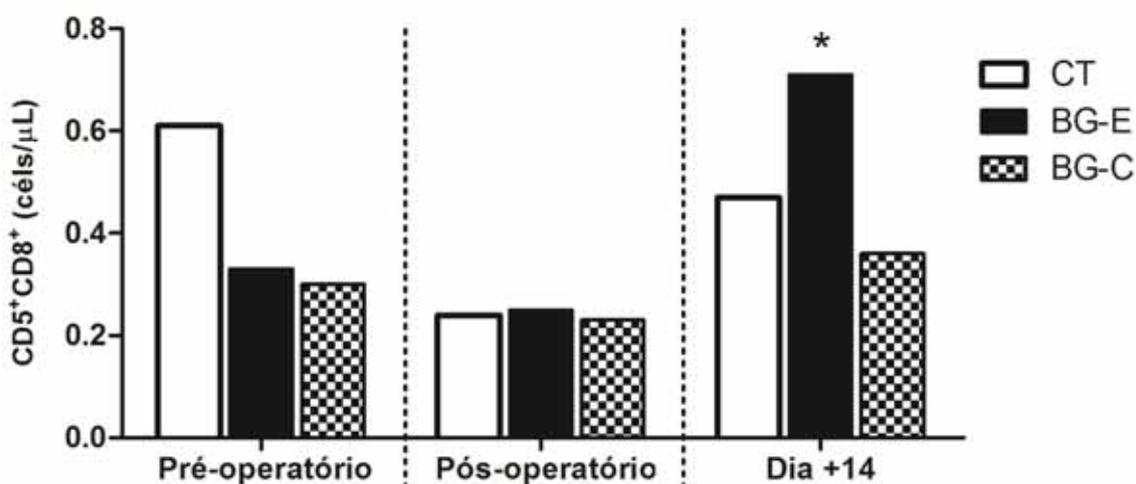


Figura 2. Contagem absoluta de linfócitos T citotóxicos (CD5⁺CD8⁺) de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9). * Diferença significativa do tratamento BG-E, comparando-se com as avaliações anteriores ($p < 0,05$).

5.2.3 Avaliação da atividade fagocítica de leucócitos periféricos

Os resultados do teste de avaliação de fagocitose estão apresentados na Tabela 8 e nas Figuras 3 e 4. Observou-se influência do procedimento cirúrgico sobre a atividade fagocítica para ambas as populações, sendo que os valores médios dos grupos para este parâmetro foram significativamente maiores no pós-operatório imediato, em relação à avaliação feita antes da cirurgia.

Também foram encontradas diferenças nestes parâmetros com relação à média dos grupos estudados. Para a população de polimorfonucleares o grupo BG-E apresentou valores significativamente menores dos observados nos outros grupos. Já a fagocitose por células mononucleares revelou um aumento para o grupo BG-C, também significativamente maior do que os outros dois grupos.

Tabela 8. Avaliação da atividade fagocítica das populações de polimorfonucleares e mononucleares (porcentagem média de células fagocitando), antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano.

| Item | Período | | | Média | Valor de P |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | Pré-operatório | Pós-operatório | Dia + 14 | | |
| <i>Polimorfonucleares</i> | | | | | |
| CT ¹ | 53,76 | 72,59 | 70,26 | 65,54 ^A | - |
| BG-E | 46,34 | 68,09 | 60,85 | 58,43 ^B | - |
| BG-C | 57,17 | 77,18 | 77,76 | 70,71 ^A | - |
| Média | 52,43 ^b | 72,62 ^a | 69,63 ^a | | <0,001 |
| Valor de P | - | - | - | 0,019 | |
| CV (%) ² | 23,07 | | | | |
| <i>Mononucleares</i> | | | | | |
| CT ¹ | 47,54 | 59,83 | 60,44 | 55,93 ^B | - |
| BG-E | 48,09 | 62,82 | 57,79 | 56,23 ^B | - |
| BG-C | 55,89 | 72,01 | 73,03 | 66,98 ^A | - |
| Média | 50,51 ^b | 64,89 ^a | 63,75 ^a | | 0,005 |
| Valor de P | - | - | - | 0,025 | |
| CV (%) ² | 25,81 | | | | |

¹ – CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

² – CV: coeficiente de variação.

^{A,B} - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,05).

^{a,b} - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,05).

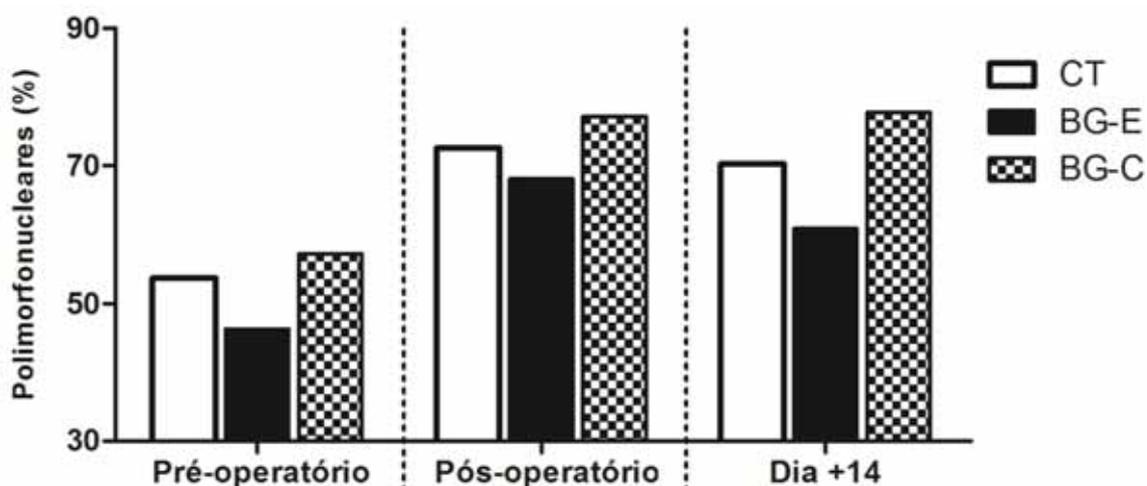


Figura 3. Avaliação da atividade fagocítica de células polimorfonucleares de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

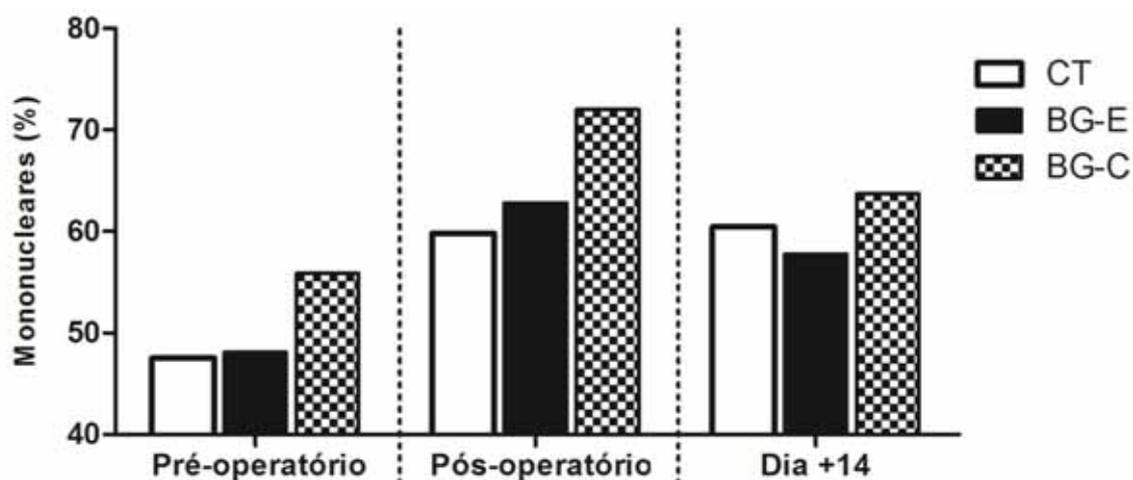


Figura 4. Avaliação da atividade fagocítica de células mononucleares de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

5.2.4 Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos quanto à produção de citocinas (Tabela 9). Observaram-se, apenas, diferenças entre momentos de avaliação, independente dos tratamentos. Na média de todos os grupos, os animais tiveram uma elevação na produção de IFN- γ no dia +14, em relação às duas avaliações anteriores. Houve também uma tendência da produção de TNF- α ser maior no dia +14, em comparação com o momento pós-operatório. Para a IL-2, não foram constatadas diferenças entre tratamentos ou momentos de avaliação. Os resultados de IL-4 e IL-10 não estão apresentados, pois estas avaliações, para a grande maioria dos animais, ficaram abaixo dos limites de quantificação dos kits comerciais utilizados.

Tabela 9. Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares, antes e após ovário-histerectomia de cadelas alimentadas com dietas experimentais com e sem beta-glucano.

| Item | <i>Pré-operatório</i> | <i>Pós-operatório</i> | <i>Dia + 14</i> | <i>Média</i> | <i>Valor de P</i> |
|--|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| TNF-α (pg/mL) | | | | | |
| CT ¹ | 151,82 | 87,59 | 114,24 | 117,89 ^A | - |
| BG-E | 84,70 | 83,37 | 157,94 | 108,67 ^A | - |
| BG-C | 112,66 | 84,87 | 136,26 | 111,26 ^A | - |
| Média | 116,39 ^a | 85,28 ^a | 136,14 ^a | | 0,226 |
| Valor de P | - | - | - | 0,943 | |
| CV (%) ² | 66,27 | | | | |
| IFN-γ (pg/mL) | | | | | |
| CT | 300,29 | 100,09 | 719,49 | 373,28 ^A | - |
| BG-E | 178,29 | 304,02 | 613,66 | 365,32 ^A | - |
| BG-C | 189,38 | 121,15 | 501,71 | 270,74 ^A | - |
| Média | 222,65 ^b | 175,08 ^b | 611,62 ^a | | 0,009 |
| Valor de P | - | - | - | 0,701 | |
| CV (%) ² | 119,05 | | | | |
| IL-2 (pg/mL) | | | | | |
| CT | 84,55 | 247,37 | 181,20 | 171,04 ^A | - |
| BG-E | 184,51 | 112,00 | 198,34 | 165,28 ^A | - |
| BG-C | 100,85 | 92,86 | 181,48 | 125,06 ^A | - |
| Média | 123,30 ^a | 151,08 ^a | 187,00 ^a | | 0,589 |
| Valor de P | - | - | - | 0,701 | |
| CV (%) ² | 112,08 | | | | |

¹ – CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

² – CV: coeficiente de variação.

^{A,B} - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

^{a,b} - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.5 Concentração de intermediários reativos do oxigênio (H₂O₂) e do nitrogênio (NO)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados, tanto para a produção de óxido nítrico, quanto de peróxido de hidrogênio (Tabela 10) nem interação entre tratamento e momento de avaliação ($p > 0,05$). Estes resultados foram altamente variáveis entre os animais estudados, diminuindo a possibilidade de se encontrar diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 10. Determinação da produção de intermediários reativos do oxigênio (H₂O₂) e do nitrogênio (NO).

| Item | <i>Pré-operatório</i> | <i>Pós-operatório</i> | <i>Dia + 14</i> | <i>Média</i> | <i>Valor de P</i> |
|--|-----------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| NO – SC (µM)¹ | | | | | |
| CT ² | 5,50 | 7,74 | 13,62 | 8,95 ^a | - |
| BG-E | 5,49 | 5,56 | 10,20 | 7,08 ^a | - |
| BG-C | 10,22 | 4,72 | 5,23 | 6,72 ^a | - |
| Média | 7,07 ^a | 6,01 ^a | 9,68 ^a | | 0,604 |
| Valor de P | - | - | - | 0,812 | |
| CV (%) ³ | | | | 103,65 | |
| NO – LPS (µM)¹ | | | | | |
| CT | 18,69 | 17,35 | 11,08 | 15,71 ^a | - |
| BG-E | 10,37 | 10,79 | 7,19 | 9,45 ^a | - |
| BG-C | 8,64 | 8,53 | 10,83 | 9,33 ^a | - |
| Média | 12,57 ^a | 12,23 ^a | 9,70 ^a | | 0,837 |
| Valor de P | - | - | - | 0,354 | |
| CV (%) ³ | | | | 85,70 | |
| H₂O₂ – SC (nM)¹ | | | | | |
| CT | 4,23 | 4,20 | 3,46 | 3,96 ^a | - |
| BG-E | 6,05 | 4,37 | 5,09 | 5,17 ^a | - |
| BG-C | 3,70 | 3,11 | 4,97 | 3,93 ^a | - |
| Média | 4,66 ^a | 3,89 ^a | 4,51 ^a | | 0,875 |
| Valor de P | - | - | - | 0,648 | |
| CV (%) ³ | | | | 72,59 | |
| H₂O₂ – LPS (nM)¹ | | | | | |
| CT | 3,14 | 3,57 | 4,26 | 3,66 ^a | - |
| BG-E | 6,64 | 4,83 | 3,80 | 5,09 ^a | - |
| BG-C | 4,65 | 6,34 | 6,58 | 5,86 ^a | - |
| Média | 4,81 ^a | 4,91 ^a | 4,88 ^a | | 0,997 |
| Valor de P | - | - | - | 0,348 | |
| CV (%) ³ | | | | 62,57 | |

¹ – NO: dosagem de óxido nítrico; H₂O₂: dosagem de peróxido de hidrogênio; SC: cultura somente de células, sem estímulo; LPS: cultura de células estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano.

² – CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

³ – CV: coeficiente de variação.

^{A,B} - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,05).

^{a,b} - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,05).

5.2.6 Concentração de proteína C-reativa sérica

A concentração de proteína C-reativa no soro das cadelas (Tabela 11 e Figura 5) revelou interação entre tratamento e momento de avaliação ($p=0,064$). Enquanto as cadelas suplementadas com beta-glucano mantiveram os níveis de proteína C-reativa ao longo de todas as avaliações, os animais do grupo controle apresentaram tendência ao aumento desta concentração no dia +14, comparando-se aos valores do momento pré-operatório ($p=0,101$). Observou-se alta variação individual entre as cadelas que participaram do estudo.

Tabela 11. Concentração de proteína C-reativa sérica de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano.

| Item | Período | | | Média | Valor de P |
|---|--------------------|--------------------|---------------------|-------|------------|
| | Pré-operatório | Pós-operatório | Dia + 14 | | |
| <i>Proteína C-Reativa ($\mu\text{g/mL}$)</i> | | | | | |
| CT ¹ | 4,17 ^{Aa} | 4,38 ^{Aa} | 10,88 ^{Aa} | 6,48 | 0,004 |
| BG-E | 6,96 ^{Aa} | 6,46 ^{Aa} | 8,15 ^{Aa} | 7,19 | 0,605 |
| BG-C | 7,05 ^{Aa} | 6,48 ^{Aa} | 6,52 ^{Aa} | 6,68 | 0,909 |
| Média | 6,06 | 5,77 | 8,52 | | |
| Valor de P | 0,146 | 0,350 | 0,084 | | |
| CV (%) ² | 44,12 | | | | |

¹ – CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

² – CV: coeficiente de variação.

^A - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

^a - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

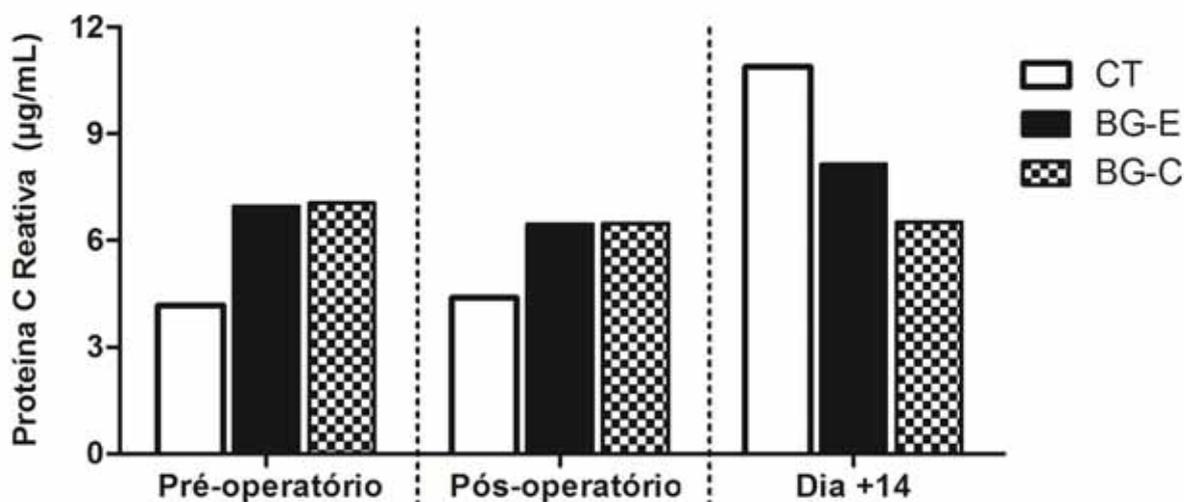


Figura 5. Dosagem de proteína C-reativa sérica de cães controle e mediante consumo de dietas com beta-glucano. CT: grupo controle (n=10); BG-E: 0,1% de beta-glucano, incorporado à ração (n=9); BG-C: 0,1% de beta-glucano, administrado em cápsulas (n=9).

6. DISCUSSÃO

A imunomodulação através da dieta pode ser de duas formas, primeiro buscando componentes da dieta que atuem diretamente nos patógenos ou na microbiota; segundo, por exercer efeitos indiretos sobre os patógenos ou a microbiota, por terem como alvo as células intestinais e/ou as células imunes do hospedeiro. Os beta-glucanos atuam da segunda maneira, sendo suas células alvo monócitos/macrófagos, neutrófilos e células *natural killer* (GODDEERIS, 2010).

Para verificar os efeitos imunomoduladores do beta-1,3/1,6-glucano na espécie canina, foram realizados dois experimentos. O primeiro, realizado *ex vivo*, mostrou efeitos claros das concentrações crescentes de beta-glucano sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por neutrófilos e monócitos. Já o segundo experimento teve resultados menos claros, sugerindo que a avaliação *in vivo* esteja sujeita a outras influências, tais como a variabilidade entre os animais, consumo inadequado da substância e condições ambientais.

O termo “*ex vivo*” usado no primeiro experimento se refere a células retiradas e isoladas dos cães e depois submetidas a condições controladas de cultura celular,

para se avaliar o efeito de diferentes concentrações de beta-glucano. Existe muita controvérsia na literatura quanto à diferenciação deste termo de “*in vitro*”, sendo que alguns autores até os usam como sinônimos. Neste trabalho deu-se preferência ao termo “*ex vivo*”, pelos motivos expostos anteriormente.

As técnicas *ex vivo* podem ser de grande utilidade para justificar e corroborar estudos *in vivo*, sendo que elas podem ajudar a explicar os potenciais mecanismos de ação dos compostos estudados. Entretanto, podem ser questionadas se realmente refletem o que ocorre nas respostas *in vivo*. Apesar disso, estas técnicas têm se tornado de grande importância para a pesquisa farmacêutica e biotecnológica, por permitirem determinar o potencial modo de ação, buscar por possíveis candidatos a se estudar *in vivo*, e não são influenciadas por fatores ambientais que podem mascarar os resultados *in vivo* (temperatura, pressão de doença, etc.) e farmacocinética (GANNER; SCHATZMAYR, 2012).

Sabe-se que a estimulação da resposta microbicida de fagócitos, pela produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, é um importante mecanismo da imunidade inata, pois auxilia na eliminação de patógenos fagocitados. Esta influência foi demonstrada no experimento 1, com aumento linear da concentração destas substâncias, induzido por concentrações crescentes de beta-glucano.

Neutrófilos e macrófagos ativados convertem oxigênio molecular em intermediários reativos do oxigênio (ROIs) que são agentes altamente oxidantes que destroem microrganismos (e outras células). Além destas substâncias, os macrófagos produzem intermediários reativos do nitrogênio, principalmente o óxido nítrico (NO), pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é uma enzima presente no citosol de células ativadas por LPS ou outros produtos microbianos que estimulem a ativação de receptores *toll-like* (TLRs). Apesar da importância destas substâncias nos mecanismos de proteção na imunidade inata, quando a ativação da produção destas se encontra exacerbada pode ocorrer dano em tecidos normais do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Outros estudos já demonstraram a ação de beta-glucano sobre a produção destes intermediários reativos. Sonck et al (2010) avaliaram os efeitos de várias fontes de beta-glucano sobre leucócitos suínos e encontraram que o beta-glucano (da mesma fonte utilizada no experimento atual) foi capaz de estimular monócitos e

neutrófilos para a produção de espécies reativas do oxigênio, sendo que a concentração ótima para estimulação foi menor para monócitos (100 µg/mL) do que para neutrófilos (400 µg/mL). A ação do mesmo composto também foi estudada em macrófagos de carpas, apesar de ser uma espécie fisiologicamente bem distinta da canina, resultados similares foram observados, com o estímulo da produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio (PIETRETTI et al., 2013).

Assume-se que essa imunoestimulação induzida pelo beta-glucano possa representar um mecanismo de proteção, entretanto, estas afirmações devem ser interpretadas com cautela, pois a elevação destes radicais livres também pode ser um mecanismo de lesão tecidual. A produção de peróxido de hidrogênio é, por exemplo, um dos fatores que contribuem para a lesão tecidual em animais com neoplasias (LISANTI et al., 2011). Dessa forma, estes dados devem ser interpretados considerando o contexto da doença ou estado fisiológico do animal, para se ponderar sobre os possíveis benefícios.

No experimento 2 avaliou-se *in vivo* se o fornecimento de beta-glucano pré e pós-operatório promoveria imunomodulação de cadelas que seriam submetidas à cirurgia de castração.

À avaliação hematológica, diferenças entre os grupos foram notadas para hemácias e eosinófilos, sendo as médias de BG-E maiores que as dos outros dois grupos e para leucócitos totais, em que se encontrou que ambos os tratamentos com beta-glucano induziram aumento na contagem média destas células. Outros trabalhos que descrevem a ação de beta-glucano sobre a imunidade, também demonstram a sua ação sobre a contagem de leucócitos. Em peixes (*Lutjanus guttatus*), a suplementação de beta-1,3/1,6-glucano de levedura, nas doses de 0,05 e 0,1% induziu aumento na contagem deste tipo celular (DEL RIO-ZARAGOZA; FAJER-ÁVILA; ALMAZÁN-RUEDA, 2011). Já em cães adultos saudáveis suplementados com beta-glucano, tais efeitos não foram encontrados, foi observada apenas aumento na contagem de linfócitos (ZAINE, 2010). Em mulheres com câncer de mama, a suplementação de beta-glucano por 15 dias também não alterou as contagens de leucócitos totais (DEMIR et al., 2007).

O aumento de eosinófilos observado para o grupo BG-E pode ser comparado à elevação verificada em outro trabalho, mas pela inalação de aerossóis contendo

beta-glucano derivado do cogumelo *Grifolanum commune*, sendo que porquinhos da Índia expostos a essa substância tiveram significativamente mais eosinófilos migrando ao epitélio respiratório, no entanto essa elevação foi bem mais discreta quando os animais inalaram beta-glucano juntamente com LPS (FOGELMARK; THORN; RYLANDER, 2001). Assume-se que essa elevação não teve efeitos deletérios para as cadelas estudadas, visto que não apresentaram sintomas de doenças, no entanto deve ser feito um acompanhamento dos animais que recebam beta-glucano, especialmente à longo prazo, para se investigar possíveis efeitos negativos.

A acentuada queda no pós-cirúrgico imediato observada nos parâmetros da avaliação hematológica está relacionada à perda de sangue durante a cirurgia e, em menor grau, às coletas de sangue realizadas. Por mais que estes valores estiveram abaixo dos valores de normalidade, não houve prejuízo à saúde dos animais estudados, sendo observado que voltaram aos níveis normais quando avaliados após 14 dias. Dessa forma, as coletas de sangue, mesmo sendo em grande volume, foram feitas de forma segura, considerando-se o quanto da volemia seria possível se retirar sem prejuízo à saúde.

Com relação à avaliação das subpopulações leucocitárias, foram observadas diferenças pouco claras entre grupos ou momentos de avaliação. Estudos em diferentes espécies haviam demonstrado a ação do beta-glucano sobre estas subpopulações, induzindo aumento de células CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺ (GUO; ALI; QURESHI, 2003; CHAE et al., 2006; HAHN et al., 2006; ZAINI, 2010). No entanto, o presente demonstra alteração somente na contagem de células CD8⁺, para o grupo BG-E, apesar de a dose utilizada ser quase sete vezes maior do que a utilizada em trabalho anterior com cães. No modelo experimental escolhido, tentou-se padronizar alguns parâmetros para que a população estudada fosse mais homogênea. Contudo, não foi possível controlar a raça dos animais estudados e nem o tipo de alimentação que recebiam previamente ao estudo, fatores os quais podem ter interferido na homogeneidade dos dados. Faldyna et al. (2001) demonstraram haver diferenças nas subpopulações leucocitárias entre várias raças de cães estudadas. Talvez por isso, nosso trabalho anterior que avaliou somente cães da raça Beagle pôde encontrar as diferenças agora não verificadas.

Apesar de ser considerada uma avaliação imune mais simples, a avaliação de fagocitose é importante para determinar a eficácia de qualquer substância imunomoduladora (VETVICKA et al., 2008). Nesta avaliação, em leucócitos periféricos, observaram-se efeitos tanto de tratamento quanto de momento de avaliação sobre as médias dos grupos. Neste caso, pôde-se sugerir uma influência do processamento da ração sobre a ação do beta-glucano, visto que o tratamento que induziu aumento da porcentagem de monócitos fagocitando foi apenas o beta-glucano administrado em cápsulas. O grupo que teve beta-glucano incluído no alimento extrusado inclusive apresentou uma média menor de polimorfonucleares fagocitando do que os outros dois grupos.

Resultados semelhantes foram encontrados em frangos jovens. A suplementação de beta-glucano (os autores não especificam a fonte e nem dose), além de promover aumento da resistência à infecção por *Salmonella enteritidis*, induziu que os heterófilos (células semelhantes a neutrófilos) aumentassem em mais de duas vezes a fagocitose desta bactéria (LOWRY et al., 2005). O aumento da fagocitose também foi verificado em estudo com camundongos jovens e adultos que receberam beta-glucano derivado de leveduras, sendo esta elevação dose-dependente, com maiores valores observados para os animais que receberam, por via intra-peritoneal, 250 µg da substância; os mesmos efeitos foram observados nos animais que receberam beta-glucano por via oral (VETVICKA et al., 2008).

Assume-se que a ligação do beta-1,3/1,6-glucano com o receptor dectina-1, medeia a atividade fagocítica, especialmente de macrófagos e células dendríticas (CHAUNG et al., 2009). Tais efeitos foram demonstrados nas cadelas estudadas, sugerindo o envolvimento deste receptor sobre a fagocitose também em leucócitos caninos.

Pelos resultados observados, é possível que o processamento das rações tenha alterado a forma da molécula de beta-glucano, influenciando no seu reconhecimento pelas células imunes. Apesar de estudos prévios terem verificado ação sobre o sistema imune de beta-glucano mesmo no alimento extrusado, para cães saudáveis ou com doença intestinal inflamatória (ZAINÉ, 2010; RYCHLIK et al., 2013).

O processo de extrusão, utilizado para a fabricação das rações secas para cães e gatos, envolve altas temperaturas em curto período de tempo, em que os alimentos

são cozidos por uma combinação de umidade, pressão, temperatura e energia mecânica. Este processo pode ter efeitos positivos sobre a qualidade do alimento (desnaturação de enzimas indesejáveis, inativação de fatores antinutricionais, esterilização do produto, conservação da cor e sabor), entretanto pode haver alguns efeitos indesejáveis como a diminuição do valor biológico da proteína por ocorrência de reações de *Maillard* e perda de vitaminas termo-lábeis. Relata-se que a extrusão de alimentos usados como fontes de fibra possa, inclusive, melhorar seus efeitos de redução do colesterol sanguíneo (SINGH; GAMLATH; WAKELING, 2007).

Camire (1998) afirma que a extrusão pode resultar na fragmentação de proteínas, amidos e polissacarídeos não-amiláceos, criando moléculas reativas que poderiam formar novas ligações que poderiam resultar em um efeito benéfico sobre a saúde. Não se sabe o que exatamente ocorre com a molécula de beta-1,3/1,6-glucano quando submetida a estas condições de processamento, entretanto sabe-se que o efeito biológico desta está intimamente ligado à sua conformação, visto que diferentes efeitos biológicos são relatados, relacionados à fonte de obtenção (levedura, cogumelos, algas, cereais), solubilidade da molécula e número de ramificações da cadeia (VETVICKA et al., 2008; SONCK et al., 2010). Apesar disso, no experimento 1 não houve perda de efeito da substância, mesmo quando a solução contendo beta-glucano foi submetida a autoclavagem para esterilização, um processo em que as condições de temperatura e pressão comparáveis à extrusão. Assim, o processamento é um fato que deve ser levado em conta quando se compara estudos que avaliaram os efeitos biológicos do beta-glucano.

As técnicas que envolveram cultura celular (dosagens de citocinas e produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio) mostraram alta variação dos resultados das análises. Esta variação parece estar atribuída mais às técnicas em si, do que uma heterogeneidade entre os animais estudados, visto que na grande maioria dos outros testes realizados os coeficientes de variação foram menores.

A metodologia de avaliação da resposta de células mononucleares do sangue periférico tem alguns pontos negativos a serem considerados pelo isolamento destas células, sendo caro, trabalhoso e necessitar grandes volumes de sangue. Além disso, o processo de separação celular pode estimular as células e levar à perda de populações específicas, levando a resultados que não refletiriam a condição *in vivo*

(SCHMITZ et al, 2013). Apesar disso, é uma metodologia bastante empregada em pesquisas avaliando a ação de nutracêuticos sobre a imunidade, inclusive já utilizada previamente por nosso grupo de pesquisa, demonstrando que cães que consumiram beta-glucano tiveram uma maior produção de TNF- α (ZAINE, 2010). Trabalhos avaliando a ação do beta-glucano em outras espécies também demonstraram a ação sobre a produção de citocinas (OLSON et al., 1996; BERNER et al., 2005).

Entretanto, o presente estudo não mostrou influência dos tratamentos com beta-glucano sobre a produção de nenhuma das citocinas avaliadas. A única diferença encontrada foi na média dos dias, sendo que à última avaliação as cadelas produziram mais IFN- γ que nas avaliações anteriores.

A mesma falta de resposta foi encontrada na avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. Apesar de serem observadas diferenças numéricas entre tratamentos ou momentos de avaliação, a comparação estatística não foi significativa devido aos altos coeficientes de variação (acima de 60%). Os resultados observados para os tratamentos *ex vivo* no experimento 1 não se repetiram na avaliação quando os tratamentos foram *in vivo*.

Os resultados de proteína C-reativa (CRP) sérica mostraram uma interação entre tratamento e momento de avaliação, com tendência do grupo controle elevar esta concentração, enquanto os dois grupos que receberam beta-glucano se mantiveram constantes. A CRP está incluída entre as proteínas de fase aguda do sangue, sendo estas usadas para avaliar a resposta sistêmica da imunidade inata, em resposta a infecções, inflamação ou trauma. Em cães, suas concentrações se elevam rapidamente em resposta a alguns estímulos, tais como infecções (leishmaniose, leptospirose, erliquiose), pancreatite aguda, piometra, doença inflamatória intestinal e até mesmo traumas cirúrgicos (CÉRON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; ECKERSALL; BELL, 2010).

Alguns estudos demonstraram a relação entre a concentração de CRP e procedimentos cirúrgicos em cães. Céron, Eckersall e Martínez-Subiela (2005) afirmam que o aumento na concentração de CRP está relacionado à intensidade do trauma cirúrgico, sendo que em cirurgias onde ocorre mais injúria tecidual, tais como cirurgias ortopédicas, espera-se uma maior elevação. Pesquisas com cadelas submetidas a ovário-histerectomia revelaram que esta cirurgia também induz este

aumento. Porém, uma elevação significativa começa a ocorrer apenas 4 horas após o trauma e seu pico é detectado após 24 horas (CÉRON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; MICHELSEN et al., 2012; KJELGAARD-HANSEN et al., 2013). Neste projeto as avaliações feitas depois do procedimento cirúrgico foram imediatamente após o término da sutura de pele e 14 dias após. Uma tendência a aumento foi detectada apenas para o grupo controle, na última avaliação. Talvez uma avaliação entre 4 e 24 horas após a cirurgia evidenciasse mais diferenças entre grupos, visto que era de se esperar concentrações maiores de CRP, no entanto o delineamento experimental não permitiu coletas de sangue dentro de tais períodos. É provável que a concentração desta proteína de fase aguda teve um grande aumento nos primeiros dias após a cirurgia e os resultados observados na última avaliação mostrem que ela já estava retornando aos níveis basais.

Entretanto, observou-se uma tendência a aumento apenas para o grupo controle, permitindo sugerir que as cadelas que receberam beta-glucano tiveram uma resposta de fase aguda menor (ou mais rápida), já que seria esperado que após um trauma as suas concentrações de CRP também se elevassem. A resposta de fase aguda, por definição, dura somente alguns dias, no entanto, seu aumento pode estar relacionado a inflamações crônicas. Nestes casos, uma persistência anormal da resposta de fase aguda pode levar a dano tecidual e a algumas complicações, tais como deposição de proteína (como na amiloidose reativa) ou a doenças cardiovasculares em pessoas (CÉRON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Se houve ação do beta-glucano, prevenindo que essa inflamação se tornasse crônica, isso pode representar um benefício à saúde dos pacientes suplementados que sofreram cirurgias.

Apesar de serem objetivos secundários do experimento 2, os efeitos do procedimento cirúrgico e anestesia sobre a imunidade também foram demonstrados, especialmente pelas alterações pós-operatórias nas contagens de células no hemograma e na porcentagem de fagocitose. Em trabalho realizado avaliando o efeito de cirurgias eletivas sobre a imunidade de crianças, Romeo et al. (2002) demonstraram um aumento na fagocitose de 7,4% para neutrófilos e 11,6% para monócitos, resultados inferiores aos observados na pesquisa atual, 38% para neutrófilos e 28% para monócitos. O modelo de cirurgia utilizado no atual projeto é

considerado de intensidade moderada e as ações sobre a imunidade não foram detectadas por Vaisanen et al. (2004) que também avaliaram cadelas submetidas a ovário-histerectomia, e encontraram que este tipo de cirurgia não alterou significativamente a atividade oxidativa de neutrófilos.

7. CONCLUSÃO

Os dados sugerem que o beta-glucano ativa o sistema imune de cães, mas que é possível que seu fornecimento no alimento extrusado ou em cápsulas resulte em efeitos diferentes no animal.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2011. 560 p.

BABINEAU, T. J.; MARCELLO, P.; SWAILS, W.; KENLER, A.; BISTRAN, B.; FORSE, R. A. Randomized Phase I/II Trial of a Macrophage-Specific Immunomodulator (PGG-Glucan) in High-Risk Surgical Patients. **Annals of surgery**. v. 220, n. 5, p. 601-609, 1994.

BERNER, M. D.; SURA, M. E.; ALVES, B. N.; HUNTER, K. W. Jr. IFN- γ primes macrophages for enhanced TNF- α expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate B-glucan. **Immunology letters**, v. 98, n.1, p. 115-122, 2005.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-37, 2001.

CAMIRE, M.E. Chemical Changes during Extrusion Cooking. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 434, p. 109-121, 1998.

CÉRON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary clinical pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CEYLAN, C.; AYDILEK, N.; IPEK, H. Effects of tiletamine-zolazepam anaesthesia on plasma antioxidative status and some haematological parameters in sheep. **Acta Veterinaria Hungarica**. n. 5, v. 2, p. 191-197, 2007.

CHAE, B. J.; LOHAKARE, J. D.; MOON, W. K.; LEE, S. L.; PARK, Y. H.; HAHN, T. W. Effects of supplementation of b-glucan on the growth performance and immunity in broilers. **Research in veterinary science**, v. 80, n.1, p. 291–298, 2006.

CHANPUT, W.; REITSMA, M.; KLEINJANS, L.; MES, J. J.; SAVELKOUL, H. F.; WICHERS, H. J. β -Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n.6, p. 822–833, 2012.

CHAUNG, H.C.; HUANG, T.C.; YU, J.H.; WU, M.L.; CHUNG, W.B. Immunomodulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 131, n. 3-4, p. 147-157, 2009.

COOK, J. A.; HOLLBROOK, T. W.; DOUGHERTY, W. J. Protective Effect of Glucan Against Visceral Leishmaniasis in Hamsters. **Infection and immunity**, v. 37, n. 3, p. 1261-1269, 1982.

CROSS, G. G.; JENNINGS, H. J.; WHITFIELD, D. M.; PENNEY, C. L.; ZACHARIE, B., GAGNON, L. Immunostimulant oxidized β -glucan conjugates. **International immunopharmacology**, v.1, n.1, p. 539–550, 2001.

DEL RIO-ZARAGOZA, O.B.; FAJER-ÁVILA, E.J.; ALMAZÁN-RUEDA, P. Influence of β -glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans. **Parasite immunology**, v. 33, n. 9, p. 483-494, 2011.

DEMIR, G.; KLEIN, H.O.; MANDEL-MOLINAS, N.; TUZUNER, N. Beta glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 113-116, 2007.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The veterinary journal**, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

FEDIAF (Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers) - Nutritional Guidelines For Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. 2013 Disponível em: <<http://www.fediaf.org/self-regulation/nutrition/>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 417 p.

FELIPPE JUNIOR, J.; DA ROCHA E SILVA JÚNIOR, M.; MACIEL, F. M.; SOARES ADE, M.; MENDES, N. F. Infection prevention in patients with severe multiple trauma with the immunomodulator beta 1-3 polyglucose (glucan). **Surgery Gynecology & Obstetrics**, v. 177, n. 4, p. 383-388, 1993.

FOGELMARK, B.; THORN, J.; RYLANDER, R. Inhalation of (1→3)-β-D-glucan causes airway eosinophilia. **Mediators of inflammation**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.

GANNER, A.; SCHATZMAYR, G. V Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 289-297, 2012.

GODDEERIS, B. M. Understanding nutritional immunomodulation: Th1 versus Th2. In: DOPPENBERG, J.; VAN DER AAR, P. **Dynamics in Animal Nutrition**. 1 ed. Wageningen: Wageningen Academic Pub, 2010. cap. 1, p. 15-29.

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

GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBIŃSKA-KIEĆ, A.; PANKIEWICZ, J.; WANAT, A.; ANNA, P.; GOŁABEK, I.; BARTUŚ, S.; MALCZEWSKA-MALEC, M.; SZCZUDLIK, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 2, p. 177-188, 1998.

GUO, Y.; ALI, R.A.; QURESHI, M.A. The influence of β -Glucan on immune responses in broiler chicks. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 461-472, 2003.

HAHN, T.W.; LOHAKARE, J.D.; LEE, S.L.; MOON, W.K.; CHAE, B.J. Effects of supplementation of β -glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1422-1428, 2006.

HALADOVÁ, E.; MOJŽIŠOVÁ, J.; SMRČO, P.; ONDREJKOVÁ, A.; VOJTEK B.; HIPÍKOVÁ V. THE effect of $\beta(1,3/1,6)$ d-glucan on selected non-specific and specific immunological parameters in dogs after vaccination. **Folia Veterinaria**, v. 53, n. 1, p. 43-46, 2009.

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

KELBEL, I.; WEISS, M. Anesthetics and immune function. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 14, n.6, p. 685–691, 2001.

KIM, S. Y.; SONG, H. J.; LEE, Y. Y.; CHO, K. H.; ROH, Y. K. Biomedical Issues of Dietary fiber Beta-Glucan. **Journal of korean medical science**, v. 21, n. 1, p. 781-789, 2006.

KJELGAARD-HANSEN, M.; STROM, H.; MIKKELSEN, L.F.; ERIKSEN, T.; JENSEN, A.L.; LUNTANG-JENSEN, M. Canine serum C-reactive protein as a quantitative

marker of the inflammatory stimulus of aseptic elective soft tissue surgery. **Veterinary clinical pathology**, v. 42, n. 3, p. 342-345, 2013.

KUPFAHL, C.; GEGINAT, G.; HOF, H. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. **International immunopharmacology**, v. 6, n.1, p. 686-696, 2006.

KUROSAWA, S.; KATO, M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. **Journal of Anesthesia**. v. 22, n. 3, p. 263-277, 2008.

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

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**, v.180, n. 15, p.3735-3740, 1998.

LISANTI, M. P.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; LIN, Z.; PAVLIDES, S.; WHITAKER-MENEZES, D.; PESTELL, R. G.; HOWELL, A.; SOTGIA, F. Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: the seed and soil also needs "fertilizer". **Cell Cycle**, v. 10, n. 15, p. 2440-2449, 2011.

LOWRY, V. K.; FARNELL, M. B.; FERRO, P. J.; SWAGGERTY, C. L.; BAHL, A.; KOGUT, M. H. Purified beta-glucan as an abiotic feed additive up-regulates the innate immune response in immature chickens against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. **International journal of food microbiology**, v. 98, n. 3, p. 309-318, 2005.

MANTOVANI, M. S.; BELLINI, M. F.; ANGELI, J. P.; OLIVEIRA, R. J.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R. Beta-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation research**, v. 658 , n. 3, p. 154-161, 2008.

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

MICHELSEN, J., HELLER, J., WILLS, F.; NOBLE, G.K. Effect of surgeon experience on postoperative plasma cortisol and C-reactive protein concentrations after ovariohysterectomy in the dog: a randomised trial. **Australian veterinary journal**, v. 90, n. 12, p. 474-478, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, DC: National Academy Press, 2006.

ODUNAYO, A.; DODAM, J. R.; KERL, M. E.; DECLUE, A. E. State-of-the-Art-Review: Immunomodulatory effects of opioids. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p. 376–385, 2010.

OGAWA, K.; HIRAI, M.; KATSUBE, T.; MURAYAMA, M.; HAMAGUCHI, K.; SHIMAKAWA, T.; NARITAKE, Y.; HOSOKAWA, T.; KAJIWARA, T. Suppression of cellular immunity by surgical stress. **Surgery**, v. 127, n. 3, p. 329-336, 2000.

OLSON, E.J.; STANDING, J.E.; GRIEGO-HARPER, N.; HOFFMAN, O.A.; LIMPER, A.H. Fungal β -Glucan Interacts with Vitronectin and Stimulates Tumor Necrosis Factor Alpha Release from Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3548–3554, 1996.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v.38, p.161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v.46, p.211-226, 1981.

PIETRETTI, D.; VERA-JIMENEZ, N. I.; HOOLE, D.; WIEGERTJES, G. F. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan,

MacroGard(®) and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 847-857, 2013.

ROMEO, C.; CRUCETTI, A.; TURIACO, A.; IMPELLIZZERI, P.; TURIACO, N.; DI BELLA, C.; MERLINO, M.V.; CIFALÀ, S.; BASILE, M.; GENTILE, C.; SALPIETRO, D.C. Monocyte and neutrophil activity after minor surgical stress. **Journal of pediatric surgery**, v. 37, n. 5, p. 741-744, 2002.

RUIZ-HERRERA, J. **Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly**. Boca Raton, EUA: CRC Press, 1992.

RYCHLIK, A.; NIERADKA, R.; KANDER, M.; NOWICKI, M.; WDOWIAK, M.; KOŁODZIEJSKA-SAWERSKA, A. The effectiveness of natural and synthetic immunomodulators in the treatment of inflammatory bowel disease in dogs. **Acta veterinaria Hungarica**. v. 61, n. 3, p. 297–308, 2013.

SCHMITZ, S.; HENRICH, M.; NEIGER, R.; WERLING, D.; ALLENSPACH, K. Comparison of TNF α responses induced by Toll-like receptor ligands and probiotic *Enterococcus faecium* in whole blood and peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 153, n. 1-2, p. 170-174, 2013.

SCHNEEMILCH, C. E.; SCHILLING, T.; BANK, U. Effects of general anaesthesia on inflammation. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 493-507, 2004.

SHEERAN, P.; HALL, G. M. Cytokines in anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 78, p. 201-219, 1997.

SINGH, S.; GAMLATH, S.; WAKELING, L. Nutritional aspects of food extrusion: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 8, p. 916-929, 2007.

SONCK, E.; STUYVEN, E.; GODDEERIS, B.; COX, E. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3-4, p. 199-207, 2010.

STUYVEN, E.; COX, E.; VANCAENEGHEM, S.; ARNOOTS, S.; DEPREZ, P.; GODDEERIS, B. M. Effect of β -glucans on an ETEC infection in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 60–66, 2009.

STUYVEN, E.; VERDONCK, F.; VAN HOEK, I.; DAMINET, S.; DUCHATEAU, L.; REMON, J. P.; GODDEERIS, B. M.; COX, E. Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan to dogs temporally changes total and antigen 1 specific IgA and IgM. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 281-285, 2010.

SUZUKI, I.; HASHIMOTO, K.; OHNO, N.; TANAKA, H.; YADOMAE, T. Immunomodulation by orally administered β -glucan in mice. **International journal of immunopharmacology**, v.11, n.7, p. 761–769, 1989.

TINO, M. S.; CARRIERI, M. L.; ZANETTI, C. R.; MENDES, N. F.; PEREIRA, O. A. Immunomodulatory effect of glucan on the response to experimental antirabies vaccination. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 431-435, 1993.

TWOMEY, L. N.; PLUSKE, J. R.; ROWE, J. B.; CHOCT, M.; BROWN, W.; McCONNELL, M. F.; PETHICK, D. W. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 108, n. 1-4, p. 71-82, 2003.

VÄISÄNEN, M.; LILIUS, E.-M.; MUSTONEN, L.; RAEKALLIO, M.; KUUSELA, E.; KOIVISTO, M.; VAINIO, O. Effects of Ovariohysterectomy on Canine Blood Neutrophil

Respiratory Burst: a Chemiluminescence Study. **Veterinary Surgery**, v. 33, n. 5, p. 551–556, 2004.

VAN BRUGGEN, R.L.; DREWNIAK, A.; JANSEN, M.; VAN HOUDT, M.; ROOS, D.; CHAPEL, H.; VERHOEVEN, A.J.; KUIJPERS, T.W. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. **Molecular immunology**, v. 47, n. 2-3, p. 575-581, 2009.

VETVICKA, V.; VASHISHTA, A.; SARASWAT-OHRI, S.; VETVICKOVA, J. Immunological effects of yeast- and mushroom-derived beta-glucans. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 4, p. 615-622, 2008.

WEISSMANN, C. The metabolic response to stress: an overview and update. **Anesthesiology**, v. 73, n.2, p. 308-327, 1980.

XU, X.; PAN, C.; ZHANG, L.; ASHIDA, H. Immunomodulatory β -Glucan from *Lentinus edodes* Activates Mitogen-activated Protein Kinases and Nuclear Factor- κ B in Murine RAW 264.7 Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n.9, p. 31.194-31.198, 2011.

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**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

APÊNDICE 1. Valores de referência para os parâmetros eritroleucométricos¹.

| Parâmetro | Valor |
|------------------------------------|--------------|
| Hemácias (x10 ⁶ /μL) | 5,5 - 8,5 |
| Hematócrito (%) | 37 - 55 |
| Hemoglobina (g/dL) | 12 - 18 |
| Leucócitos (x10 ³ /μL) | 6 - 18 |
| Eosinófilos (x10/μL) | 120 - 180 |
| Bastonetes (x10/μL) | 0 - 500 |
| Segmentados (x10 ³ /μL) | 3,6 - 13,8 |
| Linfócitos (x10 ³ /μL) | 0,72 - 5,4 |
| Monócitos (x10/μL) | 180 - 1800 |
| Plaquetas (x10 ³ /μL) | 180 - 400 |

¹Feldman; Zinkl; Jain (2000);