

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NO ESTUDO DO
ENVELHECIMENTO DO TRATO GASTROINTESTINAL EM
CÃES**

**Ana Paula Judice Maria
Médica Veterinária**

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NO ESTUDO DO
ENVELHECIMENTO DO TRATO GASTROINTESTINAL EM
CÃES**

Ana Paula Judice Maria

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

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

2013

M332i Maria, Ana Paula Judice
Intervenção nutricional no estudo do envelhecimento do trato gastrointestinal em cães / Ana Paula Judice Maria. -- Jaboticabal, 2013
ix, 63p.; 28cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
Banca examinadora: Lilian Rose Marques de Sá, Luciana Domingues de Oliveira.
Bibliografia

1. Cães. 2. Idade. 3. Imunidade. 4. Nutrição. 5. Butirato. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.34:637.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NO ESTUDO DO ENVELHECIMENTO DO TRATO GASTROINTESTINAL EM CÃES

AUTORA: ANA PAULA JUDICE MARIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE 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

Prof. Dra. LILIAN ROSE MARQUES DE SÁ

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP / São Paulo/SP

Prof. Dra. LUCIANA DOMINGUES DE OLIVEIRA

Universidade de Santo Amaro / São Paulo/SP

Data da realização: 29 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA PAULA JUDICE MARIA, Nascida em 23 de julho de 1983, em Ribeirão Preto, estado de São Paulo, filha de Fausto Maria e Rosa Maria Judice Maria, tornou-se graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em janeiro de 2010. 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 Nutrição e Nutrição Clínica em 2008, sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária - Clínica Médica na mesma instituição em março de 2011, onde atuou na área de Nutrição e Nutrição Clínica de cães e gatos, sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi.

Dedico

Ao meu pai,
pelo exemplo de vida e fraternidade

Ofereço

A minha mãe, irmã e irmãos,
pelo amor e dedicação

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em minha vida e em meu coração. Agradeço a Ele por todos os anjos de luz visíveis e invisíveis que me acompanham nessa caminhada.

Agradeço ao meu pai Fausto Maria, *in memoriam*, pelo exemplo de vida e por todos os ensinamentos deixados.

A minha mãe Rosa Maria Judice Maria, minha eterna amiga e companheira, pelo amor, compreensão e por sempre acreditar nos meus sonhos.

A minha irmã Carla Cristina Judice Maria, pelo amor, carinho e por todo incentivo no caminho da realização pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Fausto Maria Junior e Carlos Eduardo Judice Maria, pela dedicação, amizade e pelos inúmeros momentos de alegria que me proporcionam.

Ao meu orientador Aulus Cavalieri Carciofi, exemplo de dedicação à ciência, por orientar com sabedoria e paciência, e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

A professora Lilian Rose Marques de Sá por sua orientação e disponibilidade, sempre atenciosa e ajudando de forma brilhante neste projeto.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa, Profa. Mirela Tinucci Costa, Prof. Gener Tadeu Pereira, Profa Luciana Domingues Oliveira e a Profa. Lilian Rose Marques Sá pelas importantes contribuições na melhoria deste trabalho.

Ao médico veterinário endoscopista, Franz N. Yoshitoshi, por sua fundamental participação neste estudo. Muito obrigada pela generosa disponibilidade e excelente trabalho exercido na execução deste trabalho.

Aos médicos veterinários anestesistas Ana Paula Gering e Raul Honda pela participação neste estudo. Muito obrigada pelo excelente trabalho e disponibilidade.

A Marcinha pela amizade, dedicação e por toda contribuição nesse estudo, e pela oportunidade de conviver o Kuki e com a Polly, anjinhos de Deus.

A Claudinha e a Elaine pela amizade e carinho, e pelas conversas maravilhosas que contribuíram para o meu amadurecimento.

As minhas amigas Caroline, Renata, Mariana (Brucelinha), Nara, Bruninha, Thailinha, Mayara, Sandrinha, irmãs de coração, pela paciência, companheirismo e

amizade sincera.

Aos novos companheiros de trabalho, Bruna Ponciano, Katiani, Mariana (Preta), Raquel, Mariana (Uréia), Livia e Mari, e aos antigos, Chayanne, Flávio, Fabiano e Leandro, que contribuíram para a realização desse projeto.

A todo o grupo do Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Cães e Gatos, pós-graduandos, estagiários e funcionários, sem ajuda de vocês esse trabalho não seria realizado.

E especialmente aos animais que representam o amor e a perfeição de Deus. Agradeço a Katita, Pérola, Guminha, Nina, Cacau, Kuki, Polly, Pitoco e a Duda sempre companheiros. A todos os cães e gatos do Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Cães e Gatos, em especial aos cães que participaram desse estudo, Graça, Virgilio, Conta, Leo, Leo Jr., Napoleão Jr., Juca, Peri, Luizinho, Ondina, Rímel, Marina, Poulain, Stephanie, Coca, Pepita, Sasha, Manu, Simba, Scooby, Scooty, Sivi, Pepe, Spike, Sheyk, Marley e Joaquim.

À Fapesp pela bolsa de estudo concedida (n° processo Fapesp 2011/05413-6) e pelo auxílio financeiro (n° processo Fapesp 2011/23575-3) para a realização desse projeto.

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”.

SUMÁRIO

Certificado da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE APENDICES.....	lx
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Microbiota intestinal.....	13
2.2. Alterações nas funções e metabolismo do trato gastrointestinal de cães idosos.....	13
2.3. Nutrição do intestino.....	14
2.4. Imunosenescência.....	16
3. OBJETIVO.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Delineamento experimental.....	20
4.3. Dietas experimentais.....	22
4.4. Parâmetros avaliados.....	25
4.4.1. Determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade das fezes.....	25
4.4.2. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, ácido láctico, amônia e aminas bioativas.....	27
4.4.3. Avaliação microbiológica das fezes.....	28
4.4.4. Avaliação da resposta imunológica dos animais.....	30
4.4.5. Análise histológica do intestino delgado e grosso.....	32
4.5. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes.....	36
5.2. Produção e qualidade das fezes e concentração de produtos de fermentação.....	41
5.3. Composição da microbiota das fezes.....	45
5.4. Resposta imunológica dos animais.....	47
5.5. Análise histológica do estômago, intestino delgado e grosso.....	51
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÃO.....	64
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9. APÊNDICES.....	73



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 004542/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeitos da idade e das fontes de proteína e carboidrato sobre a composição da microbiota fecal, produtos de fermentação, morfologia da mucosa intestinal e parâmetros imunológicos de cães"**, 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 03 de Abril de 2012.

Jaboticabal, 03 de Abril de 2012.

Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi
Presidente - CEUA

INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NO ESTUDO DO ENVELHECIMENTO DO TRATO GASTROINTESTINAL EM CÃES

RESUMO – A relação entre o envelhecimento e os componentes da dieta, carboidratos e proteínas, microbiota e produtos de fermentação no intestino, histologia e imunidade intestinal e imunidade sistêmica, são pontos importantes para a nutrição de cães, mas muito pouco estudados. Neste estudo foram analisados os efeitos da idade e das fontes de proteína e carboidrato sobre a digestibilidade dos nutrientes, produtos de fermentação, pH, microbiota e IgA das fezes, parâmetros imunológicos sanguíneos e histologia da mucosa gastrointestinal de cães. O ensaio seguiu esquema fatorial 3 x 2, com três rações e duas idades, gerando seis tratamentos experimentais. Foram empregados três blocos de 12 cães cada, sendo seis cães adultos ($2,6 \pm 0,9$ anos) e seis idosos ($10,2 \pm 1,0$ anos) com duas repetições por tratamento em cada bloco, totalizando seis repetições (cães) por tratamento. As rações experimentais foram: dieta com fibra insolúvel não fermentável a base de cana-de-açúcar (FC) e farinha de vísceras de frango; dieta com 30% de farelo de soja (FS), em substituição a farinha de vísceras de frango; dieta com fibra fermentável e parcialmente solúvel a base de polpa de beterraba (PBe). Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância pelo procedimento MIXED do SAS, considerando-se os efeitos de bloco, animal e ração e suas interações. Médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados de histologia da mucosa do trato digestivo foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn ($P < 0,05$). Na dieta PBe houve interação entre idade e os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), sendo estes menores para os idosos ($P < 0,05$). As contagens de colônias de anaeróbios totais, aeróbios totais, *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium* apresentaram interação idade e dieta ($P < 0,05$). Para estas bactérias cães adultos alimentados com a ração FC tiveram menores contagens que os cães idosos. A maior matéria seca e pH das fezes foram verificados para cães alimentados com a dieta FC ($P < 0,05$), efeito que foi independente de idade ($P > 0,05$). As fezes dos cães alimentados com a dieta FC apresentaram menor valor de ácido acético, e os alimentados com FC e PBe

menores concentrações de ácido propiônico, em relação aos que receberam a dieta FS ($P < 0,05$). Por outro lado, o teor de ácido butírico foi menor nas fezes dos cães alimentados com a dieta FS ($P < 0,05$). Menores contagens de CD5 e CD21 foram verificadas para o grupo idoso ($P < 0,05$), efeito que foi independente da dieta ($P > 0,05$). O consumo de alimento suplementado com FS resultou em maiores quantidades de IgA nas fezes ($P < 0,05$). De maneira geral, os cães idosos alimentados com a ração FC apresentaram aspectos histológicos de discreta gastrite, enterite e colite, caracterizados por linfócitos intraepiteliais e linfócitos e plasmócitos em estômago, intestino delgado e grosso. Os resultados aqui encontrados sugeriram modulação dos produtos de fermentação, dos coeficientes de digestibilidade conforme a dieta empregada e influencia da idade na microbiota intestinal para a dieta FC.

Palavras-chave: cães, idade, imunidade, nutrição.

NUTRITIONAL INTERVENTION IN THE STUDY OF GASTROINTESTINAL TRACT AGING OF DOGS

ABSTRACT - The relationship among carbohydrate and protein in diets, microbiota and fermentation products in the gut, intestinal immunity and systemic immunity are very important matters for dog nutrition, but has not received much attention. This study was conducted to determine the effects of age and sources of protein and carbohydrate on nutrient digestibility (on days 10th to 15th); products of fermentation and fecal pH (on days 16th, 17th and 18th); the fecal microbiota (on day 21st and 22nd); stool IgA (on days 27th, 28th and 29th); immunological blood parameters (on day 30th); and on the intestinal mucosa histology (days 31st and 32nd). The trial was design in a 3 x 2 factorial arrangement with three diets and two ages, totalizing six treatments. Dogs were distributed in three blocks of 12 dogs each, six adult (2.6 ± 0.9 years) and six elderly (10.2 ± 1.0 years), and two replicates per treatment in each block totaling six repetitions (dogs) per treatment. The experimental diets were: diet with insoluble fiber based on sugar cane and flour chicken viscera (SC); diet with 30% of soybean meal (SBM), replacing flour chicken viscera; diet with soluble fermentable fiber based on beet pulp (BeP). Data were evaluated by analysis of variance using the MIXED procedure of SAS, considering the effects of block, animal and diets, and their interactions. Means were compared by Tukey test (P<0.05). Gastrointestinal mucous histology data were submitted to Kruskal-Wallis test and the Dunn's post test (P<0.05). There was interaction between age and apparent digestibility coefficients (ADC) for dogs receiving BeP, elderly dogs had the lower values for CDA (P<0.05). There was also interaction between diet and age for counting colonies of total anaerobic and aerobic bacteria, *Lactobacillus spp* and *Bifidobacterium*. Adult dogs fed SC had the lower counting than elderly dogs. The higher dry matter and pH of feces were verified for dogs fed SC (P<0.05) regardless age (P>0.05). Dogs receiving SC diet showed the lower value of acetic acid and dogs fed SC and BeP lower concentrations of propionic acid compared to animals fed SBM (P<0.05). However, the level of butyric acid was lower for SBM-fed dogs. Minor counting of CD5 and CD21 were observed for elderly dogs (P<0.05) independently of diet

($P>0.05$). The highest value of fecal IgA ($P<0.05$) were found for SBM-fed dogs. In general older dogs fed with SC diet showed histological aspects of mild gastritis, enteritis and colitis, characterized by intraepithelial lymphocytes, lymphocytes and plasmocytes in the stomach, small and large bowel. The present results suggest modulation of the products of fermentation, digestibility coefficients according to diets, and influence of age on intestinal microbiota.

Keywords: dogs, age, immunity, nutrition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Procedimentos realizados durante os períodos experimentais.....	21
Tabela 2	Composição química dos ingredientes empregados na fabricação das rações experimentais.....	23
Tabela 3	Fórmula e composição química analisada das dietas experimentais com diferentes fontes de fibra e proteína.....	24
Tabela 4	Métodos empregados para cultura das bactérias em estudo.....	29
Tabela 5	Características dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo.....	32
Tabela 6	Peso corporal inicial e final de cães de dois grupos etários alimentados com rações com diferentes fontes de fibra e proteína..	36
Tabela 7	Consumo de energia metabolizável em cães de dois grupos etários alimentados com rações com diferentes fontes de fibra e proteína.....	37
Tabela 8	Ingestão de nutrientes durante o ensaio de digestibilidade e coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia das dietas experimentais com diferentes fontes de proteína e fibra fornecidas a cães de dois grupos etários.....	38
Tabela 9	Produção e qualidade das fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína...	42
Tabela 10	Concentração de produtos de fermentação nas fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.....	43
Tabela 11	Contagem microbiana e concentração de produtos de fermentação nas fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.....	46

Tabela 12	Valores de IgA das fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína..	47
Tabela 13	Parâmetros eritroleucometricos e plaquetários de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.....	47
Tabela 14	Subpopulações linfocitárias sanguíneas de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.....	50
Tabela 15	Número de fragmentos coletados e adequação dos mesmos ao exame histológico da mucosa do trato gastrintestinal de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.....	51
Tabela 16	Frequência de diagnósticos dos fragmentos coletados ao exame histológico da mucosa do trato gastrintestinal de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.....	52

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice A. Análise histológica da mucosa do estômago de cães de diferentes idades	73
Apêndice B. Análise histológica da mucosa do intestino delgado de cães de diferentes idades	74
Apêndice C. Análise histológica da mucosa do intestino grosso de cães de diferentes idades	75

1. INTRODUÇÃO

Cães e gatos idosos não possuem necessidades nutricionais específicas que possam claramente os diferenciar de animais adultos em manutenção (NRC, 2006). Dessa forma sua nutrição consiste mais em uma abordagem de bom senso que deve incluir vários aspectos da dieta como sua palatabilidade, forma física (influência direta na apreensão e mastigação), composição nutricional, densidade energética, digestibilidade e o uso de nutrientes e ingredientes para promover saúde e bem estar. A intervenção nutricional nestes animais tem por finalidade prolongar e aumentar sua qualidade de vida, bem como retardar o aparecimento das disfunções e doenças relacionadas ao envelhecimento. Para cumprir com estas metas é importante entender as alterações relacionadas ao avançar da idade, conhecer tais mecanismos é fundamental para se definir as intervenções que realmente possam prolongar a vida do animal e mantê-lo clinicamente saudável por um maior período de sua vida (DAY, 2010). Dentre estas alterações de envelhecimento, as relacionadas ao trato digestório são muito pouco estudadas. Atribui-se a esta faixa etária maior incidência de disbioses, diarreias, constipação e neoplasias. No entanto, um consenso dos mecanismos e causas destas alterações ainda não existe. Mesmo o efeito do envelhecimento na microbiota intestinal é ainda controverso e pouco conhecido.

Importante abordagem alimentar de animais geriátricos refere-se à saúde do trato gastrointestinal. Além de sua reconhecida função em prover nutrientes ao organismo, o trato gastrointestinal é órgão imunológico muito ativo, que tem estrutura complexa e alberga diversos tipos celulares especializados que cumprem papel importante na proteção contra o ambiente externo (CUNNINGHAM-RUNDLES; LIN, 1998). Assim, a dieta deve fornecer adequadamente nutrientes para o trato gastrointestinal, aspecto importante para dar suporte a um bom desenvolvimento e funcionamento deste órgão. A fonte principal de nutrientes para a mucosa intestinal são os compostos absorvidos do lúmen, enquanto a provisão sanguínea de nutrientes assume menor importância no cumprimento dessa função. Estes compostos absorvidos do lúmen advêm dos ingredientes da dieta ou são produzidos

e liberados pela microbiota intestinal. É reconhecido que os microrganismos intestinais cumprem papel essencial na digestão e saúde do intestino (NRC, 2006). Diversos produtos gerados a partir da utilização bacteriana da matéria orgânica, como as aminas e ácidos graxos de cadeia curta, possuem importante função nas células intestinais. Neste contexto, dados de nosso grupo de pesquisa demonstraram menor atividade fermentativa no intestino grosso de cães idosos (GOMES et al., 2011), o que poderia estar correlacionado ao processo de imunosenescência já demonstrado em cães (DAY, 2010). Esta hipótese encontra também reforço na redução de IgA fecal de cães idosos, como também verificado por nosso grupo de pesquisa (ZAINÉ et al., 2011), redução esta que sinaliza menor aptidão imune da mucosa.

Considerando, então, a dinâmica inter-relação entre nutrição, imunidade e microbiota do intestino, é possível que a modulação, por meio da dieta, da microbiota e dos produtos de fermentação gerados no intestino possa melhorar a saúde intestinal e o status imunológico de cães idosos. É reconhecido que as proteínas de origem animal aumentam as concentrações de produtos putrefativos e *Clostridium spp* nas fezes de cães (ZENTEK et al., 2003), enquanto o aumento da ingestão de fibra relaciona-se com maiores contagens de bactérias ácido lácticas benéficas e ácidos graxos de cadeia curta, importante nutrientes para os colonócitos. Deste modo, a investigação e comparação em cães idosos do consumo de proteínas de origem animal ou vegetal, bem como de fibras fermentáveis ou não fermentáveis é importante para se estabelecer corretamente o papel da dieta na microbiota, produtos de fermentação intestinal, estrutura da mucosa intestinal e imunidade destes animais, possibilitando melhor fundamentação da formulação de alimentos para estes animais.

Devido às diferenças descritas em cães adultos e idosos, estas intervenções nutricionais têm que ser testadas em cães idosos. A comparação dos efeitos destas intervenções nas duas faixas etárias permitirá, adicionalmente, se compreender estes aspectos do envelhecimento do sistema digestório, informações importantes em se considerando o aumento da expectativa de vida que tem se verificado para cães.

A substituição de proteína de origem animal por proteína de origem vegetal, na hipótese de trabalho da presente pesquisa representada por farelo de soja, pretende verificar como isto impacta a microbiota, sua função, a estrutura histológica do intestino e a imunidade de cães. A substituição de fibra insolúvel não fermentável (fibra de cana) por fibra fermentável (polpa de beterraba) também tem por objetivo explorar como a microbiota de cães idosos, em comparação com a de adultos jovens se modifica e as consequências destas mudanças sobre a mucosa e a imunidade. Sendo assim, os ingredientes em estudo, a polpa de beterraba e o farelo de soja, são modelos de intervenção nutricional para o entendimento do impacto da senectude no intestino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbiota intestinal

A microbiota intestinal cumpre papel importante no processo de digestão e metabolismo do hospedeiro, provendo ainda mecanismo de defesa natural contra os patógenos invasores (NRC, 2006). Embora a microbiota de cães adultos tenha sido estudada, pouco é conhecido sobre as mudanças que acontecem com o avançar da idade (SIMPSON et al., 2002; GOMES et al., 2011). Estas alterações, se presentes, podem ter consequências importantes para cães e gatos idosos, especialmente para os que são submetidos à terapia antibiótica e que são mais suscetíveis à *disbiose* (desequilíbrio da microbiota intestinal). A microbiota intestinal de cães adultos jovens contem maior número de bacteróides, bifidobactéria, lactobacilos e coccus anaeróbios, enquanto animais mais velhos abrigam maiores números de clostridia e enterococcus (HOPKINS et al., 2001). Porém, alguns estudos acharam resultados contraditórios, como maior número de lactobacilos e bacteróides em cães velhos (KEARNS et al., 1998) ou mesmo ausência de efeito da idade na microbiota das fezes (GOMES et al., 2011).

As causas de alteração na composição da microbiota intestinal de cães com a idade avançada ainda são incertas. Hopkins et. al (2001) sugeriram que algumas cepas bacterianas pudessem tirar proveito de novos nichos ecológicos, induzindo assim troca na composição da microbiota intestinal. Foi proposto que a adesão reduzida à mucosa possa ser fator envolvido na menor colonização por algumas espécies de bifidobactérias em indivíduos velhos (SAUNIER; DORÉ, 2002). Esta troca na comunidade bacteriana do intestino grosso pode ter grandes efeitos na fisiologia e metabolismo do hospedeiro.

2.2. Alterações na função e metabolismo do trato gastrointestinal de cães idosos

Estudos sobre as alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento em cães e gatos tornaram-se mais frequentes nas últimas duas décadas, talvez como resultado do recente aumento na expectativa de vida destes animais. Embora muitos cães permaneçam ativos na sua maturidade, a maioria se torna menos ativo e pode mostrar sinais do envelhecimento a partir dos seis ou sete anos (LAFLAMME, 2005). A fisiologia e a função do intestino também são alteradas durante o envelhecimento, o que é frequentemente acompanhado por maior incidência de infecções no órgão. Seres humanos idosos apresentam aumento do tempo de trânsito intestinal, alterações na atividade enzimática, circulação prejudicada e secreções biliar e pancreática reduzidas (HARPER, 1998a). Não existe consenso sobre se essas alterações acometem ou não cães e gatos idosos. Em gatos idosos as alterações na função do trato gastrointestinal relacionam-se, principalmente, à diminuição na digestibilidade de nutrientes como proteína, gordura e amido (PÉREZ-CAMARGO, 2004; TESHIMA et al., 2010). Em cães idosos, por outro lado, não se verifica redução da digestibilidade dos nutrientes (SHEFFY et al., 1985; GOMES, et al., 2011). Outras alterações do trato digestório de cães idosos são aumento da ocorrência de doença periodontal, dificuldade em apreensão e mastigação, frequência aumentada de diarreia, vômito e regurgitação (KIRK et al., 2000). Um único estudo verificou as alterações histológicas na mucosa intestinal decorrentes do envelhecimento em cães, os animais idosos parecem apresentar maior profundidade das criptas no intestino grosso (KUZMUK et al., 2005), no entanto dados complementares são necessários para se compreender melhor este aspecto.

2.3. Nutrição do intestino

O intestino apresenta alta demanda por nutrientes que deve ser atendida pela dieta. A mucosa intestinal possui as taxas mais altas de proliferação e renovação celular de todo o corpo. Este processo pode representar de 10 a 20% da necessidade energética diária e até 50% da de proteína (ROEDIGER, 1990). Proteína, arginina, glutamato, glutamina, glutatona, glicina, histidina, vitamina A,

zinco, ácidos graxos, entre outros, são nutrientes fundamentais para a mucosa intestinal (ZIEGLER et al., 2003) e devem ser fornecidos adequadamente pela dieta para assegurar o desenvolvimento correto das funções de digestão e imunológicas do intestino.

O conceito de "saúde intestinal" é complexo e incompletamente definido. De acordo com Conway (1994), três componentes principais devem ser considerados: dieta, mucosa intestinal e microbiota intestinal. A morfologia da mucosa intestinal muda de acordo com a dieta, estresse, envelhecimento e doenças. Estas mudanças podem afetar a fisiologia do intestino, influenciando a absorção e metabolização de nutrientes. Estudando os efeitos da idade e da dieta, Kuzmuk et al. (2005) observaram respostas fisiológicas e morfológicas diferentes entre cães jovens (1 a 2 anos) e idosos (11 a 12 anos) quando alimentados com dieta baseada em produtos de origem vegetal ou animal. A altura das vilosidades do jejuno era maior em cães jovens que consumiram a dieta baseada em produtos vegetais, tanto em comparação com os cães jovens que consumiram dieta baseada em produto animal como em relação aos cães idosos que receberam as duas dietas. Desta forma, é possível que com o envelhecimento as respostas intestinais aos alimentos mudem nos cães, o que mereceria novos estudos.

Carboidratos fermentáveis podem ser considerados parte importante da "nutrição do intestino". Estes incluem alguns tipos de fibras, amido resistente, polissacarídeos não-amiláceos como os mananoligossacarídeos, frutoligossacarídeos, estaquiase e rafinose e açúcares não absorvidos que alcançam o cólon estando disponíveis para a fermentação bacteriana. Eles favorecem adequado fornecimento de matéria orgânica para o intestino grosso (DROCHNER; MEYER, 1991). A fermentação bacteriana destes compostos resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e consequente redução do pH, que pode modificar a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal (CAMPBELL et al., 1997). Os AGCC, em especial o butirato, são fontes de energia importantes para os colonócitos (NRC, 2006), auxiliando a absorção de íons, fluxo sanguíneo intestinal e peristaltismo. A presença destes carboidratos também reduz a quantidade de resíduos de compostos nitrogenados que entram na circulação sanguínea. Em um estudo com cães, fibras fermentáveis promoveram melhor

desenvolvimento da mucosa do cólon, maiores relação entre volume e superfície do cólon e melhora na estrutura histológica da mucosa (HALLMAN et al., 1995). A atividade fermentativa intestinal parece estar diminuída em cães idosos, Gomes et al. (2011) verificaram menor pH e concentrações reduzidas de butirato e das aminas biogênicas agmatina, histamina e espermina nas fezes dos cães idosos. Estas alterações podem se relacionar a um pior suporte nutricional à mucosa, que poderia com isto ter alterações em sua estrutura ou função. Esta hipótese merece estudo, mas ainda não foi explorada em cães.

A fermentação microbiana de aminoácidos não digeridos, por outro lado, resulta na produção de diversos compostos de putrefação. Estes incluem a amônia, que resulta da desaminação dos aminoácidos, fenóis, indóis (produtos de descarboxilação de amina aromáticas), ácidos graxos de cadeia ramificada e várias aminas biogênicas, tais como putrescina, cadaverina, histamina, feniletilamina, entre outros. Os catabólitos da proteína não só resultam em mau odor das fezes, mas podem também ser tóxicos em altas concentrações (KUZMUK et al., 2005). As aminas biogênicas podem causar desnaturação ou efeitos tóxicos quando produzidas em grande quantidade. Um exemplo destes efeitos, observado em humanos, é enxaqueca e crise hipertensiva. A intoxicação alimentar causada por produção excessiva de histamina provoca efeitos cutâneos, gastrintestinais, hemodinâmicos e neurológicos. Considerando que os produtos putrefativos de proteína e mesmo o *Clostridium spp* têm sua produção aumentada em cães alimentados com dietas ricas em proteína de origem animal (ZENTEK et al., 2003), o estudo de intervenções incluindo o consumo de proteínas vegetais e fibra fermentável para cães idosos pode fornecer informações importantes para se mitigar estes efeitos nocivos potenciais.

2.4. Imunosenescência

O trato gastrointestinal é o maior órgão linfóide do corpo, desempenhando papel importante tanto na imunidade local quanto sistêmica. Suas ações imunes

incluem: bloqueio de patógenos, modulação da resposta imune; mecanismos de tolerância oral (KLEINSCHMIDT et al., 2008). O sistema imune da mucosa do trato gastrointestinal de cães consiste de estruturas linfóides organizadas, incluindo as placas de Peyer, os linfonodos mesentéricos e as células linfóides da lâmina própria intestinal (STOKES; WALY, 2006). A última é povoada por células, incluindo linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, células dendríticas e eosinófilos (GERMAN et al., 1999). O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é responsável pelas seguintes atividades: a) captura, processamento e apresentação de antígenos ingeridos; b) produção de anticorpos locais, especialmente IgA; c) ativação da resposta imune mediada, particularmente aquelas mediadas por células T citotóxicas, CD8+ ou NK (células natural killer) e macrófagos (SILVA, 2006).

Os efeitos do processo de envelhecimento sobre o sistema imune de cães e gatos foram recentemente revisadas por Day (2010). Resumidamente, estas incluem diminuição na resposta proliferativa das células mononucleares do sangue, declínio no número de linfócitos periféricos, redução de linfócitos T CD4+ (T helper), aumento relativo no percentual de células T CD8+ (natural killer), com diminuição da relação CD4+: CD8+. Estas alterações em linfócitos do sangue periférico parecem ocorrer também no interior da lâmina própria intestinal do cão em envelhecimento, com redução do número de células T e menor atividade proliferativa das populações de células intestinais (Day, 2010). No entanto, apenas um estudo foi localizado neste sentido e a dieta empregada foi imprecisamente descrita, sendo necessárias mais pesquisas em cães idosos.

Especula-se que estas alterações imunológicas associadas ao intestino em cães idosos estejam associadas, ao menos parcialmente, às alterações na microbiota intestinal relatadas nestes animais (Day, 2010). O aumento do número de bactérias aeróbias e anaeróbias em amostras de fezes de cães idosos, especialmente de clostrídios, em comparação com as amostras de fezes de cães jovens pode ser um dos fatores causadores das alterações imunológicas. Estudos recentes demonstram aumento significativo na concentração fecal de patógenos, ou de espécies bacterianas indesejáveis com o avançar da idade de animais de companhia (HUSSEIN; SUNVOLD, 2000).

Considerando a relação entre microbiota, produtos de fermentação e estrutura e função do intestino, é possível que alterações nos macronutrientes da dieta, como proteína e carboidratos possam modificar a microbiota e sua atividade, com reflexos sobre a estrutura histológica da mucosa intestinal e sua função. Estas modificações, por sua vez, podem refletir-se sobre o status imunológico dos cães, com benefícios à saúde. Como cães idosos apresentam mudanças de microbiota, produtos de fermentação e estruturais na mucosa intestinal, é razoável a hipótese de que estes reajam de modo diferente do que os cães adultos jovens às mudanças alimentares, que precisam ser então testadas e avaliadas nesta faixa etária.

3. OBJETIVOS

Considerando o exposto, este projeto explorou a intervenção nutricional como promotora de saúde e sua possibilidade em amenizar os efeitos do envelhecimento no trato intestinal. Foram objetivos específicos avaliar a digestibilidade aparente dos nutrientes, caracterizar a microbiota fecal, os produtos finais de fermentação bacteriana, a morfologia da mucosa intestinal e a imunidade local e sistêmica de cães beagle adultos e idosos, mediante consumo de dietas a base de proteína animal ou vegetal e com fibras de diferentes graus de fermentação e solubilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.

O protocolo experimental realizado no presente estudo está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP – Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 004542/12).

4.1. Animais

Foram empregados 36 cães beagles divididos em dois grupos etários, um grupo de 18 animais adultos com idade média de $2,6 \pm 0,9$ anos e peso corporal médio de $11,05 \pm 1,2$ Kg, e um grupo de 18 cães idosos com idade média de $10,2 \pm 1,0$ anos e peso corporal médio de $11,8 \pm 2,1$ Kg. Todos os cães passaram por avaliação física, hematológica (hemograma, função renal e hepática) e foram vermifugados, sendo considerados hígidos para o experimento. Estes foram provenientes do canil experimental do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos.

4.2. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido com os tratamentos em esquema fatorial 3×2 , sendo três rações e duas idades, gerando seis tratamentos experimentais. Foi

adotado delineamento em blocos casualizados, com três blocos de 12 cães, sendo seis cães adultos e seis idosos com duas repetições por tratamento em cada bloco, totalizando seis repetições (cães) por tratamento. O fator de bloco foi o período. Cada bloco experimental teve duração de 32 dias e ficou estruturado conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Procedimentos realizados durante os períodos experimentais

Etapa	Dias do período experimental	Procedimentos realizados
1	1 a 10	Adaptação à dieta
2	11 a 15	Coleta total de fezes para ensaio de digestibilidade
3	17 a 19	Coleta de fezes frescas para análise de ácidos graxo de cadeia curta e ramificada, aminas biogênicas, amônia, lactato e pH das fezes
4	21 a 22	Coleta de fezes frescas para análise microbiológica das fezes
5	27 a 29	Coleta de fezes frescas para dosagem de IgA fecal
6	30	Coleta de sangue para realização de hemograma e imunofenotipagem de linfócitos
7	31 a 32	Coleta de fragmentos da mucosa do estômago, intestino delgado e grosso por endoscopia e colonoscopia

Durante os períodos de adaptação à dieta e após a coleta total de fezes para análise de digestibilidade os animais ficaram alojados em duplas, em baias com solário de 1,5m por 3,5m. Durante o período de coleta de fezes para digestibilidade os animais permaneceram em gaiolas metabólicas individuais em inox, com 0,9m x 0,9m x 0,9m. A quantidade de ração fornecida foi calculada de acordo com a estimativa da energia metabolizável do alimento, com base em sua composição química e a necessidade energética do animal, pela equação $130\text{kcal/kg}^{0,75}$ (NRC, 2006). A quantidade total de alimento do dia foi dividida em duas refeições iguais, disponibilizada aos animais às 9hs e 17hs. Após 30 min do fornecimento das dietas

as sobras eram recolhidas e pesadas, registrando-se o consumo. A cada 10 dias os animais foram pesados e a quantidade de alimento fornecida ajustada para manterem o peso corporal constante. A água foi fornecida ad libitum durante todo o período experimental. O ambiente em que os animais permaneceram apresentava iluminação natural e artificial, mantendo-se um ciclo claro: escuro de 12: 12hs.

4.3. Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas para que melhor se adequassem às necessidades do experimento. Foram formuladas três rações com teores nutricionais semelhantes, de acordo com as recomendações para manutenção de cães da FEDIAF (2008). A ração fibra insolúvel não fermentável teve por base milho, farinha de vísceras de frango e fibra de cana de açúcar (FC), ingrediente composto por fibra insolúvel não fermentável. Para avaliar o efeito da fermentabilidade da fibra, foi empregada ração de fibra solúvel fermentável, que teve por base milho, farinha de vísceras de frango e polpa de beterraba (PBe), ingrediente que apresenta mais fibra solúvel e de moderada fermentação. Para avaliar o efeito da fonte de proteína e tipo de carboidrato foi empregada ração com 30% de farelo de soja (FS), este entrou em substituição parcial a farinha de vísceras de frango, agregando proteína vegetal e os oligossacarídeos e fibra da soja. A composição química das fontes de fibra e das fontes proteicas empregadas no experimento encontra-se na Tabela 2. Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, de modo a não permitir variabilidade na composição dos mesmos. Previamente à confecção das dietas, os ingredientes foram analisados para umidade, proteína bruta, extrato etéreo e fibra dietética total. Com base nestes resultados as dietas foram então formuladas (Tabela 3).

Para a fabricação das rações os ingredientes foram moídos em moinho de martelos (Model 4, D'Andrea, Limeira, Brazil) com peneira com crivos de 0,6 mm e as rações extrusadas em extrusora Tipo MAB 400S, com capacidade de processamento de 150 quilogramas de ração/hora, na Fábrica de Rações da

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal. 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.

Tabela 2. Composição química dos ingredientes empregados na fabricação das rações experimentais. Valores sobre a matéria original.

Item	Farinha de víscera de frango	Farelo de soja	Fibra de cana	Polpa de beterraba
Matéria seca (%)	92,3	87,7	97,5	89,8
Proteína bruta (%)	61,2	53,4	1,3	7,7
Fibra dietética total (%)	-	26,6	90,7	75,1
Extrato etéreo (%)	11,2	2,4	1,2	1,5

Tabela 3. Fórmula e composição química analisada das dietas experimentais com diferentes fontes de fibra e proteína.

Ingredientes	Dietas ¹		
	FC	PBe	FS
Milho grão	29,34	25,45	24,0
Farinha de vísceras de frango	33,58	35,57	11,2
Quirera de arroz	20,00	20,00	20,00
Farelo de soja	-	-	30,00
Polpa de beterraba	-	10,36	-
Fibra de cana de açúcar	8,30	-	-
Gordura de aves	5,44	5,28	8,62
Palatabilizante	2,00	2,00	2,00
Cloreto de potássio	0,40	0,40	0,40
Sal comum	0,40	0,40	0,40
Premix mineral/vitamínico ²	0,30	0,30	0,30
Cloreto de colina	0,10	0,10	0,10
Antifúngico ³	0,10	0,10	0,10
Antioxidante ⁴	0,04	0,04	0,04
Calcário	-	-	0,75
Fosfato bicálcico	-	-	2,09
Composição química das dietas. Valores sobre a matéria seca			
Matéria Seca (%)	95,2	93,5	94,6
Matéria Mineral (%)	10,5	9,5	8,7
Proteína Bruta (%)	28,6	30,5	28,3
Extrato Etéreo Hidrólise Ácida (%)	12,3	11,4	11,2
FDI (%)	14,2	12,5	10,5
FDS (%)	0,0	1,2	0,8
Fibra Dietética Total (%)	11,90	13,7	11,30
Amido (%)	33,6	33,6	35,3
Energia bruta (kcal/kg)	4672	4763	4721
Parâmetros de processo			
Densidade (g/L)	380	410	380
Índice de gelatinização do amido (%)	86,7	87,6	88,5

¹ FC: dieta com cana e farinha de vísceras de frango. PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

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, Piroxidina 6 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,1 mg;

³ Mold Zap Aquativa, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda: propionato de amônio, propanodiol, ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido fórmico, sorbato de potássio, veículo q.s.p;

⁴ Banox, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda: BHA, BHT, galato de propila e carbonato de cálcio.

4.4 Parâmetros avaliados

4.4.1. Determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade das fezes.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e a energia metabolizável das dietas foram determinados pelo método de coleta total de fezes sem coleta de urina AAFCO (2010). Os animais passaram por período de adaptação de dez dias, seguidos de cinco dias de colheita quantitativa de fezes e urina. Estes foram alimentados duas vezes ao dia, as 9:00hs e as 17:00hs, e o alimento ficou disponível por 30 minutos. A quantidade de alimento fornecida foi suficiente para atender sua demanda energética de manutenção (NRC, 2006). Os comedouros foram removidos das gaiolas após 30 minutos e as sobras pesadas, de modo a se quantificar o consumo. Água foi fornecida a vontade. Durante o período de coleta de fezes os animais alojados em gaiola de metabolismo individuais, em aço inoxidável, com dimensões de 90cm x 100cm x 90cm, equipadas com aparatos para coleta separada de fezes e urina

Fezes foram recolhidas durante 120 horas duas vezes ao dia, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. Ao final do período de coleta, as fezes foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal e período, estas foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo, Brasil) a 55 °C durante 72 horas.

Fezes pré-secas e as rações foram moídas em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo), com peneira de 0,8mm, para proceder-se às análises laboratoriais. Nas fezes e rações foram determinados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA) e matéria mineral (MM) segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995). O método de Prosky et al. (1992) foi usado para a determinação da fibra dietética total nas rações e fezes. As quantidades de amido das rações e fezes foram determinadas de acordo com o método de Miller (1959) e Hendrix (1993). A Energia Bruta foi determinada em

bomba calorimétrica (1281, PARR Instruments, EUA). Para sua realização, amostras de fezes e rações foram peletizadas e pesadas. Adicionalmente, no alimento foram determinados cálcio e fósforo segundo metodologia da AOAC (1995), e foram realizadas no Laboratório de Química Analítica, do departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, campus de Jaboticabal. Todas as análises laboratoriais foram conduzidas em duplicata, sob um coeficiente de variação menor de 5%.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os CDA da matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, extrato etéreo hidrólise ácida, amido e energia bruta, de acordo com procedimentos de cálculo estabelecidos pela AAFCO (2010). A energia metabolizável foi calculada considerando os valores de energia digestiva e proteína digestível das dietas. Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (CDAN) foram calculados com a seguinte fórmula, segundo Pond et al. (1995):

$$\text{CDAN (g/kg)} = \frac{\text{Nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)}}{\text{Nutriente ingerido (kg)}}$$

Foram avaliadas, também, a produção e qualidade das fezes. A matéria seca das fezes foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{MS fecal} = \frac{1^{\text{a}} \text{ MS} \times 2^{\text{a}} \text{ MS}}{100}$$

Sendo que: - →1ª MS = matéria seca a 55 °C das fezes *in natura*;

→2ª MS = matéria seca a 105 °C das fezes secas a 55°C;

A qualidade das fezes dos cães foi avaliada empregando-se sistema de escore fecal com notas de 0 a 5, sendo: 0 para fezes líquidas; 1 para fezes pastosas e sem forma; 2 para fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 para fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 para fezes bem formadas e consistentes, que não marcam o piso (escore ideal); 5 para aquelas também bem formadas, mas duras e ressecadas. Consideram-se

normais os valores entre 3 e 4 (Carciofi et al., 2008). Foi determinada, também, a produção de fezes por cão por dia em matéria seca e em material natural.

4.4.2. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, ácido láctico, amônia e aminas bioativas das fezes

O pH das fezes dos cães foi determinado nos dias 17º, 18º e 19º. Para determinação do pH 2,0 gramas de fezes frescas foram diluídos em (1:10 p/v) em água miliq e o pH medido em ph-metro de precisão 0,01 pH (modelo DM20, Digicrom Analítica Ltda, São Paulo).

Para as análises dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) foram coletadas nos mesmos dias da avaliação de pH 10 gramas de fezes frescas (coletadas no máximo 10 minutos após a defecação). Estas foram homogeneizadas e misturadas com 30 mL de ácido fórmico 4.2 N (1:3 p/v). Posteriormente a mistura foi centrifugada a 4.500 G durante 15 minutos a 15°C por três vezes, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Após a extração as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

As amostras de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foram encaminhadas para o Laboratório de Bromatologia de Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) e ácidos graxos de cadeia ramificada (isovalérico, isobutírico e valérico) foram determinadas por cromatografia gasosa (Finningan, modelo 9001, Finningan Corporation, San Jose, EUA) de acordo com ERWIN et al. (1961), sendo a coluna de vidro de 2 metros de comprimento, diâmetro de 1/8”, empacotada com 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax 20M. O cromatógrafo foi calibrado por meio da injeção de 1 µL de solução padrão misto e a curva pré-estabelecida no software BORWIN versão 1.21.60. Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste (vazão de 25 mL/min.), oxigênio como gás comburente (vazão de 175 mL/min.) e hidrogênio como

gás combustível (vazão de 15 mL/min.), com temperaturas de operação de 220°C no injetor, 210°C na coluna e 250°C no detector de ionização de chama.

Para a determinação de ácido láctico foram empregados cerca de três gramas de fezes colhidas como descrito para AGCC. Estas foram rapidamente homogeneizadas e misturadas à 9 mL de água destilada (1:3 p/v). Esta mistura foi mantida sob refrigeração por um dia, sendo, então, centrifugada por três vezes a 4.500 G à 15°C, por 15 minutos, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. A análise foi realizada de acordo com Pryce (1969) pelo método espectrofotométrico com leitura a 565 nm (500 a 570nm). Foi utilizado branco reagente para calibrar o espectrofotômetro (QUICK - Lab marca DRAKE, São José do Rio Preto, São Paulo). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0.08%.

Para medir a concentração de NH₃ fecal foi adaptada a metodologia de Vieira (1980). Foram utilizados os extratos preparados para dosagem de AGCC. Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e em seguida alíquotas de 2 mL foram diluídas em 13 mL de água destilada (2:13 v/v) e submetidas à destilação em um destilador de nitrogênio (Tecnal TE - 036/1, Piracicaba, Brasil). A destilação foi realizada com 5 mL de solução 0.2N de hidróxido de potássio e o nitrogênio recebido em um erlenmeyer com 10 mL de solução receptora (ácido bórico a 0.97 N). Ao atingir-se 50 mL de solução receptora mais material destilado foi interrompida a destilação. Em seguida foi realizada a titulação com ácido clorídrico 0.005N.

4.4.3. Avaliação microbiológica das fezes

Amostras de fezes frescas foram colhidas no 21° e 22° dias, mantidas em pote coletor universal estéril e levadas para procedimento analítico com no máximo 30 minutos após sua coleta, de forma a se manter a viabilidade dos microrganismos. No Laboratório de Microbiologia Aplicada à Zootecnia, da FCAV Unesp, de cada amostra de fezes foram pesadas 10 gramas, homogeneizadas, diluídas em série com água salina estéril até 10⁻⁸ e, logo após, semeadas para contagem dos microrganismos utilizando-se de meios e condições apropriadas para cada tipo de bactéria, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos empregados para cultura das bactérias em estudo.

Bactéria	Meio de cultura	Fabricante	Condições de incubação *
Aeróbios totais	Plate Count Agar (PCA)	Acumedia	A, 37°C, 24 h.
Anaeróbios totais	Plate Count Agar (PCA)	Acumedia	AN, 37°C, 24 h.
Bifidobacterium	Bifidobacterium Agar	Himedia	AN, 37°C, 24 h.
Clostridium	Reinforced Clostridium Agar	Oxoid	AN, 37°C, 48 h.
Lactobacillus	Man Ragosa Sharpe (MRS)	Acumedia	AN, 37°C, 72 h.
Escherichia coli	Agar MacConkey	Acumedia	A, 37°C, 24 h.

* Necessidade de oxigênio, temperatura e tempo de incubação. Legenda: A = aerobiose, AN = anaerobiose.

A contagem total, em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g de fezes na matéria seca), de cada um dos gêneros em estudo foi realizada pela técnica de contagem padrão em placas. As diluições foram semeadas em duplicatas em placas de petri descartáveis pela técnica de pour plate e incubadas conforme a sua necessidade de oxigênio. As bactérias aeróbias (Escherichia coli e aeróbios totais), após semeadura foram incubadas a 37°C, em aerobiose, por 24 a 48 horas. As bactérias anaeróbias (Lactobacillus, Bifidobacterium e anaeróbios totais) foram incubadas em jarras de anaerobiose com o sistema gás-pack a 37°C por 24 a 72 horas. Para o gênero Clostridium as amostras, nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , foram submetidas a choque térmico prévio a semeadura, para ativar a germinação dos esporos e destruir contaminantes não esporulados, que consistiu em mantê-las em banho-maria a 80°C por 10 minutos, seguido por resfriamento em água com gelo por mais 10 minutos. Após este procedimento as amostras foram semeadas em placas e incubadas como descrito anteriormente. Após incubação foram realizadas a contagem das placas, e cinco colônias típicas serão submetidas a esfregaços corados pelo método de Gram para confirmação das características morfológicas de cada gênero.

4.4.4. Avaliação da resposta imunológica dos animais

Esta incluiu a quantificação da secreção intestinal de IgA, indicativa da imunidade de mucosa e a imunofenotipagem de linfócitos sanguíneos. Para a dosagem do anticorpo IgA amostras de fezes frescas (até 15 minutos após eliminação) foram colhidas nos dias 27, 28 e 29 e armazenadas em freezer (-20°C). Para a análise estas foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra por animal. A extração de IgA fecal foi realizada por extração salina de acordo com Peters et al. (2004). Foi pesado quantitativamente um grama da amostra (peso úmido). Esta amostra foi adicionada a solução composta por PBS (0,01M; pH 7,4), 0,5% tween 80 e 0,05% de azida sódica, com posterior homogeneização. A suspensão foi centrifugada a 1500G por 20 minutos à 5°C. Uma porção do sobrenadante, 2ml, foi transferida a um tubo de cônico de 5,0ml contendo 20 microlitros de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), sendo, então, a amostra homogeneizada e depois centrifugada a 15.000G por 15 minutos à 5°C e o sobrenadante transferido a um tubo estéril e armazenado em freezer (-20°C) até quantificação da IgA. Para a quantificação da concentração total de IgA no extrato de fezes foi empregado um kit de ELISA específico para IgA canina (Bethyl laboratories, Montgomery, USA), segundo recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology, Chantilly, Virginia, EUA) usando filtro de 450 nm, no Laboratório de Imunologia e Virologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária Unesp – Jaboticabal.

Para a realização da análise citofluorométrica do sangue periférico e dos parâmetros eritroleucométricos e plaquetários, foram utilizadas amostras de sangue coletadas por venipunção da jugular e colocadas em tubos de ensaio com anticoagulante, nos dias zero e 30 de cada bloco experimental. As contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, taxa de hemoglobina, volume globular ou hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram analisados por um contador veterinário automático de células ABC Vet (Horiba ABX Brasil, São Paulo). A contagem diferencial e a avaliação de leucócitos foi realizada utilizando microscopia

ótica de esfregaços sanguíneos, corados com uma mistura de Metanol – May Grunwald – Giemsa (MGG).

Os cães foram submetidos à avaliação quantitativa de células CD5+, CD5+CD4+, CD5+CD8+, CD21+ no sangue periférico, por imunofenotipagem dos linfócitos, esta foi obtida por citometria de fluxo (Tabela 5). Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a coleta do sangue. Para tanto as alíquotas do sangue periférico foram devidamente processadas e encaminhadas ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade do Estado de São Paulo.

O método para a avaliação citofluorométrica consistiu, inicialmente, na identificação de seis tubos estéreis para cada animal (tubo 1 – somente células, tubo 2 – IgG1FITC/IgG2aPE, tubo 3 - CD5FITC/CD4PE , tubo 4 – CD5FITC/CD8PE, tubo 5 - CD21PE. A cada tubo foi adicionado 100µL de sangue com anticoagulante. Então, adicionaram-se 2µL dos respectivos anticorpos, conforme esquema:

1. Só células: não foi 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: Bcells (CD21).

Após isto, as amostras foram homogeneizadas em vortex, e os tubos incubados por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Um mililitro de solução 1:10 do tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado em cada tubo, seguido da homogeneização e incubação por mais dez minutos à temperatura ambiente protegidos de luz. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M e pH de 7,4 (PBS) por três vezes. A lavagem consistiu na centrifugação a 1800 rpm por três minutos, desprezando o sobrenadante e adicionando dois mililitros de PBS. Depois de desprezado o sobrenadante após a última lavagem, adicionou-se 250 µL de PBS a 1% de formol nos cinco tubos e as amostras foram submetidas à análise no citofluorômetro (FACSCanto, Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, EUA). Utilizou-se o programa FACSDiva (Becton Dickinson, San

Jose, CA) para classificação e contagem das subpopulações linfocitárias. As porcentagens de células foram aplicadas às contagens de leucócitos e linfócitos do hemograma para obter os valores absolutos.

A relação CD4:CD8 foi também calculada, dividindo-se, individualmente, as contagens de CD5+CD4+ pelas de CD5+CD8+. Os anticorpos utilizados para determinar as subpopulações linfocitárias estão listados na Tabela 5. Todos eles são específicos para cães, obtidos de ratos ou camundongos.

Tabela 5. Características dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo.

Molécula	Fluorescência	Anticorpo Monoclonal	Tipo celular	Fabricante
γ1	PE	MCA1123PE	Isotipo controle	AbD Serotec
γ2	FITC	MCA1212FITC	Isotipo controle	AbD Serotec
CD5	FITC	MCA1037FITC	Linfócitos T totais	AbD Serotec
CD4	PE	MCA1038PE	Linfócitos T <i>helper</i>	AbD Serotec
CD8	PE	MCA1039PE	Linfócitos T citotóxicos	AbD Serotec
CD21	PE	MCA1781PE	Linfócitos B	AbD Serotec

4.4.5. Análise histológica dos segmentos do trato gastrointestinal: intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e grosso (ceco e cólon).

Para a realização da análise histológica dos fragmentos de mucosa do intestino delgado e grosso os animais foram anestesiados para realização da endoscopia e colonoscopia. O procedimento anestésico estabelecido foi realizado com os animais em jejum prévio de 12h, como medicação pré-anestésica foi utilizado clorpromazina (Sanofi-Aventis farmacêutica Ltda, Suzano, Brasil) na dose de 1,0 mg/kg por via intramuscular, após a sedação foi realizada a indução anestésica com propofol (Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil) na dose 5,0 mg/kg, administrado lentamente por via intravenosa. Após o relaxamento

da mandíbula e a perda do reflexo laringotraqueal foi realizada a intubação endotraqueal com sonda traqueal de tamanho apropriado para cada animal. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano (Virbac do Brasil Saúde Animal, Jurubatuba, Brasil) em concentração suficiente para manter o animal em plano anestésico.

Para o procedimento de biópsia por endoscopia digestiva alta e baixa os animais ficaram em decúbito lateral. Foi empregado endoscópio flexível (Karl Storz, 60914NKS, Karl Storz GmbH & Co. KG, Alemanha) e pinça de biópsia tipo boca de jacaré de 2,2mm (Karl Storz, 60252LX, Karl Storz GmbH & Co. KG, Alemanha). Foram retirados dois fragmentos da mucosa do estômago, doze fragmentos da mucosa do intestino delgado (quatro da mucosa do duodeno, quatro fragmentos da mucosa do jejuno e quatro fragmentos da mucosa do íleo), e doze fragmentos da mucosa do intestino grosso (quatro fragmentos da mucosa da válvula íleo ceco cólica e oito da mucosa do cólon) de cada animal. Após o procedimento os animais foram assistidos até a recuperação total da anestesia. Os fragmentos coletados foram fixados em formol 10% tamponados e processados segundo técnica padrão com inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes seriados de 4µm e os fragmentos corados por hematoxilina e eosina (HE).

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. O exame microscópico foi realizado por um observador sem acesso a qualquer informação sobre a identificação e as características de cada animal usado no experimento. O padrão de normalidade histológica considerado foi o mesmo descrito por Day et al. (2008). O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz, utilizando microscópio óptico (Zeiss, modelo Primo Star, Thornwood, EUA) acoplado a câmara digital (PowerShot G10, Canon, São Paulo, Brasil) e *software* zoomBrowser (versão EX 6.2, São Paulo, Brasil) para captura de imagens.

Os fragmentos foram analisados primeiramente quanto à adequação da biópsia, sendo para isto, graduados de zero a dois quanto à qualidade, sendo zero para fragmentos inapropriados para análise e dois para fragmentos adequados. As variáveis avaliadas semiquantitativamente foram: relação vilos:cripta, presença e intensidade da hiperplasia da cripta, dilatação da cripta, grau de ocorrência das

células caliciformes, frequência e grau de intensidade de diferentes tipos de células inflamatórias na lâmina própria, número de linfócitos intraepiteliais (SÁ, 2004).

A intensidade das células inflamatórias foram graduadas em 0 (ausência), 1 (discreto número), 2 (moderado infiltrado) e 3 (marcante infiltrado). A intensidade dos demais processos foi avaliada na escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro do padrão de normalidade, 1 = discreta alteração, 2 = moderada e 3 = marcante (SÁ, 2004).

4.5. Análise estatística

O arranjo dos tratamentos seguiu esquema fatorial 3x2, tendo um fator idade (adulto e idoso) entre os animais e um fator dieta (FC, PBe e FS) dentro dos animais, com seis animais em cada combinação. Os dados foram avaliados por meio do procedimento Mixed do SAS, considerando-se os efeitos de bloco, animal, ração e suas interações. Estas análises foram realizadas no software Statistical Analysis System (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Todas as variáveis foram previamente testadas quanto às hipóteses da normalidade e da homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Quando o teste de F foi significativo, comparações múltiplas das médias foram realizadas pelo teste de Tukey. Considerou-se significativos valores de $P < 0,05$. Quando necessário, transformação logarítmica das variáveis foi usada ($\log x + 1$). As variáveis eritroleucométricas e de imunofenotipagem de linfócitos foram avaliadas no dia 0 e 32 de cada bloco, para sua interpretação empregou-se o valor inicial de cada animal como co-variável. Os resultados das análises histológicas dos fragmentos de mucosa foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, quando diferenças significativas foram verificadas, os grupos foram comparados pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes

Os alimentos foram adequadamente consumidos pelos cães durante os 32 dias de cada bloco experimental, não houve episódios de rejeição alimentar ou vômitos. Nenhum animal apresentou reação adversa ao consumir as dietas. O peso corporal dos cães (Tabela 6) não variou entre tratamentos e manteve-se constante ao longo do experimento. O consumo de energia metabolizável (Tabela 7) não variou entre dietas, mas apresentou efeito de idade com menor consumo para manter peso corporal constante nos animais idosos ($P < 0,05$). Deve-se considerar na interpretação destes dados que os cães foram alimentados para manterem peso corporal constante, sendo realizados ajustes na quantidade fornecida caso estes ganhassem peso. Nenhuma estratégia foi adotada para aumentar a ingestão de matéria seca, que ocorreu normalmente como resposta fisiológica dos cães para manterem a ingestão de EM e o peso corporal.

Tabela 6. Peso corporal inicial e final de cães de dois grupos etários alimentados com rações com diferentes fontes de fibra e proteína (média \pm erro padrão)

Item	Dietas ¹						Valor de P ³
	FC		PBe		FS		
	Adulto	Idoso	Adulto	Idoso	Adulto	Idoso	
PC ² (kg)							
Inicial	11,3 \pm 0,5	10,8 \pm 0,8	11,2 \pm 0,5	11,7 \pm 0,7	10,6 \pm 0,4	13,0 \pm 0,7	0,584
Final	11,2 \pm 0,7	10,9 \pm 0,9	11,4 \pm 0,6	11,6 \pm 0,7	10,7 \pm 0,3	13,3 \pm 0,8	0,421
Valor de P	0,877	0,903	0,864	0,903	0,974	0,815	

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

² Peso Corporal expresso em Kg.

³ Valor de P do teste F.

Tabela 7. Consumo de energia metabolizável em cães de dois grupos etários alimentados com rações com diferentes fontes de fibra e proteína (média ± erro padrão).

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P ³
		FC	PBe	FS		
Consumo de energia metabolizável ² (média de 32 dias)						
kcal/kg ^{0.75} /dia	Adulto	123,5±3,7	131,4±1,7	133,4±1,9	129,4±1,7 ^a	0,029
	Idoso	102,2±11,1	115,0±7,6	128,9±1,9	114,7±5,1 ^b	
	Média	112,0±6,7	122,6±4,6	131,1±1,5		

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

² Energia metabolizável determinada *in vivo*.

³ Valor de P do modelo.

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05).

Com exceção do maior consumo de amido da ração FS (P<0,05), não houve efeito de idade ou dieta no consumo dos demais nutrientes durante o ensaio de digestibilidade (P>0,05), como apresentado na Tabela 8. Por outro lado os coeficientes de digestibilidade (CDA) dos nutrientes e da energia diferiram (P<0,01), interação entre idade e dieta foi verificada para matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo, com exceção do amido, energia bruta e da energia metabolizável que apresentaram apenas efeito de dieta (P<0,05). De maneira geral os CDA foram maiores para FS e menores para FC. Efeito de idade foi evidenciado apenas na ração PBe (P<0,05), cães idosos alimentados com essa ração apresentaram menores CDA da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo do que os adultos (P<0,05).

Tabela 8. Ingestão de nutrientes durante o ensaio de digestibilidade e coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia das dietas experimentais com diferentes fontes de proteína e fibra fornecidas a cães de dois grupos etários (média ± erro padrão).

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P
		FC	PBe	FS		
Ingestão de nutrientes, g/cão/dia						
Matéria Seca	Adulto	194,8 ± 11,3	192,6 ± 6,6	183,9 ± 3,6	190,4 ± 4,4	0,108
	Idoso	155,5 ± 19,6	176,9 ± 13,6	207,3 ± 7,9	178,6 ± 9,5	
	Média	173,6 ± 12,6	184,18 ± 7,9	195,6 ± 5,4		
Matéria Orgânica	Adulto	181,2 ± 10,5	186,5 ± 6,39	181,00 ± 3,56	182,89 ± 4,04	0,060
	Idoso	144,6 ± 18,2	171,3 ± 13,2	204,05 ± 7,76	171,79 ± 9,52	
	Média	161,5 ± 11,7	178,3 ± 7,7	192,53 ± 5,35		
Proteína Bruta	Adulto	58,6 ± 3,3	63,6 ± 2,2	55,0 ± 1,0	59,1 ± 1,5	0,074
	Idoso	46,7 ± 5,9	58,46 ± 4,4	62,1 ± 2,3	55,4 ± 2,9	
	Média	52,2 ± 3,8	60,8 ± 2,6	58,5 ± 1,6		
Amido	Adulto	75,9±9,7	75,1±5,8	73,1±3,3	68,9±1,5	0,006
	Idoso	77,7±18,3	75,3±12,9	87,8±7,2	64,7±3,6	
	Média	61,3±4,5 ^B	66,2±2,8 ^{AB}	73,0±2,0 ^A		
Fibra Dietética Total	Adulto	48,7±2,9	54,9±1,8	41,54±0,5	48,39±1,7	0,053
	Idoso	38,9±4,0	59,6±4,5	46,8±1,7	44,81±2,5	
	Média	43,45±3,1	52,28±2,4	44,18±1,2		
Extrato Etéreo Hidrolise Ácida	Adulto	25,2 ± 1,4	23,5 ± 0,8	21,6 ± 0,4	23,4 ± 0,6	0,197
	Idoso	20,1 ± 2,5	21,6 ± 1,6	24,4 ± 0,9	21,9 ± 1,1	
	Média	22,4 ± 1,6	22,5 ± 0,9	23,0 ± 0,6		

Continua...

Continuação ...

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P
		FC	PBe	FS		
Ingestão dos nutrientes, g/cão/dia						
Energia Bruta	Adulto	956,2 ± 55,3	981,3 ± 33,6	918,1 ± 18,0	951,9 ± 21,9	0,088
	Idoso	763,2 ± 96,2	901,5 ± 69,3	1035,0 ± 39,4	893,1 ± 48,0	
	Média	852,2 ± 62,1	938,4 ± 40,5	976,5 ± 27,1		
Coeficientes de Digestibilidade Aparente (%)						
Matéria Seca	Adulto	70,2 ± 0,5 ^{aC}	75,2 ± 1,0 ^{aB}	79,6 ± 0,6 ^{aA}	75,5 ± 1,0	<.0001
	Idoso	69,2 ± 0,9 ^{aC}	72,5 ± 0,8 ^{bB}	79,4 ± 0,4 ^{aA}	73,2 ± 1,0	
	Média	69,6 ± 0,5	73,7 ± 0,7	79,5 ± 0,3		
Matéria Orgânica	Adulto	78,2 ± 0,5 ^{aC}	81,8 ± 0,8 ^{aB}	85,0 ± 0,4 ^{aA}	81,6 ± 0,7	<.0001
	Idoso	78,0 ± 0,6 ^{aB}	79,7 ± 0,7 ^{bB}	84,9 ± 0,3 ^{aA}	80,7 ± 0,7	
	Média	78,1 ± 0,4	80,7 ± 0,6	84,9 ± 0,2		
Proteína Bruta	Adulto	79,2 ± 0,7 ^{aA}	80,1 ± 0,9 ^{aA}	82,8 ± 0,5 ^{aA}	80,7 ± 0,5	0,002
	Idoso	79,5 ± 0,9 ^{aAB}	76,8 ± 1,0 ^{bB}	82,9 ± 0,4 ^{aA}	79,6 ± 0,7	
	Média	79,4 ± 0,6	78,3 ± 0,8	82,8 ± 0,3		
Amido	Adulto	99,4±0,1	99,7±0,1	99,7±0,1	99,5±0,1	0,007
	Idoso	99,5±0,1	99,5±0,1	99,7±0,1	99,6±0,1	
	Média	99,3±0,1 ^B	99,4±0,1 ^{AB}	99,6±0,1 ^A		
Fibra Dietética Total	Adulto	41,0±2,5	63,1±2,4	65,4±2,3	56,51±3,2 ^a	<.0001
	Idoso	39,21±2,1	58,5±2,4	60,82±1,3	52,11±2,5 ^b	
	Média	40,0±1,6 ^B	60,7±1,7 ^A	63,12±2,4 ^A		

Continua...

Continuação...

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P
		FC	PBe	FS		
Coeficientes de Digestibilidade Aparente (%)						
Extrato Etéreo Hidrolise Ácida	Adulto	90,2 ± 0,6 ^{aA}	89,5 ± 0,5 ^A	90,0 ± 0,3 ^{aA}	89,9 ± 0,3	0,001
	Idoso	89,4 ± 0,6 ^{aA}	86,6 ± 1,1 ^{bB}	89,1 ± 0,7 ^{aA}	88,3 ± 0,5	
	Média	89,7 ± 0,4	87,9 ± 0,7	89,5 ± 0,4		
Energia Bruta	Adulto	79,4 ± 0,7	82,3 ± 0,7	85,5 ± 0,4	82,4 ± 0,7	<.0001
	Idoso	79,6 ± 0,7	80,5 ± 0,6	85,2 ± 0,3	81,6 ± 0,6	
	Média	79,5 ± 0,4 ^C	81,3 ± 0,5 ^B	85,4 ± 0,2 ^A		
Energia metabolizável, kcal/g	Adulto	3,71±80,17	3,92±86,08	4,03±45,53	3,89±36,54	<.0001
	Idoso	3,72±89,06	3,83±86,45	4,02±37,95	3,85±32,36	
	Média	3,72±22,66 ^B	3,87±26,00 ^A	4,03±11,71 ^A		

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes (P<0,05)

5.2. Produção e qualidade das fezes e concentração de produtos de fermentação.

Não se verificou efeito de idade sobre os parâmetros de fezes avaliados ($P>0,05$), apenas efeito de dieta e interação entre idade e dieta ($P<0,05$). Assim, cães idosos alimentados com a dieta FC produziram menos fezes na matéria original ($P<0,05$), como apresentado na Tabela 9. A maior matéria seca e pH das fezes foram verificados para cães alimentados com a dieta FC ($P<0,05$), efeito que foi independente de idade ($P>0,05$).

Não se verificou efeito de idade na concentração de ácidos graxos voláteis das fezes ($P>0,05$), apenas efeito de dieta ($P<0,05$; Tabela 10). As fezes dos cães alimentados com a dieta FC apresentaram menor valor de ácido acético, e os alimentados com FC e PBe menores concentrações de ácido propiônico, em relação aos que receberam a dieta FS ($P<0,05$). Por outro lado, o teor de ácido butírico foi menor nas fezes dos cães alimentados com a dieta FS ($P<0,05$). Como resultado as concentrações de AGCC totais foram menores nos cães alimentados com FC ($P<0,05$). Em relação aos AGCR o consumo da ração FS resultou em fezes com menor concentração de ácido isobutírico ($P=0,004$) e ácido isovalérico ($P=0,001$), com conseqüente menor concentração de AGCR menores para esse tratamento ($P<0,05$). Apesar de se verificar efeito geral para o teste F para o ácido valérico ($P=0,031$) não se verificou diferença entre grupos para essa variável.

Em relação ao ácido láctico houve interação idade e dieta ($P<0,05$), enquanto para o grupo adulto não se verificou efeito de dieta ($P>0,05$), no grupo idoso verificou-se maior concentração de lactato nas fezes de cães do grupo alimentado com a ração PBe, intermediário para FS e menor no grupo FC ($P<0,05$). Ainda, maior teor de lactato nas fezes foi verificado para os cães idosos alimentados com a ração PBe, em relação aos cães adultos alimentados com a mesma dieta ($P<0,05$). Maiores teores de amônia foram verificados nas fezes dos cães alimentados com as dietas com maiores teores de farinha de vísceras de frango (dietas FC e PBe; $P<0,05$).

Tabela 9. Produção e qualidade das fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína (média ± erro padrão)

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P
		FC	PBe	FS		
g fezes na MO/cão/dia	Adulto	137,3±8,9 ^{aA}	160,6±4,8 ^{aA}	114,2±5,7 ^{aA}	137,4±5,8	0,008
	Idoso	114,1±18,3 ^{aB}	172,2±15,3 ^{aA}	132,7±2,3 ^{aAB}	140,0±9,7	
	Média	124,8±10,8	166,9±8,4	123,5±4,0		
g fezes na MS/cão/dia	Adulto	62,6±3,5	53,0±2,7	41,6±1,7	52,4±2,5	0,066
	Idoso	52,6±7,3	54,1±4,0	47,1±1,7	51,5±2,9	
	Média	57,2±4,3	53,6±2,4	44,3±1,4		
MS (%)	Adulto	45,8±0,8	32,9±1,2	36,5±0,6	38,4±1,4	<.0001
	Idoso	47,7±2,0	31,7±0,8	35,4±0,8	38,4±1,7	
	Média	46,8±1,1 ^A	32,3±0,7 ^B	35,9±0,5 ^B		
pH das fezes	Adulto	6,31±0,07	6,07±0,13	5,91±0,06	6,10±0,05	0,003
	Idoso	6,29±0,04	6,20±0,06	5,88±0,07	5,69±0,06	
	Média	6,30±0,03 ^A	6,14±0,07 ^{AB}	5,90±0,04 ^B		
Escore fecal	Adulto	4,26±0,08	3,98±0,07	3,81±0,06	4,02±0,06	0,078
	Idoso	4,18±0,11	3,91±0,04	3,85±0,07	3,99±0,06	
	Média	4,22±0,06	3,94±0,03	3,83±0,07		

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes (P<0,05).

Tabela 10. Concentração de produtos de fermentação nas fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína (média ± erro padrão).

Item	Idade	Dieta ¹			Média	Valor de P
		FC	PBe	FS		
			(mMol/kg MS)			
Ácido acético	Adulto	263,1±13,3	382,9±33,4	360,4±6,8	335,49±17,0	0,001
	Idoso	248,9±17,5	372,5±18,3	347,3±16,1	319,02±15,9	
	Média	255,5±10,9 ^B	377,7±18,2 ^A	353,9±8,6 ^A		
Ácido propiônico	Adulto	76,3±5,2	87,7±12,2	198,7±7,1	120,93±14,2	<.0001
	Idoso	78,0±2,4	97,3±9,1	209,0±18,2	124,05±14,2	
	Média	77,2±2,6 ^B	92,9±7,3 ^B	203,8±9,4 ^A		
Ácido butírico	Adulto	39,0±3,4	42,3±4,2	31,5±2,5	37,6±2,2	0,035
	Idoso	39,4±3,1	43,5±3,3	27,1±3,6	37,1±2,4	
	Média	39,2±2,2 ^A	42,9±2,5 ^A	29,3±2,2 ^B		
AGCC total	Adulto	378,5±18,7	513,0±44,7	590,6±12,1	494,0±26,4	0,004
	Idoso	366,3±20,6	460,0±53,5	583,5±31,5	464,3±29,0	
	Média	371,9±13,6 ^B	486,5±34,8 ^A	587,0±16,1 ^A		
Ácido isobutírico	Adulto	5,33±0,44	5,51±1,18	2,13±0,35	4,32±0,55	0,004
	Idoso	5,40±0,35	4,71±0,54	2,69±0,34	4,34±0,34	
	Média	5,36±0,26 ^A	5,11±0,60 ^A	2,41±0,25 ^B		
Ácido isovalérico	Adulto	8,96±0,61	7,65±0,72	4,83±0,50	7,15±0,53	0,001
	Idoso	9,42±0,52	8,13±0,72	5,10±0,58	7,67±0,52	
	Média	9,19±0,38 ^A	7,89±0,50 ^A	4,97±0,36 ^B		

Continua...

Continuação...

Item	Idade	Dieta ¹			Média	Valor de P
		FC	PBe	FS		
			(mMol/kg MS)			
Ácido valérico	Adulto	2,90±0,62	1,34±0,15	3,51±0,44	2,58±0,33	0,032
	Idoso	2,62±0,51	1,79±0,35	2,80±0,67	2,38±0,30	
	Média	2,75±0,38	1,58±0,20	3,16±0,40		
AGCR total	Adulto	17,2±1,5	14,5±1,5	10,5±1,2	14,1±1,0	0,031
	Idoso	17,4±1,3	14,6±1,5	10,6±1,4	14,4±1,0	
	Média	17,3±0,9 ^A	14,6±1,0 ^{AB}	10,5±0,9 ^B		
AGV totais	Adulto	395,7±19,8	527,5±45,8	601,1±11,3	508,1±26,1	0,005
	Idoso	383,7±29,3	474,6±47,2	594,1±32,3	456,0±30,6	
	Média	389,2±18,7 ^B	501,1±33,8 ^{AB}	597,6±16,3 ^A		
Ácido láctico	Adulto	6,21±2,32 ^{aA}	11,20±2,60 ^{bA}	8,15±2,56 ^{aA}	8,52±0,74	<.0001
	Idoso	5,68±2,17 ^{aC}	16,70±6,81 ^{aA}	12,01±3,30 ^{aB}	11,44±1,44	
	Média	5,92±0,60	14,16±1,62	10,08±1,00		
Amônia	Adulto	102,8±20,0	114,2±21,9	57,3±8,9	91,5±7,1	<.0001
	Idoso	111,0±10,2	93,5±16,9	67,1±18,7	91,7±5,2	
	Média	107,2±4,3 ^A	103,1±5,9 ^A	62,2±4,3 ^B		

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes (P<0,05).

5.3. Composição da microbiota das fezes

As contagens de aeróbios totais, anaeróbios totais, *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium* apresentaram interação idade e dieta ($P < 0,05$). Para estas bactérias cães adultos alimentados com a ração FC tiveram menores contagens que os cães idosos. Adicionalmente, a dieta modificou a contagem de *Lactobacillus spp* do grupo adulto, quando estes foram alimentados com ração FC apresentaram menores contagens desta bactéria do que quando alimentado com a ração FS ($P < 0,05$). Para *Clostridium spp* e *Enterobacteriaceae* não houve efeito de idade ou dieta ($P > 0,05$; Tabela 11).

Tabela 11. Contagem microbiana e concentração de produtos de fermentação nas fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína (média ± erro padrão).

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P
		FC	PB	FS		
log ₁₀ céls/ g de fezes na MS						
Aeróbios totais	Adulto	6,21 ± 0,35 ^{bA}	6,32 ± 0,27 ^{aA}	7,27 ± 0,34 ^{aA}	6,60 ± 0,21	0,031
	Idoso	7,28 ± 0,45 ^{aA}	6,79 ± 0,40 ^{aA}	7,19 ± 0,50 ^{aA}	7,08 ± 0,25	
	Média	6,79 ± 0,32	6,57 ± 0,25	7,23 ± 0,29		
Anaeróbios totais	Adulto	5,91 ± 0,72 ^{bA}	6,61 ± 0,31 ^{aA}	7,38 ± 0,38 ^{aA}	6,63 ± 0,31	0,016
	Idoso	7,83 ± 0,40 ^{aA}	7,71 ± 0,34 ^{aA}	7,35 ± 0,43 ^{aA}	7,64 ± 0,21	
	Média	6,94 ± 0,47	7,20 ± 0,27 ^A	7,37 ± 0,27		
<i>Escherichia coli</i>	Adulto	5,84 ± 0,16	5,98 ± 0,31	5,53 ± 0,28	5,78 ± 0,15	0,699
	Idoso	6,36 ± 0,35	6,41 ± 0,35	6,11 ± 0,50	6,30 ± 0,22	
	Média	6,12 ± 0,21	6,21 ± 0,23	5,82 ± 0,29		
<i>Clostridium spp</i>	Adulto	4,64 ± 0,83	4,24 ± 0,27	4,38 ± 0,44	4,39 ± 0,26	0,984
	Idoso	4,41 ± 0,26	3,97 ± 0,25	4,29 ± 0,39	4,21 ± 0,16	
	Média	4,49 ± 0,32	4,10 ± 0,18	4,34 ± 0,29		
<i>Lactobacillus spp</i>	Adulto	5,49 ± 1,34 ^{aB}	6,88 ± 0,57 ^{aAB}	7,25 ± 0,45 ^{aA}	6,63 ± 0,45	0,009
	Idoso	7,54 ± 0,60 ^{bA}	7,43 ± 0,44 ^{aA}	7,52 ± 0,37 ^{aA}	7,49 ± 0,27	
	Média	6,79 ± 0,65	7,18 ± 0,35	7,38 ± 0,27		
<i>Bifidobacterium</i>	Adulto	6,65 ± 0,31 ^{bA}	7,10 ± 0,27 ^{aA}	7,40 ± 0,43 ^{aA}	7,05 ± 0,20	0,009
	Idoso	8,04 ± 0,42 ^{aA}	7,64 ± 0,47 ^{aA}	7,56 ± 0,35 ^{aA}	7,76 ± 0,23	
	Média	7,40 ± 0,32	7,39 ± 0,28	7,48 ± 0,26		

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes (P<0,05)

5.4. Avaliação da resposta imunológica dos animais

Foi verificado para os resultados de IgA das fezes interação entre idade e dieta ($P < 0,05$), cães alimentados com a ração FC apresentaram menores quantidades desse anticorpo nas fezes, sendo estas semelhantes entre idades. O consumo de alimento com FS resultou em maiores quantidades de IgA nas fezes ($P < 0,05$), resultados também semelhantes entre idades. No entanto, quando alimentados com a ração PBe verificou-se do grupo dos idosos maior eliminação de IgA via fezes do que os adultos ($P < 0,05$; Tabela 12).

Os parâmetros eritroleucométricos e plaquetários dos cães encontram-se na Tabela 13. Efeito de idade foi verificado para as variáveis hemácias, leucócitos, neutrófilos bastonetes e linfócitos ($P < 0,05$), o grupo adulto apresentou maiores valores que o idoso. Não foram verificados efeito de dieta para esses parâmetros.

Menores contagens de CD5+ e CD21+ foram verificadas para o grupo idoso ($P < 0,05$), efeito que foi independente da dieta ($P > 0,05$). Apesar de não se verificar efeito de idade para as contagens de CD5+CD4+ e CD5+CD8+, seus valores absolutos foram, respectivamente, 37% e 50% mais baixos no grupo idoso do que no adulto (Tabela 14).

Tabela 12. Valores de IgA das fezes de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína (média \pm erro padrão).

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P
		FC	PBe	FS		
mg/g de fezes secas						
IgA	Adulto	2,03 \pm 0,46 ^{ab}	3,75 \pm 0,75 ^{bb}	14,23 \pm 3,05 ^{aA}	6,57 \pm 1,69	0,0003
	Idoso	2,83 \pm 0,66 ^{ab}	26,19 \pm 1,52 ^{aA}	16,97 \pm 1,86 ^{aA}	12,80 \pm 2,09	
	Média	2,46 \pm 0,41	11,93 \pm 2,90	15,60 \pm 1,75		

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes ($P < 0,05$). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes ($P < 0,05$)

Tabela 13. Parâmetros eritroleucométricos e plaquetários de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína (média ± erro padrão).

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P	Valor de P Covariável
		FC	PBe	FS			
Hemácias (x 10 ⁶ /μL)	Adulto	7,27±0,30	6,98±0,19	7,13±0,27	7,12±0,14 ^a	0,034	<0,0001
	Idoso	7,02±0,25	6,91±0,31	6,72±0,22	6,82±0,15 ^b		
	Média	7,14±0,19	6,83±0,18	6,92±0,18			
Leucócitos (x 10 ⁶ /μL)	Adulto	8,85±0,46	8,66±0,59	9,05±0,71	8,85±0,32 ^a	0,008	0,0003
	Idoso	6,37±0,51	6,95±0,82	8,40±0,54	7,18±0,40 ^b		
	Média	7,51±0,49	7,74±0,55	8,72±0,44			
Hemoglobina (g/dL)	Adulto	16,41±0,69	15,98±0,37	16,26±0,55	16,22±0,30	0,168	0,0003
	Idoso	16,01±0,60	14,82±0,92	15,13±0,42	15,33±0,40		
	Média	16,19±0,44	15,36±0,53	15,70±0,37			
Hematócrito (%)	Adulto	49,51±1,83	48,06±0,94	49,58±1,63	49,05±0,84	0,332	0,015
	Idoso	49,12±1,83	45,62±2,56	46,15±1,19	47,01±1,15		
	Média	49,30±1,24	46,75±1,43	47,86±1,09			
Basófilos (x 10 ³ /μL)	Adulto	0,01±0,01	0,00±0,00	0,02±0,02	0,01±0,01	0,203	0,004
	Idoso	0,01±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		
	Média	0,01±0,01	0,00±0,00	0,01±0,01			
Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	Adulto	0,60±0,21	0,57±0,14	0,59±0,22	0,59±0,10	0,249	0,203
	Idoso	0,33±0,10	0,34±0,13	0,55±0,23	0,40±0,08		
	Média	0,46±0,01	0,45±0,00	0,57±0,01			

Continua...

Continuação...

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P	Valor de P Covariável
		FC	PBe	FS			
Neutrófilos bastonetes (x 10 ³ /μL)	Adulto	0,19±0,05	0,15±0,03	0,13±0,04	0,16±0,02 ^a	0,022	0,191
	Idoso	0,08±0,02	0,12±0,05	0,03±0,02	0,08±0,02 ^b		
	Média	0,13±0,03	0,13±0,03	0,09±0,02			
Neutrófilos segmentados (x 10 ³ /μL)	Adulto	5,89±0,54	5,24±0,40	6,13±0,51	5,75±0,28	0,128	0,005
	Idoso	4,65±0,38	4,83±0,63	5,86±0,56	5,07±0,31		
	Média	5,22±0,35	5,02±0,38	5,99±0,36			
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	Adulto	2,09±0,45	2,60±0,48	2,14±0,32	2,28±0,23 ^a	0,036	0,813
	Idoso	1,21±0,28	1,64±0,25	1,89±0,35	1,57±0,17 ^b		
	Média	1,62±0,27	2,08±0,28	2,02±0,23			
Monócitos (x 10 ³ /μL)	Adulto	0,04±0,02	0,09±0,03	0,00±0,00	0,04±0,01	0,954	0,814
	Idoso	0,07±0,02	0,01±0,01	0,05±0,03	0,04±0,01		
	Média	0,06±0,01	0,05±0,02	0,02±0,01			
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	Adulto	311,0±29,4	338,8±20,2	346,8±20,5	332,2±13,4	0,249	0,053
	Idoso	267,8±29,4	301,3±32,4	337,2±35,6	300,3±18,8		
	Média	287,7±20,9	318,6±19,7	342,0±19,6			

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes (P<0,05)

Tabela 14. Subpopulações linfocitárias sanguíneas de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína (média ± erro padrão)

Item	Idade	Dietas ¹			Média	Valor de P	Valor de P Covariável
		FC	PBe	FS			
CD5+ (cels x 10 ³ /μL)	Adulto	1,64±0,30	2,00±0,33	1,04±0,27	1,78±0,17 ^a	0,047	0,885
	Idoso	1,01±0,23	1,32±0,19	0,57±0,26	1,27±0,13 ^b		
	Média	1,30±0,20	1,63±0,20	0,80±0,18			
CD5+CD4+ (cels x 10 ³ /μL)	Adulto	0,61±0,10	0,83±0,10	0,78±0,160	0,74±0,07	0,157	0,807
	Idoso	0,43±0,10	0,53±0,08	0,70±0,13	0,54±0,06		
	Média	0,51±0,07	0,66±0,07	0,74±0,10			
CD5+CD8+ (cels x 10 ³ /μL)	Adulto	0,30±0,05	0,35±0,07	0,35±0,08	0,33±0,03	0,240	0,053
	Idoso	0,20±0,04	0,21±0,03	0,28±0,05	0,22±0,02		
	Média	0,25±0,03	0,28±0,04	0,31±0,04			
CD4+:CD8+	Adulto	2,38±0,49	2,55±0,31	2,53±0,36	2,49±0,21	0,992	<0,0001
	Idoso	2,41±0,39	2,67±0,36	2,67±0,41	2,58±0,21		
	Média	2,40±0,30	2,61±0,23	2,60±0,26			
CD21+ (cels x 10 ³ /μL)	Adulto	0,38±0,13	0,36±0,06	0,45±0,06	0,40±0,05 ^a	0,032	0,831
	Idoso	0,18±0,04	0,21±0,03	0,36±0,06	0,24±0,03 ^b		
	Média	0,27±0,06	0,28±0,04	0,40±0,04			

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes (P<0,05).

5.5. Análise histológica do estômago, intestino delgado e intestino grosso.

O número de fragmentos coletados da mucosa do trato gastrintestinal e a avaliação de sua adequação ao exame histológico encontram-se na Tabela 15. Dos fragmentos coletados para produzir as lâminas para a avaliação histológica do TGI dos animais, 86,0% do grupo de adultos e 82,8% do grupo de idosos alimentados com FC encontravam-se adequados para análise. Dentre os alimentados com a ração PBe 93,3% do grupo de adultos e 93,5% do grupo de idosos estavam adequados e, por fim, 95,2% do grupo de adultos e 83,1% do grupo de idosos alimentados com FS encontravam adequados para análise. A frequência de diagnósticos encontrados para os fragmentos da mucosa do trato gastrointestinal encontram-se na Tabela 16.

Tabela 15. Número de fragmentos coletados e adequação dos mesmos ao exame histológico da mucosa do trato gastrintestinal de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.

Item	Dieta ¹					
	FC		PBe		FS	
	Adulto	Idoso	Adulto	Idoso	Adulto	Idoso
Números de fragmentos						
Estômago	15	15	14	18	16	14
Intestino Delgado	66	79	76	84	85	81
Intestino Grosso	48	49	60	67	65	65
Total	129	145	150	169	166	160
Adequação dos fragmentos ²						
Grau 0	0%	0%	1,3%	1,2%	0%	0%
Grau 1	13,9%	17,2%	5,3%	5,3%	4,8%	16,9%
Grau 2	86,0%	82,7%	93,3%	93,5%	95,2%	83,1%

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

² Adequação dos fragmentos ao exame histológico: 0 = inapropriado para análise; 1 = adequado com artefatos; 2 = adequado para análise.

Tabela 16. Frequência de diagnósticos dos fragmentos coletados ao exame histológico da mucosa do trato gastrintestinal de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína.

Item	Idade	Dieta ¹		
		FC	PB	FS
Estômago				
Gastrite superficial linfoplasmocítica discreta	Adulto	16/6%	-	16/6%
	Idoso	50%	16/6%	16/6%
Gastrite linfoplasmocítica difusa moderada	Adulto	16/6%	-	-
	Idoso	16/6%	33,3%	-
Gastrite difusa linfoplasmocítica marcante com hiperplasia linfoide	Adulto	-	-	-
	Idoso	33,3%	-	-
Intestino Delgado				
Enterite discreta linfoplasmocítica	Adulto	-	33,3%	16/6%
	Idoso	33,3%	33,3%	16/6%
Enterite linfoplasmocítica discreta com aumento de LIE	Adulto	75%	16/6%	-
	Idoso	16/6%	16/6%	-
Enterite moderada linfoplasmocítica	Adulto	-	-	16/6%
	Idoso	-	-	-
Enterite linfoplasmocítica moderada com aumento de LIE	Adulto	-	-	-
	Idoso	-	33,3%	33,3%
Intestino Grosso				
Colite discreta linfoplasmocítica	Adulto	-	-	-
	Idoso	33,3%	-	-
Colite discreta linfoplasmocítica crônica	Adulto	16/6%	-	-
	Idoso	-	50%	16/6%

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

Nas análises semiquantitativas dos fragmentos (relação vilos:cripta, morfologia dos vilos, características do epitélio superficial, intensidade da hiperplasia da cripta, dilatação da cripta, grau de ocorrência das células caliciformes, frequência e grau de intensidade de diferentes tipos de células inflamatórias na lâmina própria, número de

linfócitos intraepiteliais e presença de erosão, ulceração, edema, fibrose e atrofia das criptas), foram verificadas para alguns parâmetros diferenças significativas entre dietas, idades e interação entre idade e dieta.

Na comparação entre dietas independente da idade verificou-se diferença significativa quanto a presença de infiltrado de linfócitos e plasmócitos na mucosa fúndica gástrica ($P=0,035$), cães alimentados com a dieta FC apresentaram maior presença dessas células em relação aos alimentados com a dieta FS.

Efeito de idade independente de dieta foi observado para a infiltração de linfócitos e plasmócitos na mucosa fúndica gástrica e na mucosa do intestino grosso, maior para os animais idosos ($P<0,05$). Efeito de idade também foi verificado para a variável redução de células calciformes na mucosa do intestino grosso, sendo maior para os cães idosos ($P=0,018$). Os resultados completos da análise histológica dos fragmentos de estômago, duodeno, íleo, cólon e válvula íleo-cecal encontram-se nos Apêndices A a F.

6. Discussão

A menor necessidade de energia metabolizável dos animais idosos para manutenção do peso corporal, em comparação aos adultos, já havia sido descrita anteriormente (TAYLOR et. al., 1995; HARPER 1998; GOMES et. al., 2011). Segundo Laflamme (2005; 2012), a massa magra corporal tende a diminuir com o avançar da idade em cães, assim como a atividade física, fatores que podem contribuir para a redução da necessidade energética de manutenção. Já foi demonstrado que cães idosos podem apresentar queda de até 25% da necessidade energética de manutenção (HARPER 1998; LAFFLAME 2012), no presente estudo esta foi de aproximadamente 11,6%. Como implicação deste dado, levando-se em conta o menor consumo de alimentos pelos cães idosos, há necessidade de se ajustar a relação nutrientes energia de suas dietas, de modo a otimizar a ingestão de aminoácidos, vitaminas e minerais de cães nesta faixa etária.

No presente estudo a dieta FS apresentou maiores CDA para MS, MO e EB em relação às dietas PBe e FC. Rações à base de soja pode apresentar tão boa digestibilidade quanto às com fontes de proteínas de origem animal, a depender de seu processamento (ZUO et al., 1996; CLAPPER et al., 2001; CARCIOFI et al., 2006; FÉLIX et al., 2009; TORTOLA et. al., 2013). No estudo de Tortola et. al., (2013) foi feita comparação entre farinha de vísceras de frango e farelo de soja como fontes de proteínas em alimentos secos para cães adultos, tendo se verificado que não houve diferença significativa para os CDA dos nutrientes. A maior digestibilidade observada para a dieta FS no presente estudo pode ser explicada pelo fato dos subprodutos desidratados de origem de abatedouros, apesar de amplamente utilizados em formulações para cães e gatos, apresentarem em sua composição quantidades variáveis e, por vezes, significativas de materiais de baixa biodisponibilidade, gerando variabilidade na composição e digestibilidade destas matérias primas. Por outro lado, as fontes proteicas vegetais apresentam composição mais uniforme, com menor variação entre partidas e fornecedores (CARCIOFI, 2008).

Segundo o NRC (2006) a polpa de beterraba é fonte de fibra fermentável, não viscosa que resulta em diminuição do tempo de trânsito intestinal, aumento do

volume de fezes e diminuição da digestibilidade da matéria seca. Fahey et. al. (1990) observaram que 12,5% de inclusão de polpa de beterraba provocou maior volume de fezes, maior frequência de defecação e diminuição do tempo de retenção do alimento no trato gastrointestinal, entretanto, não foram observadas reduções severas na digestibilidade dos nutrientes. No presente estudo, a dieta com PBe apresentou CDA da MS, MO e EB intermediários entre FS e FC, embora os CDA da PB e EE não tenham diferido entre dietas. Segundo Fisher et al (2012), a fibra de cana possui em sua composição 53,5% de celulose, 31,3% de hemicelulose, 6,4% de lignina, 2,6% de proteína bruta, 2,6% de matéria mineral e conteúdo inexpressivo de gordura. Com cerca de 90% de fibra dietética total, a fibra de cana é toda praticamente insolúvel (PINTO, 2007). Até a presente data poucos foram os estudos que avaliaram este ingrediente para cães. Pinto (2007) avaliou a digestibilidade de dietas enriquecidas com diferentes fontes e teores de fibra dietética para cães, e observou redução da digestibilidade da MS, MO e EB quando foi incluído um *blend* com 2,0% de celulose e 12% da fibra de cana na dieta. No estudo de Fisher et. al., (2012) com gatos adultos, dietas com diferentes fontes de fibra foram avaliadas, sendo observado para a dieta com fibra de cana menores CDA da MS, MO, PB, EE e EB, enquanto a polpa de beterraba e o farelo de trigo não afetaram o CDA da PB e a polpa de beterraba também não diminuiu a digestibilidade do EE. No presente estudo, a dieta com FC apresentou os menores CDA da MS, MO e EB, também, como a PBe sem interferir no CDA da PB e EE. Essa redução pode ser atribuída à baixa fermentação do FDT do ingrediente fibra de cana, levando a diminuição no aproveitamento dos nutrientes.

Diferentemente do indicado pela literatura (GOMES et al, 2011; FAHEY et. al., 2008; SWANSON et. al., 2004; TAYLOR et. al., 1995), no presente estudo cães idosos alimentados com a dieta PBe apresentaram menor CDA da MS, MO, PB e EE do que os adultos alimentados com a mesma dieta. Gomes et. al., (2011) realizaram estudo com cães adultos (em média 4 anos) e idosos (em média 10 anos) consumindo uma única dieta e não encontraram diferença nos CDA dos nutrientes. Swanson et. al., (2004) compararam a digestibilidade entre cães adultos jovens (em média 1,3 anos) e cães idosos (em média 11 anos) utilizando duas dietas, uma com fonte de proteína animal (30% farinha de vísceras de frango) e outra com fonte de

proteína vegetal (20% de farelo de soja mais 10% de farinha de carne e ossos). Os autores não encontraram efeito de idade nos CDA dos nutrientes, somente efeito de dieta. No presente estudo, provavelmente, devido à polpa de beterraba ser em parte solúvel esta interferiu negativamente na digestibilidade de cães idosos, demonstrando que estes apresentam diferenças fisiológicas em relação à idade adulta. Nenhum estudo comparando a digestibilidade aparente dos nutrientes entre cães adultos e idosos alimentados com dietas com fontes de fibras diferentes foi encontrado para possíveis comparações. Os achados referentes à dieta PBe sugerem cautela com a adição de fibra para cães idosos, indicando a necessidade de se estudar convenientemente seu possível impacto no aproveitamento de nutrientes da dieta.

Dentre os cães idosos, maior produção de fezes na matéria natural foi verificada mediante consumo da dieta PBe, que também resultou em fezes com menor teor de MS que a dieta FC. Estes achados se explicam pelos menores CDA da dieta PBe para cães idosos, o que leva a maiores teores de água nas fezes, como verificado por fibras mais solúveis e fermentáveis por outros pesquisadores (FISHER et al., 2012; MIDDELBOLS et al., 2007). Swanson et. al., (2004) ao estudar os parâmetros fecais de cães jovens adultos (em média 1,3 anos) e cães idosos (em média 11 anos) utilizando duas dietas, uma com fonte de proteína animal (30% farinha de vísceras de frango) e outra com fonte de proteína vegetal (20% de farelo de soja mais 10% de farinha de carne e ossos) observou menor produção de fezes na MS e menor porcentagem de MS nas fezes dos cães alimentados com farelo de soja, sem diferenças entre as idades.

Em relação aos produtos de fermentação apesar da influencia das dietas sobre as concentrações dos produtos de fermentação da microbiota intestinal, não se verificou efeito de idade, com exceção do lactato das fezes, o que não era esperado. Gomes (2013) e Gomes et al. (2011) verificaram menor concentração de AGCC, ácido valérico e maior pH nas fezes de cães idosos, indicando menor atividade sacarolítica de sua microbiota intestinal. Em estudo anterior, Kuzmuk et al. (2005) observaram efeito oposto, com aumento na concentração fecal de butirato, valerato, isovalerato e amônia em animais com idade superior a 11 anos, quando comparado a animais com idade inferior a 12 meses. Esses dados implicam na

necessidade de mais estudos em relação à interação da idade de cães e os macronutrientes da dieta sobre a atividade metabólica de sua microbiota intestinal.

De maneira geral a ingestão da ração com farelo soja resultou em aumento da concentração de AGV totais, AGCC totais e acetato e menores teores de AGCR, butirato e pH nas fezes dos cães em relação à dieta FC, independente da idade. A dieta FS ainda resultou em menor teor de amônia nas fezes em relação às dietas PBe e FC. Esses resultados se justificam pela fermentação intestinal de seus oligossacarídeos e fibra e menor fermentação de proteína de origem animal no cólon (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991; ZENTEK et al., 2003). A fermentação de carboidratos pela microbiota nativa do cólon produz ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) e ácido láctico. Esses ácidos orgânicos diminuem o pH fecal, favorecendo a inibição das bactérias patogênicas e estimulam a proliferação de colonócitos. Os AGCC são importante fonte de energia para os colonócitos, favorecendo a absorção de íons, fluxo sanguíneo intestinal e o peristaltismo, promovendo saúde no animal por aumentarem os nutrientes disponíveis para as células gastrointestinais (NRC, 2006). Desta forma, a redução do pH e dos teores de amônia e o aumento das concentrações de AGCC promovidos pelos oligossacarídeos da soja podem ser considerados efeitos benéficos deste ingrediente sobre o metabolismo intestinal dos cães (TORTOLA, et al. 2013).

A ingestão da deita com polpa de beterraba também levou ao aumento das concentrações fecais de AGCC total e ácido acético em relação à dieta FC, provavelmente em função da polpa de beterraba ser fonte de fibra moderadamente fermentável. Middelbos et al. (2007), em estudo com cães e Fisher et al. (2012), em estudo com gatos também observaram que a inclusão de polpa de beterraba acarretou em aumento das concentrações de produtos de fermentação nas fezes, demonstrando ser sua fibra fermentável pela microbiota intestinal de carnívoros. Foi verificado para cães que receberam PBe, também aumento das concentrações de ácido isovalérico, ácido valérico e amônia em relação à dieta FS, provavelmente devido ao emprego de farinha de vísceras de frango como fonte de proteína.

No presente estudo, o consumo da dieta FC, contendo fonte de fibra não fermentável e proteína de origem animal, levou ao aumento das concentrações fecais de AGCR totais, ácido isovalérico e ácido isobutírico em relação à dieta FS.

KuzmuzK et al., (2005) avaliando efeito de fontes de proteína de origem animal encontrou resultados semelhantes, com aumento das concentrações de isobutirato e butirato. A formação de produtos de fermentação depende largamente da dieta e materiais não digeridos que chegam ao cólon. A fermentação de proteínas resulta na produção de compostos putrefativos como aminas biogênicas, amônia, indol e fenol, sendo indesejável (SWANSON et al., 2002; ZENTEK et al., 2003).

Em relação ao lactato, houve interação dieta e idade: enquanto para cães adultos este metabólito não se alterou nas fezes, nos idosos o consumo da ração PBe resultou em maiores teores de lactato, seguido pela FS e por último a FC. Isto se explica pela menor digestibilidade nos cães idosos da ração PBe, o que resultou em maior fermentação de matéria orgânica que alcançou o colon e pela baixa fermentabilidade da fibra de cana. Esta variação com maior atividade sacarolítica nos cães idosos está em contradição aos resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa (GOMES, et al. 2011; GOMES, 2013)

A interação entre idade e dieta verificada para a microbiota das fezes no presente estudo não havia sido descrita em publicações anteriores. Cães adultos alimentados com dieta com fibra pouco fermentável, a fibra de cana exibiram redução nas contagens de aeróbios e anaeróbios totais, *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp.*. No entanto, a microbiota de cães idosos não respondeu ao alimento, permanecendo semelhante entre dietas. Além da diferença entre idosos e adultos alimentados com a dieta FC, cães adultos apresentarem diferença nas contagens de lactobacilos, com menores quantidades destes micro-organismos quando alimentados com a dieta FC, intermediário na dieta PBe e maiores quanto alimentados com FS. Isto pode implicar em maior necessidade de fibra fermentável para cães adultos, enquanto os idosos parecem apresentar maior estabilidade de sua microbiota, que se altera menos em função da dieta.

Middelbos et al. (2007) foi o primeiro a relatar aumento na contagem da população de lactobacilos e bifidobactérias com dietas suplementadas com polpa de beterraba e oligossacarídeos. Os autores não encontraram diferença na contagem de *Clostridium spp* e *Escherichia coli*, assim como no presente estudo. No presente estudo, as maiores contagens de lactobacilos mediante consumo de farelo de soja, aliado aos resultados favoráveis de produtos da fermentação como aumento de AGV

totais e AGCC sugerem que esse ingrediente pode ser utilizado como possível promotor da saúde intestinal em cães adultos.

O estudo de ZENTEK et al. (2003), pelo método de cultura em agar seletivo, demonstrou que dieta rica em proteína de origem animal, quando comparada com dietas com menores teores de proteína e com inclusão de fibra fermentável, 3% de raiz de chicória, favorece o crescimento de bactérias indesejáveis, como o *Clostridium perfringens* e reduz as contagens fecais de bifidobactérias. Tortola et al. (2013) ao estudarem fontes de proteína de origem animal e vegetal, não observaram alteração na contagem do grupo *Clostridium spp.* No presente estudo também não houve diferença entre a dieta com fonte de proteína vegetal (FS) em relação às dietas com fonte de proteína animal (PBe e FC) para as contagens do grupo *Clostridium spp.*.

A relação entre idade, dieta e microbiota de cães permanece ainda pouco estudada (SIMPSON et al. 2002; GOMES et al. 2011). Gomes et. al. (2011) ao avaliarem o efeito da idade em cães adultos (em média 4 anos) e idosos (em média 10 anos) em quatro dietas com níveis de inclusão de 0%, 0,15%, 0,30% e 0,45% da parede celular de levedura não observaram interação nem efeito de idade ou de dieta para nenhuma variável avaliada (aeróbio totais, anaeróbio totais, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.* e *Escherichia coli.*). Simpson et al. (2002) estudaram o efeito de raça (pastor alemão, setter inglês e schnauzer miniatura), idades (adultos com $2,5 \pm 0,5$ e idosos com $10,9 \pm 0,7$ anos) e dieta (controle ou dieta com alta fibra mediante adição de 5% de polpa de beterraba e 5% de casca de soja) sobre a microbiota por cultivo em agar seletivo. Os pesquisadores observaram que os animais mais velhos, independentemente da dieta, apresentaram menor número de *Bacteroides spp.* que os adultos, sem diferenças significativas para os demais grupos bacterianos estudados. No mesmo estudo, quando os autores avaliaram a microbiota pelo método DGGE, observaram que os animais apresentaram tendência a se agruparem conforme idade ou raça (raças grandes ou pequenas), mas essas variações foram atribuídas principalmente a variações individuais. A principal conclusão referente a esta análise feita pelos autores é que cães apresentam padrão de microbiota individual, única e estável. Gomes (2013) por meio de análise do DNA da amostra fecal e amplificação pelo

PCR quantitativo (qPCR) não encontrou diferença na composição da microbiota entre cães adultos e idosos, apenas menor contagem de *Bifidobacterium spp* e Cluster IV (*Clostridium leptum*) para idosos e adultos em relação aos cães filhotes.

Uma limitação do presente estudo foi o emprego de cultivo ao invés de métodos moleculares mais modernos. Middelbos et al. (2007) compararam duas metodologias, cultivo em agar seletivo e qPCR e ambas levaram a resultados semelhantes em cães, embora o qPCR tenha apresentado resultados mais significativos. Desta forma, mesmos com suas limitações, os resultados da presente pesquisa têm utilidade. Atualmente, os métodos de estudo empregados para avaliar a microbiota intestinal são muito variáveis, moleculares ou não moleculares, dificultando a comparação dos achados (GOMES, 2013).

Dentre os parâmetros imunes avaliados, observou-se interação significativa de dieta e idade para a concentração de IgA fecal. O consumo da dieta FS resultou em maiores concentrações de IgA nas fezes tanto para o grupo adulto como idoso. Efeito de idade foi verificado dentro da ração PBe, com maior valor de IgA para idosos. Foram encontrados apenas dois estudos que avaliaram o efeito da idade na concentração fecal de IgA em cães (ZAINÉ et al., 2011; GOMES, 2013). Zaine et al. (2011) verificou que cães filhotes (5 meses) apresentaram menores concentrações desta imunoglobulina nas fezes ($0,32 \pm 0,05$ mg IgA/g fezes na MS) do que cães adultos (4,6 anos; $2,34 \pm 0,44$ mg IgA/g fezes na MS) e idosos (10,6 anos; $1,45 \pm 0,41$ mg IgA/g fezes na MS). Gomes (2013) avaliou os mesmos filhotes do estudo anterior, mas aos 10 meses, e sua concentração de IgA foi de $1,3 \pm 0,24$ mg/g fezes na MS, ainda diferindo dos animais adultos e idosos. A pesquisadora não encontrou diferença na concentração de IgA fecal entre os cães idosos e adultos.

Estudos anteriores para cães com dietas contendo oligossacarídeos fermentáveis sugerem alterações em células brancas e concentrações de imunoglobulinas séricas (SWANSON et al., 2002, GRIESHOP et al., 2004.; MIDDELBOSS et al., 2007). Swanson et. al. (2002) verificaram que cães alimentados com dieta suplementada com a combinação de mananoligossacarídeos mais fructooligossacarídeos apresentaram tendência ao aumento de IgA ileal ($P=0,052$) em relação ao grupo controle. Desta forma, o aumento na concentração de IgA e AGCC das fezes e a diminuição do pH e de amônia fecal dos cães do presente

estudo alimentados com FS parecem somar-se no sentido de auferir saúde ao trato gastrointestinal destes animais.

Na avaliação eritroleucométrica, as médias de todos os grupos ficaram dentro dos valores de normalidade para cães sugeridos por Feldman et al. (2000), apesar dos cães idosos terem apresentado menor concentração de hemácia, linfócitos, leucócitos e neutrófilos bastonetes. Ainda na presente pesquisa, foi verificado diminuição de CD5+ (linfócitos T totais) e de CD21+(linfócitos B) para animais idosos em relação aos adultos. Gomes et al., (2011) verificou além da redução nas contagens de linfócitos CD5+ e CD21+ redução de CD8+ e manutenção nas de CD4+ em cães idosos ($10 \pm 0,02$) em relação a adultos ($4 \pm 0,01$). A diminuição observada nos linfócitos é atribuída à diminuição nas células CD5+ que, por sua vez, se deve principalmente a perda de células CD4+, embora linfócitos B e CD8+ também se reduzam, porém em ritmo mais lento (BLOUNT et al., 2005). Alguns estudos com cães também demonstram baixas contagens de linfócitos em cães idosos, apontando este declínio, como característica do envelhecimento do sistema imune (STRASSER et al., 2000; GREELEY et al., 2001; REIS et al., 2005). Porém, alguns estudos apresentaram dados divergentes (GOMES, 2013; HEATON et al., 2002). Gomes (2013) verificou maior contagem de CD4+ para os cães idosos ($10,7 \pm 1,25$ anos) em relação aos adultos ($5,3 \pm 0,48$ anos) e não encontrou diferença para as contagens absolutas de CD5+ e CD21+ entre essas duas idades.

A análise histológica da mucosa do TGI de alguns animais apresentou alterações compatíveis com gastrite, enterite e colite, porém é importante ressaltar que todos os cães empregados eram clinicamente saudáveis e não apresentavam nenhuma alteração ao exame físico do sistema digestório, alteração no consumo de alimentos e produção e qualidade das fezes e em seus históricos de saúde não constavam nenhuma doença anterior no TGI.

Ao exame histológico verificou-se que os cães idosos apresentaram alterações significativas que indicam inflamação na mucosa do estômago, íleo e válvula ceco cólica. Ao analisar o efeito de dieta, verificou-se que tanto os animais adultos como idosos alimentados com a dieta FC apresentaram aumento de inflamação do estômago em relação às outras dietas e que dentro dos cães idosos, mais inflamação foi detectada na dieta FC em relação à FS. Além disso, no presente

estudo, observou-se aumento de pH das fezes, da concentração de amônia e AGCR totais e diminuição das concentrações de AGCC totais, AGV totais e lactato em cães alimentados com FC, essas condições adversas no TGI podem estar relacionadas a maior inflamação nestes animais idosos. Gomes (2013), ao comparar cães adultos e idosos já havia demonstrado ao exame histológico alterações compatíveis com gastrite, enterite e colite em animais idosos. Em seu estudo, Gomes (2013), além de encontrar menores concentrações de ácido butírico e tendência à redução de acetato, propionato e AGV totais, encontrou também aumento nas concentrações de alguns derivados da fermentação de proteínas como o isovalerato e alguns indóis nas fezes dos cães idosos, que indicam fermentação de proteína no intestino grosso. Segundo Gomes (2013), é possível que as alterações no perfil de produtos de fermentação intestinal de cães idosos estejam relacionadas às alterações histológicas verificadas, podendo estas alterações ser consequentes ou desencadeantes das alterações inflamatórias e estruturais verificadas ao exame histológico.

Infelizmente não foram verificados outros estudos que tenham comparado a histologia da mucosa do TGI de cães saudáveis de diferentes idades e consumindo diferentes dietas para se comparar os resultados da presente pesquisa. No contexto de imunosenescência e *inflammageing*, estas alterações na mucosa intestinal dos cães idosos, especialmente relacionadas ao maior recrutamento de células inflamatórias e imunes, parecem ser relevantes. Suas implicações no contexto das alterações do sistema imune que ocorrem nesta faixa etária merecem investigação e, especialmente, como a dieta poderia interferir neste processo, seja alterando a composição da microbiota intestinal ou os produtos de fermentação formados, como verificado no presente estudo, de modo a favorecer tanto à melhor estrutura histológica da mucosa do TGI como da resposta imune e inflamatória dos animais.

7. Conclusão

A polpa de beterraba é uma fibra de moderada fermentação, sua capacidade fermentativa produziu concentrações consideráveis de AGGC e lactato no cólon, porém para cães idosos levou a redução da digestibilidade, demonstrando que deve ser utilizada com cautela em dietas para cães geriátricos.

A fibra de cana de açúcar é uma fibra de baixa fermentação, e como resultado produziu menores concentrações de AGCV totais e AGCC totais, além de reduzir a digestibilidade. A única dieta que resultou em redução na contagem de alguns grupos de bactéria do TGI nos cães adultos, o que demonstra a maior susceptibilidade desses animais as fontes de fibra da ração.

A dieta com farelo de soja e baixa inclusão de farinha de víscera promoveu aumento de AGV totais, AGCC totais, lactato e diminuição de AGCR totais e amônia, características desejáveis para a manutenção da saúde do TGI, além de uma boa digestibilidade. O farelo de soja ainda resultou no aumento de IgA fecal e menor inflamação do trato gastrointestinal de cães idosos, resultados esses que parecem ser favoráveis a saúde intestinal desses animais.

Esses dados implicam na necessidade de mais estudos em relação às diferenças fisiológicas entre cães adultos e idosos, além da interação idade e macronutrientes da dieta sobre a saúde intestinal de cães.

8. Referências

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). **Official Publication 2010**. Association of American Feed Control Officials.

Association of Official Analytical Chemists, 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Washington, DC, USA.

BLOUNT, D. G.; PRITCHARD, D. I.; HEATON, P. R. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 399-407, 2005.

BOURRIAUD, C.; ROBINS, R. J.; MARTIN, L.; KOZLOWSKI, F.; TENAILLEAU, E.; CHERBUT, C.; MICHEL, C. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 201–212, 2005.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY JUNIOR, G. C. Psyllium and methylcellulose fermentation properties in relation to insoluble and soluble fiber standards. **Nutrition Research**, v. 17, p. 619-629, 1997.

Carciofi, A. C.; Pontieri, R.; Cristiana Fonseca Ferreira, Prada, F. Avaliação de dietas com diferentes fontes protéicas para cães adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35 (n.3), p. 754-760, 2006.

CARCIOFI, A. C.; TAKAKURA, F. S.; OLIVEIRA, L. D.; TESHIMA, E.; JEREMIAS, J. T.; BRUNETTO, M. A. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and postprandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.92, p. 326-336, 2008.

CLAPPER, G. M.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; RUSSETT, J. C.; BRENT JUNIOR, J. L.; FAHEY JUNIOR, G. C. Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affected by soybean protein inclusion in dry, extruded diets. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1523-1532, 2001.

CONWAY, P. L. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. **European Association for Animal Production Publication**, v. 2, p. 231-240, 1994.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 443–459, 1991.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; LIN, D. H. Nutrition and the immune system of the gut. **Nutrition**, v. 14, p. 573-579, 1998.

DAY, M. J. Ageing, immunosenescence and inflammaging in the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, p. S60-S69, 2010.

DAY, M. J.; BILZER, T.; MANSELL, J.; WILCOCK, B.; HALL, E. J.; JERGENS, A.; MINAMI, T.; WILLARD, M.; WASHBAU R. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: A report from the world small animal veterinary association gastrointestinal standardization group. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, p. S1- S43, 2008.

DROCHNER, W.; MEYER, H. Digestion of organic matter in the large intestine of ruminants, horses, pigs and dogs. **Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 22, p.18-40, 1991.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1768-1771, 1961.

FAHEY JUNIOR, G. C.; MERCHEN, N. R.; CORBIN, J. E.; HAMILTON, A. K.; SERB, K. A.; LEWIS, S. M.; HIRAKAWA, D. A. Dietary fiber for dogs: 1. effects of graded levels of dietary beet pulp on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy and digesta mean retention time. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4221-4228, 1990.

FAHEY JUNIOR, G. C.; BARRY, K. A.; SWANSON, K. S. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. **The Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 425-445, 2008.

FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. The European Pet Food Industry Federation, Bruxelles, 2008.

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

FÉLIX, A. P.; CARVALHO, M. P.; ALARCA, L. G.; BRITO, C. B. M.; OLIVEIRA, S. G.; MAIORKA, A. Effects of the inclusion of carbohydrases and different soybean meals in the diet on palatability, digestibility and faecal characteristics in dogs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, p. 182– 189, 2012.

FISCHER, M. M.; KESSLER, A. M.; SÁ, L. R. M.; VASCONCELLOS, R. S.; ROBERTI FILHO, F. O.; NOGUEIRA, S. P.; OLIVEIRA, M. C. C.; CARCIOFI, A. C. Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2233-2245, 2012.

GERMAN, A. J.; HALL E. J.; DAY, M. J. Analysis of leukocyte subsets in the canine intestine. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p.129–145, 1999.

GOMES, M. O. S. **Microbiota fecal, produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa gastrointestinal e imunidade de cães beagle de diferentes grupos etários**. 2013. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

GOMES, M. O. S.; BERALDO, M. C.; PUTAROV, T. C.; BRUNETTO, M. A.; ZAINE, L.; GLORIA, M. B. A.; CARCIOFI, A. C. Old beagle dogs have lower fecal concentrations of some fermentation products and lower peripheral lymphocyte counts than young adult beagles. **British Journal of Nutrition**. v. 106, p. S187-S190, 2011.

GREELEY, E. H.; BALLAM, J. M.; HARRISON, J. M.; KEALY, R. D.; LAWLER, D. F.; SEGRE, M. The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador retriever dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, p. 57-71, 2001.

GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BRUCE, K. J.; PATIL, A. R.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L.; FAHEY JUNIOR, G. C. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan oligosaccharides. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58 (6), p. 483–493, 2004.

HALLMAN, J. E.; MOXLEY, R. A.; REINHART, G. A.; WALLACE, E. A. Cellulose, beet pulp and pectin/gum arabic effects on canine colonic microstructure and histopathology. **Veterinary Clinical Nutrition**, v. 2, p. 137-142, 1995.

HARPER, E. J. Changing perspectives on aging and energy requirements: aging and digestive function in humans, dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 2632S-2635S, 1998.

HEATON, P. R.; BLOUNT, D. G.; DEVLIN, P.; KOELSCH, S.; MANN, S. J.; SMITH, B. H.; STEVENSON, J.; HARPER, E. J. Assessing age-related changes in peripheral blood leukocyte phenotypes in labrador retriever dogs using flow cytometry. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1655-1657, 2002.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science, Madison**. v. 25, p. 1306-1311, 1993.

HOPKINS, M. J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G. T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16s rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. **Gut**, v. 48, p. 198-205, 2001.

HUSSEIN, S. H.; SUNVOLD, G. D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: REINHART, G.A., CAREY, D.P. **Recent advances in canine and feline nutrition**. Wilmington: Orange Frazer Press, v.3, p.153-168, 2000.

KEARNS, R. J.; SUNVOLD, G. D. Microbial changes in aged dogs. In: REINHART, G. A.; CAREY, D. P. **Recent Advances in Canine and Feline Nutrition**, Vol. II. Wilmington, OH: Orange Frazer Press. 1998, p. 337-351.

KIRK, C. A.; DEBRAEKELEER, J.; ARMSTRONG, P. J. Normal cats. In: Hand M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBOUSH, P.; NOVOTNY, B. J. **Small animal clinical nutrition**, Topeka: Mark Morris Institute, fourth edition. 2000, p. 343-413.

KLEINSCHMIDT, S.; MENESES, F.; NOLTE, I.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Distribution of mast cell subtypes and immune cell populations in canine intestines: evidence for age-related decline in T cells and macrophages and increase of IgA-positive plasma cells. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 41-48, 2008.

KUZMUK, K. N.; SWANSON, K. S.; TAPPENDEN, K. A.; SCHOOK, L. B.; FAHEY JR., G. C. Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1940-1945, 2005.

LAFLAMME, D. P. Nutrition for Aging Cats and Dogs and the Importance of Body Condition. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, p. 713-742, 2005.

LAFFLAME, D. P. Nutritional Care for Aging Cats and Dogs. **Veterinary Clinical Small Animal**. v. 42, p. 769–791, 2012.

LOUIS, P.; SCOTT, K. P.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1197–1208, 2007.

MIDDELBOS, I. S.; FASTINGER, N. D.; FAHEY JUNIOR, G. C. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3033–3044, 2007

NRC - National Research Council (US) Ad Hoc Committee on Dog and Cat Nutrition: Nutrient Requirements of Dogs and Cats, Rev. National Academies Press, Washington, DC. 2006.

PÉREZ-CAMARGO, G. Cat nutrition: what is new in the old? **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 26 (Suppl.2A), p. 5-10, 2004.

PETERS, I. R.; CALVERT, E. L.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Measurement of Immunoglobulin Concentrations in the Feces of Healthy Dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 841-848, 2004.

PINTO, M. V. P. **Utilização digestiva de dietas com diferentes fontes de fibras e determinação de curvas glicêmicas em cães adultos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. **Basic animal nutrition and feeding**, 4th ed. New York: John Wiley, 1995. 615p.

PROSKY, L.; ASP, N. G.; FURDA, I.; DEVRIES, J. W.; SCWEIZER, T. F.; HARLAND, B. F.; Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: Collaboratives study. **Journal AOAC International, Galthersburg**, v. 75, n. 2, p. 360-367, 1992.

PRYCE, J.D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **The Analyst**. v. 94, p. 1121-1151, 1969.

REIS, A. B.; CARNEIRO, C. M.; CARVALHO, M. D. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 103, 173e185.

ROEDIGER, W. E. The starved colon-diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 33, p. 858-870, 1990.

SÁ, L. R. M. **Síndrome de emagrecimento progressivo dos calitriquídeos – processo de má absorção semelhante à doença celíaca humana – caracterização clínica, laboratorial e anatomopatológica**. 2004. 186p. Tese (Doutorado em Patologia experimental e comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SAUNIER, K.; DORÉ, J. Gastrointestinal tract and the elderly: functional foods, gut microflora and healthy ageing. **Digestive and Liver Diseases**, v. 34 (Suppl.2), p. S19-S24, 2002.

SHEFFY, B. E.; WILLIAMS, A. J.; ZIMMER, J. F.; RYAN, G. D. Nutrition and metabolism of the geriatric dog. **Cornell Veterinarian**, v. 75, p. 324-347, 1985.

SILVA, F. L. **Emprego de fibra de cana de açúcar na alimentação de cães**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SILVA, V. K. **Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

SIMPSON, J. M.; MARTINEAU, B.; JONES, W. E.; BALLAM, J. M.; MACKIE, R. I. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed, and dietary fiber. **Microbial Ecology**, v. 44: p.186-197, 2002.

STOKES, C.; WALY, N. Mucosal defense along gastrointestinal tract of cats and dogs. **Veterinary Research**. v. 37, p. 281-293, 2006.

STRASSER, A.; TELTSCHER, A.; MAY, B.; SANDERS, C.; NIEDERMULLER, H. Age-associated changes in the immune system of German shepherd dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology and Pathology**, v. 47, p. 181-192, 2000.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R.; FAHEY, G. C.Jr. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 980-989, 2002.

SWANSON, K. S.; KUZMUK, K. N.; SCHOOK, L. B.; FAHEY JUNIOR, G. C. Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1713-1724, 2004.

TAYLOR, E. J.; ADAMS, C.; NEVILLE, R. Some nutritional aspects of ageing in dogs and cats. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, p. 645-656, 1995.

TESHIMA, E.; BRUNETTO, M. A.; VASCONCELLOS, R. S.; GONÇALVES, K. N. V.; DE-OLIVEIRA, L. D.; VALÉRIO, A. G.; CARCIOFI, A. C. Nutrient digestibility, but not mineral absorption is age-dependent in cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 251-258, 2010.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 9, p. 107–116, 2010.

TORTOLA, L.; SOUZA, N. G.; ZAINÉ, L.; GOMES, M. O. S.; MATHEUS, L. F. O.; VASCONCELLOS, R. S.; PEREIRA, G. T.; CARCIOFI, A. C. Enzyme effects on extruded diets for dogs with soybean meal as a substitute for poultry by-product meal. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p.39-50, 2012.

VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes.** 1980. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1980.

WOODMANSEY, E. J. Intestinal bacteria and ageing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1178–1186, 2007.

ZAINE, L.; SILVA, C. F.; GOMES, M. O. S.; MONTI, M.; TORTOLA, L.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. C.. Faecal IgA concentration is influenced by age in dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S183-S186, 2011.

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T.; BALLÈVRE, B.; ROCHAT, F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.87, p.397–407, 2003a.

ZIEGLER, T.R.; EVANS, M.E.; ESTÍVARIZ, C.F.; JONES, D.P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 229- 261, 2003.

ZUO, Y.; FAHEY, JUNIOR, G. C.; MERCHEN, N. R.; BAIJALIEH, N. L. Digestion Responses to Low Oligosaccharide Soybean Meal by Ileally-Cannulated Dogs. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2441–2449, 1996.

9. Apêndices

Apêndice A: Análise histológica da mucosa de estômago de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Idade	Dietas			Valor P
		FC	PBe	FS	
Hiperplasia linfociliar	Adulto	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	>0,05
	Idoso	1 (0 – 2)	0 (0 – 3)	0 (0 – 0)	
Linfócitos intraepiteliais	Adulto	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	>0,05
	Idoso	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	
Linfócitos e plasmócitos	Adulto	0 (0 – 2) ^{ba}	0 (0 – 0) ^{baB}	0 (0 – 1) ^{baB}	<0,05
	Idoso	1 (0 – 3) ^{aA}	1 (0 – 2) ^{aAB}	0 (0 – 1) ^{aB}	

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Comparação válida para uma mesma variável; ^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Apêndice B: Análise histológica da mucosa do intestino delgado de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Idade	Dietas			Valor P
		FC	PBe	FS	
Relação Vilo/Cripta	Adulto	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	>0,05
	Idoso	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	
Linfócitos intraepiteliais	Adulto	0 (1 – 1)	0 (1 – 1)	0 (0 – 1)	>0,05
	Idoso	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (1 – 1)	
Linfócitos e plasmócitos	Adulto	1 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	>0,05
	Idoso	1 (0 – 1)	1 (1 – 1)	0 (0 – 1)	

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Apêndice C: Análise histológica da mucosa do intestino grosso de cães de dois grupos etários alimentados com dietas com diferentes fontes de fibra e proteína. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Idade	Dietas			Valor P
		FC	PBe	FS	
Dilatação das criptas	Adulto	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	>0,05
	Idoso	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	
Redução caliciforme	Adulto	0 (0 – 1) ^b	0 (0 – 0) ^b	0 (0 – 1) ^b	<0,05
	Idoso	1 (0 – 1) ^a	1 (0 – 1) ^a	0 (0 – 0) ^a	
Linfócitos intraepiteliais	Adulto	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	>0,05
	Idoso	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	
Linfócitos e plasmócitos	Adulto	0 (0 – 1) ^b	0 (0 – 1) ^b	0 (0 – 0) ^b	<0,05
	Idoso	1 (0 – 1) ^a	1 (0 – 1) ^a	0 (0 – 1) ^a	

¹ FC: dieta com fibra de cana e farinha de vísceras de frango; PBe: dieta com de polpa de beterraba e farinha de vísceras de frango; FS: dieta com 30% de farelo de soja em substituição parcial a farinha de vísceras de frango;

^{a, b} Médias na coluna sem uma letra minúscula em comum são diferentes (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05). Comparação válida para uma mesma variável;

^{A, B, C} Médias nas linhas sem uma letra maiúscula em comum são diferentes (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).