

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DERIVADOS DE PAREDE  
CELULAR DE LEVEDURA DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharomyces cerevisiae*) SOBRE A RESPOSTA IMUNE DE  
CÃES ADULTOS.**

**Leandro Zaine**

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DERIVADOS DE PAREDE  
CELULAR DE LEVEDURA DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharomyces cerevisiae*) SOBRE A RESPOSTA IMUNE DE  
CÃES ADULTOS.**

**Leandro Zaine**

**Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi**

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

Z21a Zaine, Leandro  
Avaliação do efeito de derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre a resposta imune de cães adultos / Leandro Zaine. -- Jaboticabal, 2010  
xi, 68 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010  
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi  
Banca examinadora: Helio Jose Montassier, Iracilda Zeppone Carlos  
Bibliografia

1. Beta-glucano. 2. Parede celular de levedura 3. Imunidade. 4. Cães. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.39:636.7



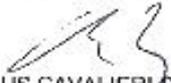
### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DERIVADOS DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharomyces cerevisiae*) SOBRE A RESPOSTA IMUNE DE CÃES ADULTOS.

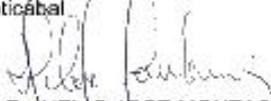
**AUTOR:** LEANDRO ZAINE

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

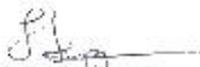
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
 Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

Departamento de Clin e Cir Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
 Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
 Profa. Dra. IRACILDA ZEPPONE CARLOS

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Araraquara

Data da realização: 23 de fevereiro de 2010.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LEANDRO ZAINÉ** – Nascido em 16 de junho de 1983, em Rio Claro, estado de São Paulo, filho de José Eduardo Zaine e Mariselma Ferreira Zaine, tornou-se graduado em Medicina Veterinária, em dezembro de 2006, pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – em Araçatuba, SP. Durante o curso de graduação, foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – na área de imunologia veterinária, de 2004 a 2005. Após completar a graduação, foi bolsista pela Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão – FUNEP – no ano de 2007, desenvolvendo projetos relacionados a nutrição de cães e gatos, em parceria com empresas privadas, sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Obteve a primeira colocação no processo seletivo do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, curso de mestrado, iniciando-o em março de 2008 sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, tendo neste período ministrado várias palestras relacionadas à nutrição de cães e gatos.

**OFEREÇO**

Aos meus pais, José Eduardo e Mariselma, pela grande confiança e admiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida. Por tudo que passei nesses dois anos, coisas boas e ruins. Pelo privilégio de tantas graças e bênçãos por ter chegado até aqui. Também por tantas dificuldades, que apesar de às vezes parecer sozinho, com um Deus adormecido diante dos problemas, Ele se mostra presente no barco da minha vida, pedindo que eu creia que Ele pode acalmar as tempestades.

Agradeço também a meus pais, José Eduardo e Mariselma, pelo apoio em toda a vida de estudo. Pelo amor e compreensão, por ver um filho formado ainda não entrar no mercado de trabalho.

À minha família como um todo, por sempre ser uma força de apoio e compreensão. À minha avó Lígia e meu avô Dito, meus irmãos Gabriel e Daniel, meus primos Raphael e Renato. Todos que me acompanharam de perto em muitas etapas importantes da vida.

À minha namorada Chayanne, pelo amor, paciência e dedicação. Por sempre estar junto comigo, nas conquistas e também nas dificuldades, me ajudando a caminhar com mais sentido.

Aos meus amigos por serem minha segunda família, por muitos momentos de união e ajuda mútua.

À Letícia, pela grande parceria em vários aspectos da vida, por sua colaboração com tantos aspectos do meu crescimento.

Meus grandes amigos, Guilherme e Pedro, pelo companheirismo, conversas e risadas em Jaboticabal.

Ao Marcus e Igor, grandes amigos e parceiros na fé.

À corrente da felicidade, representada pelo Pano e Hení, com elos fortes vamos realizando nossas conquistas.

Às minhas grandes amigas, Natália e Vanessa, apesar de não nos encontrarmos muito, sempre expressaram muito respeito e admiração por mim, assim como expresso por vocês.

A meus grandes amigos desde o tempo da faculdade, Bia, Gustavo e Rafael, a presença de vocês sempre é importante, que possamos manter esse contato próximo sempre.

A tantos outros amigos também, da república, André, Dedo, Viçosa, Miguel, Evandro, Daniel, Luis Guilherme, Beto, Lingüiça, Pedro Paulo, Márcio e Guido, e também à Edna e Raquel, pelo companheirismo e convivência nestes anos. Especialmente à Cida, por todos os cuidados e paciência.

À Santa Igreja, pela paz, consolo, alegria e caminhada na fé. Representada pelo Padre Paulo, por tantas conversas e por mostrar de forma tão admirável como a ação de Deus se aplica à vida de forma simples, no Seu plano de felicidade para nós.

Às minhas grandes irmãs Carmelitas, Davina, Edna, Margareth, Maria do Carmo, Marlene, Silvana, Solange, Sônia, Vera, e especialmente Teresinha, pelo acolhimento, orações, fé e perseverança.

Ao professor Aulus, pelo exemplo de dedicação ao trabalho, grande critério nas pesquisas e a simplicidade na relação com as pessoas. Agradeço pela confiança na orientação, desde os projetos de 2007 e por expressar o desejo em continuar essa parceria para o doutorado.

À professora Iracilda Zeppone Carlos, pelas grandes contribuições na banca de defesa e também pela oportunidade de uso do laboratório de Imunologia para desenvolvermos nossas técnicas.

Também, aos pós-doutorandos da Unesp Araraquara, Luis Gustavo e Danielle, pela imensurável ajuda e por possibilitarem a realização de técnicas avançadas de avaliação.

A todos os colegas pós-graduandos do Laboratório de nutrição, Raquel, Letícia, Márcio, Eliana, Sandra, Márcia, Juliana, Guilherme, Fabiano, Íris, Mariana, Thaila, Flávio, Michele, pela convivência nesses anos. Especialmente ao Ricardo, pela parceria no desenvolvimento e realização das técnicas.

Aos funcionários, que sem eles nada seria possível. Obrigado, Jhones, Marcão, Diego, e Renata. À Cláudia pelo auxílio em tantas análises, e especialmente à Elaine pelo cuidado, amor e dedicação aos animais.

Também a todos estagiários que participaram ativamente desse trabalho: Fernando, Danilo, Victor, Chayanne, Mayara, Mariana, Marina, Carol, Ana Paula, Bruna, Natalie. Sem a ajuda de vocês seria muito difícil conduzir o experimento.

À equipe do laboratório de Patologia Clínica pela realização dos hemogramas e exames bioquímicos. Agradeço ao Eugênio, Matheus, Andressa, Alessandra e estagiários. Também às pós-graduandas por me auxiliarem na marcação de células, Flávia, Maria Luisa, Mariana e Aline.

A todos professores que participaram ativamente no aprimoramento do projeto. Ao prof. Gener pelas intermináveis análises estatísticas. Ao prof, Aureo pela participação na banca da qualificação e disponibilização de seu laboratório. Ao prof. Hélio pela participação nas bancas de qualificação e defesa. À professora Beatriz Medeiros, pelos conhecimentos de imunologia e pela ajuda no aprimoramento da metodologia.

À professora Rosângela por ceder o laboratório e os conhecimentos para auxiliar nas dosagens. Também aos seus pós-graduandos, Carla, Marcos, Meire, Márcia e à graduanda Tatiane, pela grande ajuda nos procedimentos.

À Mogiana Alimentos (Guabi) pela construção e manutenção da estrutura do Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”. Também pela doação dos ingredientes para a fabricação das rações.

À Biorigin pelo suporte financeiro à pesquisa, todo apoio e confiança.

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

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- AAFCO** - Association of American Feed Control Officials
- ALT** - Alanina aminotransferase
- ANOVA** – Análise de variância (*analysis of variance*)
- BG** – Beta-glucano
- BG1** - Beta-glucano – fonte 1
- BG2** - Beta-glucano – fonte 2
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CR3** – Receptor DE Complemento 3
- FA** - Fosfatase alcalina
- FHG** - Fitoemaglutinina
- FITC** – Isotiocianato de fluoresceína
- FOS** – Frutoligossacarídeos
- GOS** - Glucoligossacarídeos
- HRP** - Horseradish peroxidase
- IBDV** – Infectious Bursal Disease Virus
- IFN- $\gamma$**  – Interferon gama
- IgA** – Imunoglobulina A
- IgM** – Imunoglobulina M
- IL** – Interleucina
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MOS** - Mananoligossacarídeos
- NO** – Óxido nítrico
- NRC** - National Research Council
- PBS** – Tampão fosfato-salino (*Phosphate buffered saline*)
- PCL** – Parede celular de levedura
- PE** – Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
- Th1** – Resposta T helper tipo 1
- Th2** – Resposta T helper tipo 2
- TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                      | 2  |
| 3. OBJETIVOS .....  | 9  |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 10 |
| 4.1. Animais .....  | 10 |
| 4.2. Ingredientes e dietas experimentais .....                      | 10 |
| 4.3. Delineamento experimental .....                                | 14 |
| 4.4. Hemograma e exames bioquímicos .....                           | 15 |
| 4.5. Vacinação e dosagem de anticorpos .....                        | 16 |
| 4.6. Imunofenotipagem .....   | 17 |
| 4.7. Avaliação da concentração de IgA nas fezes .....               | 19 |
| 4.8. Teste de hipersensibilidade tardia .....                       | 20 |
| 4.9. Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular ..... | 21 |
| 4.10. Análise estatística .....                                     | 22 |
| 5. RESULTADOS .....   | 23 |
| 5.1. Hemograma e exames bioquímicos .....                           | 23 |
| 5.2. Dosagem de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> .....            | 30 |
| 5.3. Imunofenotipagem .....   | 31 |
| 5.4. Avaliação de IgA nas fezes .....                               | 39 |
| 5.5. Teste de hipersensibilidade tardia .....                       | 40 |
| 5.6. Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular ..... | 43 |
| 6. DISCUSSÃO .....  | 45 |
| 7. CONCLUSÃO .....  | 50 |
| 8. REFERÊNCIAS .....  | 51 |
| ANEXO 1 .....   | 57 |

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DERIVADOS DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharomyces cerevisiae*) SOBRE A RESPOSTA IMUNE DE CÃES ADULTOS**

**RESUMO** – Vários derivados da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* conhecidamente agem sobre a imunidade, no entanto a ação, especialmente da fração beta-glucano, foi pouco demonstrada em cães. Para o estudo dos possíveis efeitos sobre a imunidade na espécie canina foram empregadas quatro dietas isonutrientes, contendo uma fonte de parede celular de levedura (PCL), duas fontes de beta-glucano (BG1 e BG2) e uma dieta controle (CT). Foram utilizados 24 cães da raça beagle, adultos, divididos em quatro grupos de seis animais. As dietas foram fornecidas por um período total de 126 dias e as avaliações incluíram hemograma e avaliações bioquímicas, dosagem de anticorpos anti-*Leptospira*, imunofenotipagem de linfócitos sanguíneos, avaliação da concentração de IgA em fezes, teste de hipersensibilidade cutânea tardia e dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular. Os animais foram submetidos a desafio antigênico com vacina contra leptospirose no dia 42. Os dados foram avaliados pelo procedimento GLM do SAS, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,1$ ). Nos exames bioquímicos houve discreta variação entre os tratamentos e ao longo dos dias. No hemograma notou-se aumento dos linfócitos para BG2. A dosagem de anticorpos anti-*Leptospira*, mostrou baixos títulos, não havendo boa resposta à vacinação. A imunofenotipagem revelou um aumento dos linfócitos T totais, T *helper*, T citotóxicos e linfócitos B no grupo BG2 e de linfócitos T citotóxicos e linfócitos B para o grupo PCL. Apesar da variação da concentração de IgA fecal ao longo dos dias, os tratamentos não influenciaram tais parâmetros. O teste de hipersensibilidade cutânea tardia mostrou um aumento na resposta à inoculação da vacina, para os grupos PCL e BG2. Na dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura celular, apenas foi observada diferença na quantificação de TNF- $\alpha$ , sendo BG2 maior que CT. Concluiu-se que a parede celular e a fração beta-glucano agem sobre a imunidade de cães.

**PALAVRAS-CHAVE:** beta-glucano, citometria de fluxo, imunidade, mananoglicosídico, fator de necrose tumoral alfa.

**EVALUATION OF EFFECTS OF SUGAR CANE YEAST CELL WALL  
(*Saccharomyces cerevisiae*) PRODUCTS ON THE IMMUNE RESPONSE OF ADULT  
DOGS**

**SUMMARY** – Some products from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are known to act on the immunity, however this action, especially of the beta-glucan fraction, has never been demonstrated in dogs. To study these effects on the immunity of dogs four isonutrient diets were made, containing one source of yeast cell wall (YCW), two sources of beta-glucan (BG1 and BG2) and a control diet (CT). 24 adult beagle dogs were used, divided in four groups of six animals. Diets were given for a 126 days period. Evaluations included complete blood count and biochemistry profile, quantification of antibodies against *Leptospira*, immunophenotyping of blood lymphocytes, IgA concentration in feces, delayed-type hypersensitivity test and quantification of cytokines in cell culture supernatant. Animals were exposed to antigen challenge, by the vaccine against leptospirosis on day 42. Data were analyzed by the GLM procedure of the SAS software and the means were compared by the Tukey test ( $p < 0,01$ ). Biochemistry profile showed slight differences among the groups. A increase in lymphocyte count was observed for BG2 treatment. Quantification of antibodies against *Leptospira* showed low titles, with poor response to vaccination. Immunophenotyping revealed an increase during the time in total T cells, helper and cytotoxic T cells, and B lymphocytes for BG2 and of cytotoxic T cells and B lymphocytes for YCW group. Despite the variation in fecal IgA concentration during the time, treatments did not influence these parameters. Delayed-type hypersensitivity test showed an increased response to the vaccine inoculation, for YCW and BG2 groups. In the quantification of cytokines in cell culture supernatant the only difference observed was in TNF- $\alpha$  concentration, being BG2 higher than CT. We concluded that both yeast cell wall and beta-glucan fraction act on dogs' immunity.

**KEYWORDS:** beta-glucan, flow cytometry, immunity, mannan oligosaccharide, tumor necrosis factor-

## 1. INTRODUÇÃO

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

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

Derivados da parede celular de levedura têm sido reconhecidos como detentores de algumas dessas propriedades. No entanto, seu efeito sobre a imunidade está diretamente relacionado a qual componente da estrutura da levedura se está empregando.

Na literatura consultada verifica-se, ainda, certa confusão e controvérsia sobre quais são os componentes ativos da parede celular e como agem na imunidade dos animais. Os termos prebióticos, parede celular de levedura, mananoligossacarídeos, mananos e glucanos não são bem distinguidos, gerando dúvidas sobre qual ingrediente foi empregado nos estudos e o efeito que, realmente, cada um promove no organismo. Desta forma, é importante se fazer diferenciação e classificação dos mesmos, para que os trabalhos possam realmente comparar e compreender essas substâncias.

Os prebióticos podem ser definidos como compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas que são seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal. Tais compostos podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (GIBSON & ROBERFROID, 1995; PELÍCIA et al., 2004). Os

componentes mais estudados na alimentação animal são os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS).

A célula da levedura possui vários componentes, destacando-se os derivados de sua parede celular como os mais pesquisados em relação à ação sobre a imunidade. A parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* é composta, aproximadamente, por 29% de glucanos, 30% de mananos, 13% de proteínas, 8,5% de lipídios e 1% de quitina (ROBINOW & JOHNSON, 1991). Os componentes restantes da levedura, após extração da parede celular, são, coletivamente, chamados extrato celular de levedura e contêm numerosos nucleotídeos, enzimas, vitaminas e minerais.

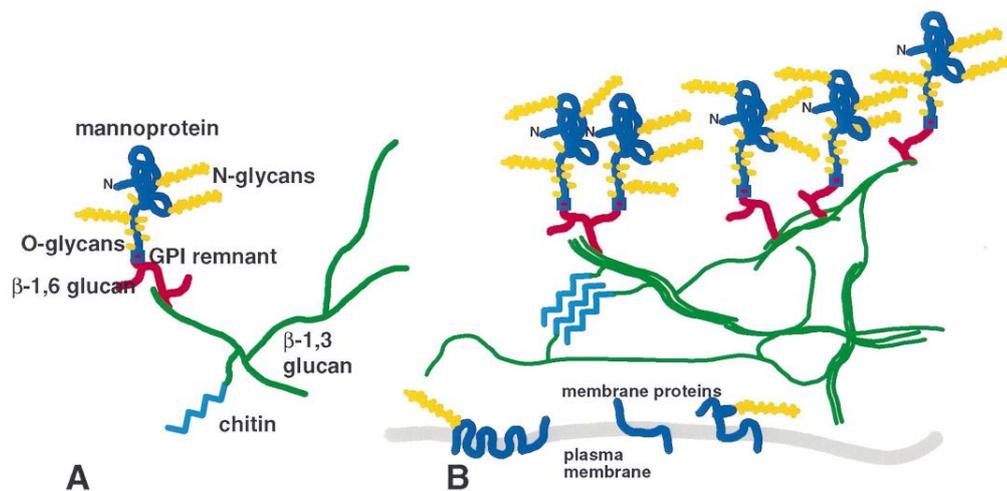
Verifica-se, pela literatura, que o efeito prebiótico atribuído aos MOS, constatado em várias publicações, resultou, na verdade, da adição de parede celular, podendo ter sido resultado da ação sinérgica de vários componentes que a constituem. Assim, o termo mais correto, que será empregado neste trabalho, é parede celular de levedura (PCL). O componente beta-glucano, extraído da PCL, é um ingrediente especialmente rico na fração glucano da parede celular de levedura, obtido por purificação industrial, representando um composto bastante promissor na imunomodulação de cães, tal como em outros mamíferos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A parede celular de leveduras (Figura 1), como a *Saccharomyces cerevisiae*, é constituída de mananoproteínas,  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucano e quitina (LIPKE & OVALLE, 1998). Enquanto os  $\beta$ -glucanos e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem sua morfologia e forma, as manonoproteínas e sua porção de carboidrato ( $\alpha$ -d-manano) são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio e determinam a especificidade antigênica da levedura (RUIZ-HERRERA, 1992).

Ambos os tipos de polissacarídeos constituintes principais da parede celular,  $\beta$ -glucanos e  $\alpha$ -mananos, têm sido reconhecidos como capazes de modular pronunciadamente o sistema imune por meio de interações específicas com várias

células imunocompetentes (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). As superfícies mucosas, incluindo a gastrointestinal, nasal e broncoalveolar, representam parte do corpo do animal que está permanentemente exposta à agressão de patógenos e toxinas. Dessa forma, a adequada manutenção do sistema imune associado às mucosas representa uma tarefa crucial na proteção da saúde (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2002; KOGAN & KOCHER, 2007).



**Figura 1.** Estrutura da parede celular de *S. cerevisiae*. (A) Protótipo com os componentes individualmente nomeados e coloridos. O polipeptídeo de manoproteína está em azul, os oligossacarídeos em amarelo, nomeados como ligados a N ou O. Poucas das ramificações de glucanos estão demonstradas. A quitina também pode estar ligada ao  $\beta$ -1,6-glucano. (B) Associação das partes para formar a parede celular. As cores são iguais às do painel A. As cadeias de  $\beta$ -1,3-glucano são interligadas para formarem triplas hélices (LIPKE & OVALLE, 1998).

Reconhece-se que a fração mananoligossacarídeos da parede celular de levedura tem um efeito prebiótico, não sendo digerida pelo organismo animal e sendo fermentada seletivamente no intestino grosso, estimulando o crescimento e/ou a atividade metabólica de um grupo restrito de bactérias que agem benéficamente no trato digestório. Isto contribui de várias maneiras para a saúde, aumentando a microbiota benéfica, diminuindo as patogênicas e promovendo a aglutinação de patógenos (GOMES, 2008; SWANSON et al., 2002).

Além do efeito sobre a microbiota intestinal, a suplementação de PCL pode atuar sobre vários parâmetros do sistema imune. Swanson et al. (2002) demonstraram esta ação sobre a imunidade em cães. O consumo de PCL levou ao aumento na concentração sérica de IgA e na porcentagem de linfócitos sanguíneos, quando consumido juntamente com frutoligossacarídeos levou a aumento de IgA ileal. No trabalho de Gomes (2008) a quantificação imunofenotípica de linfócitos sanguíneos revelou aumento nas populações de células CD5+ e CD21+.

Em outras espécies estes efeitos também já foram bastante relatados. Em leitões recém-desmamados, a suplementação com PCL (1 g/kg de alimento) levou à melhora da resposta imune específica e inespecífica, quando estes animais foram submetidos a desafios antigênicos (NOCHTA et al., 2008). Vacas suplementadas com PCL (10 gramas por animal) tiveram aumento da resposta imune contra rotavírus, além de ter tendência de aumentar a transferência de anticorpos anti-rotavírus aos bezerros (FRANKLIN et al., 2005).

Efeitos da PCL também são descritos em aves e peixes. Em galinhas matrizes a suplementação levou ao aumento da resposta de anticorpos contra IBDV (SHASHIDHARA & DEVEGOWDA, 2003). Em trutas arco-íris, efeitos sobre a imunidade também foram observados, com aumento da concentração sérica de lisozima e na ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento (STAYKOV et al., 2007).

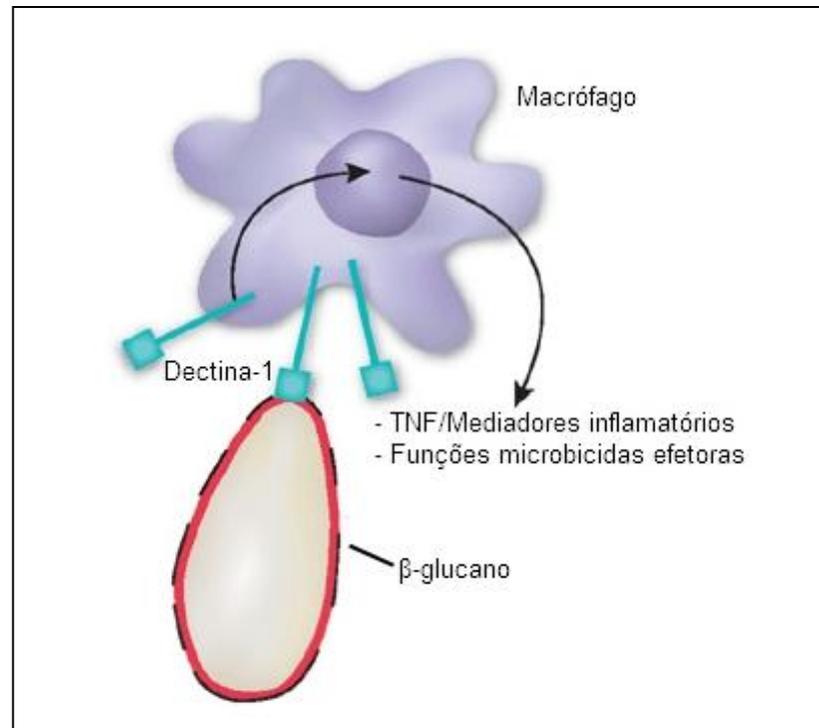
A fração beta-glucano da PCL também parece atuar de maneira específica sobre a imunidade. Os beta-glucanos (BGs) possuem várias propriedades imunomodulatórias. Eles agem por estimulação do sistema imune, principalmente em macrófagos, exercendo efeito benéfico contra uma variedade de bactérias, vírus, fungos e parasitas (HUNTER; GAULT; BERNER, 2002; MANTOVANI et al., 2007). Essa imunoestimulação pode levar a aumento na proteção contra infecções oportunistas (CROSS et al., 2001).

Seu efeito imunoestimulante está relacionado à interação com receptores específicos presentes no sistema imune (Figura 2). Alguns receptores estão implicados no reconhecimento destas substâncias, entre eles o dectina-1 e o CR3. O receptor dectina-1 reconhece uma variedade de glucanos de fungos e plantas com ligações  $\beta$ -

1,3 e  $\beta$ -1,6. Este receptor não reconhece monossacarídeos ou carboidratos com ligações diferentes, ele possui dois sítios de ligação, um reconhece ligantes endógenos de células T e o outro, carboidratos exógenos. Tais receptores estão também relacionados ao reconhecimento e fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* íntegro (BROWN & GORDON, 2001).

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

O receptor de complemento 3 (CR3), também ligado aos beta-glucanos, tem também atuação em células do sistema imune. Esta ligação pode promover a adesão de neutrófilos a células tumorais opsonizadas com complemento e induzir à citotoxicidade dos neutrófilos (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009).



**Figura 2.** Interação de partícula de  $\beta$ -glucano com o receptor dectina-1 em macrófago. Adaptado de Hohl & Pamer (2006).

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

É imprescindível se considerar a forma do BG, pois é ela que determina seus efeitos. Enquanto várias formas solúveis e particuladas de beta-glucanos são utilizadas em aplicações farmacêuticas, preparações particuladas de beta-glucano derivadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são usadas em diversos suplementos nutricionais, com objetivo de imunomodulação (HUNTER; GAULT; BERNER, 2002). Por outro lado, as formas solúveis, principalmente o beta-1,4-glucano obtido a partir de vegetais como a aveia, tem efeitos diferentes dos provenientes de fungos. Descreve-se que essas formas podem ter efeitos na redução do colesterol sanguíneo e da glicemia (KIM, S. et

al., 2006), sendo considerados, também, fatores anti-nutricionais por interferirem negativamente na digestibilidade e desempenho dos animais, sem, contudo, apresentarem nenhum efeito no sistema imune.

Assim como a PCL, muitos outros estudos têm abordado o uso de BG sobre a imunidade de humanos, animais de laboratório, animais de produção e, mais recentemente, em cães. Em frangos de corte, após 42 dias de suplementação com 400 g de BG por tonelada de ração obtido de uma fonte com mais de 40% de pureza, houve aumento nas contagens de células CD8 e TCR-I, apesar de não alterar significativamente a população de linfócitos B, células CD4, TCR-II e MHC de classe II. O grupo controle e uma dieta com metade desta dose não levaram a esses efeitos. O tratamento por tempo menor (28 dias) também não produziu o mesmo resultado (CHAE et al., 2006).

Outros experimentos com suplementação oral de BG mostraram resultados positivos. Quando camundongos receberam beta-1,3-glucano na dose de 80 mg/kg houve melhora na resposta proliferativa das células esplênicas a mitógenos de células B e células T, quando comparados ao grupo controle (SUZUKI et al., 1989). Também foi encontrado em camundongos estimulação de linfócitos T citotóxicos, células B e macrófagos, após suplementação oral (CROSS et al., 2001). Também nesta espécie, investigou-se a atividade estimuladora de glucanos com relação à resposta à vacinação anti-rábica experimental determinada pela administração de glucano. O que se encontrou foi um aumento da resistência à infecção e aumento da resposta imune, com maiores títulos de anticorpos. A melhor resposta deu-se com uma dose de 0,5 mg por via intra-peritoneal (TINO et al., 1993).

O BG também pode ter ação imunoestimulatória influenciando a secreção de citocinas pelas células do sistema imunológico. Em uma revisão de estudos em humanos e animais de laboratório, Kim, S. et al. (2006) relatam maior secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$  com injeção das formas beta-1,3 e/ou 1,6-glucano. Estas citocinas se ligam a receptores de glucanos nas membranas de neutrófilos e macrófagos que formam parte do sistema imune inato e suprimem a secreção de anion superóxido e de peróxido de hidrogênio por essas células e aumentam a atividade das células *natural killer*, contribuindo para seus efeitos germicidas e anti-carcinogênicos.

Berner et al. (2005) estudaram *in vitro* a influência do beta-1,3-glucano microparticulado sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos peritoneais de camundongos, demonstrando uma boa capacidade de fagocitose do glucano pelos macrófagos, que foram estimulados a secretar citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1.

Todas essas formas de estimulação da imunidade são mecanismos que podem auxiliar na resistência a infecções, conforme já demonstrado com infecções experimentais. Essas ações foram demonstradas contra leishmaniose visceral em hamsters. A administração intravenosa de glucano, antes ou depois da infecção por *Leishmania donovani*, suprimiu significativamente a proliferação de formas amastigotas do parasita no baço e no fígado. Macrófagos peritoneais glucano-ativados *in vitro* também reduziram a multiplicação do parasita intracelular. Estudos ultra-estruturais revelaram uma resposta hepática granulomatosa bem definida ao glucano, com hipertrofia das células de Kupffer e redução do número de parasitas intracelulares comparados ao grupo controle (COOK; HOLLBROOK; DOUGHERTY, 1982).

Estudos em roedores demonstraram efeito positivo da aplicação de lentinan (constituído de beta-1,3-glucano, obtido de cogumelos) em animais de laboratório experimentalmente infectados por *Listeria monocytogenes*. Após o tratamento, os macrófagos da medula óssea aumentaram a produção de óxido nítrico (NO) e aumentaram a atividade citotóxica contra *L. monocytogenes*. Nesses animais pôde-se observar aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  e do número de células T CD8 específicas contra *L. monocytogenes* no baço, indicando que a suplementação com lentinan aumenta esse tipo de imunidade celular (KUPFAHL; GEGINAT; HOF, 2006).

Em leitões recém-desmamados, a suplementação da dieta com BG foi efetiva no aumento da resistência à infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica. Estes animais tiveram redução da excreção fecal desta bactéria e diminuição significativa da diarreia (STUYVEN et al., 2009).

Recentemente, dois trabalhos avaliaram os efeitos da administração oral de beta-1,3/1,6-glucano sobre a imunidade de cães. Stuyven et al. (2010) avaliaram o uso de BG obtido de *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de tabletes (225 mg por cão), por

quatro semanas e encontraram efeitos sobre a imunidade humoral, com aumento de IgM sérica e diminuição de IgA no soro e nas mucosas.

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

Outros possíveis efeitos benéficos da suplementação com glucanos podem ainda ser considerados. É extensamente descrito seu efeito como agente que auxilia na terapia anti-tumoral, melhorando o efeito da quimioterapia e da radioterapia, além de ter efeitos positivos na sobrevivência e qualidade de vida de pacientes humanos com neoplasias (KIM, S. et al., 2006).

Apesar de tantos efeitos positivos investigados mediante ingestão de derivados de parede celular de levedura, poucos trabalhos abordaram mais claramente como estes efeitos são exercidos na espécie canina, especialmente para a fração beta-glucano. Com relação a esta fração este é o primeiro trabalho que avaliou sua ação na imunidade a partir de sua inclusão em alimento completo e balanceado, posteriormente extrusado.

### **3. OBJETIVOS**

Avaliar os efeitos da inclusão no alimento de parede celular de levedura spray-dry e dois preparados concentrados de beta-1,3/1,6-glucano sobre a imunidade inata e adaptativa (celular e humoral) de cães beagle adultos saudáveis.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no canil de pesquisas do Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Unesp, campus de Jaboticabal. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo número 021619/09.

### 4.1 Animais

Foram utilizados 24 cães da raça beagle adultos com idade média de  $6,2 \pm 0,4$  anos e peso médio de  $11,2 \pm 0,3$  kg e escore corporal  $5,2 \pm 0,3$  (LAFLAMME, 1997), sendo 12 machos e 12 fêmeas. Os cães foram vacinados, 6 meses antes do início do experimento, com as vacinas polivalente (Duramune® Max - 5CvK/4L, contra Parvovirose, Cinomose, Adenovírus tipo 2, Hepatite, Parainfluenza, Coronavirose e Leptospirose sorovares *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* e *L. pomona*; Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, Brasil) e anti-rábica (Canigen R®, Virbac Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Imediatamente antes do estudo, os cães foram vermifugados e submetidos à avaliação clínica, hematológica e bioquímica para que pudessem ser considerados hígidos.

### 4.2 Ingredientes e Dietas Experimentais:

Os nutracêuticos estudados incluíram três derivados da parede celular de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*). O primeiro foi a parede celular purificada de levedura (PCL), derivado natural que contém o prebiótico mananoligossacarídeo. O segundo e o terceiro constituíram-se de frações purificadas da PCL, concentradas em beta-1,3/1,6-glucano (BG1 e BG2). A composição química dos nutracêuticos está apresentada na Tabela 1.

Os tratamentos experimentais foram constituídos por quatro dietas extrusadas

isonutrientes, formuladas de modo que suas composições nutricionais atendessem às recomendações nutricionais para cães adultos em manutenção da v, 2008). Estas foram produzidas na fábrica experimental de ração da FCAV - Unesp, campus de Jaboticabal, sendo:

- Ração CT: grupo controle, sem adição das substâncias.
- Ração PCL: inclusão de 0,2% de PCL
- Ração BG1: inclusão de 0,015% de BG1.
- Ração BG2: inclusão de 0,015% de BG2.

**Tabela 1.** Composição química dos nutracêuticos estudados.

| Item                                 | Parede celular de levedura | Derivado                                | Derivado                                |
|--------------------------------------|----------------------------|---|---|
|                                      |                            | concentrado em $\beta$ -glucano 1 (BG1) | concentrado em $\beta$ -glucano 2 (BG2) |
| Porcentagem sobre a matéria original |                            |   |   |
| <i>Matéria seca</i> <sup>1</sup>     | 93,12                      | 92,76                                   | 95,91                                   |
| <i>Proteína bruta</i> <sup>1</sup>   | 36,51                      | 8,32                                    | 4,49                                    |
| <i>Mananos</i> <sup>2</sup>          | > 12,0                     | < 3,0                                   | 4,3                                     |
| <i>Glucanos</i> <sup>2</sup>         | --                         | 76,3                                    | 63,6                                    |

<sup>1</sup>Composição analisada, n=2; CV < 5%.

<sup>2</sup>Dados obtidos de laudo laboratorial da Açucareira Quatá (Biorigin)

Os ingredientes foram incluídos na fórmula em substituição ao amido de milho, permanecendo os demais ingredientes em porcentagens fixas. Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, de modo a não permitir variabilidade entre os tratamentos. As dietas experimentais foram moídas à 0,8 mm e produzidas em extrusora Tipo MAB 400S, com capacidade de processamento de 150 kg de ração/hora, na Fábrica de Rações do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal. Com o objetivo de produzir dietas com qualidade semelhante de cozimento do amido, foi realizado controle da qualidade do processo de extrusão por meio da dosagem da densidade do alimento. Foram realizadas amostragens na saída da extrusora, antes da passagem pelo secador, a cada 30 minutos, o que possibilitou mensurar a densidade, que foi mantida no intervalo entre 340 a 370 g/L. A fórmula e a composição química das dietas encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Fórmula das dietas experimentais. Valores percentuais sobre a matéria original.

| <b>Ingrediente</b>                     | <b>Controle</b> | <b>PCL</b> | <b>BG1</b> | <b>BG2</b> |
|--|-----------------|------------|------------|------------|
| Farinha de vísceras de frango          | 35,0            | 35,0       | 35,0       | 35,0       |
| Quirera de arroz                       | 30,0            | 30,0       | 30,0       | 30,0       |
| Milho                                  | 22,8            | 22,8       | 22,8       | 22,8       |
| Óleo vísceras frango                   | 6,6             | 6,6        | 6,6        | 6,6        |
| Polpa de beterraba                     | 2,0             | 2,0        | 2,0        | 2,0        |
| Palatabilizante líquido                | 2,0             | 2,0        | 2,0        | 2,0        |
| Sal                                    | 0,3             | 0,3        | 0,3        | 0,3        |
| KCl                                    | 0,4             | 0,4        | 0,4        | 0,4        |
| Antifúngico                            | 0,1             | 0,1        | 0,1        | 0,1        |
| Premix vitamínico-mineral <sup>1</sup> | 0,55            | 0,55       | 0,55       | 0,55       |
| Antioxidante                           | 0,04            | 0,04       | 0,04       | 0,04       |
| Parede celular de levedura             | 0               | 0,2        | -          | -          |
| Beta-glucano 1                         | 0               | -          | 0,015      | -          |
| Beta-glucano 2                         | 0               | -          | -          | 0,015      |
| Amido de milho                         | 0,2             | -          | 0,185      | 0,185      |

<sup>1</sup> Adição por quilograma de produto: Ferro 100 mg, Cobre 10 mg, Manganês 10 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Selênio 0,3 mg, Vitamina A 18000 UI, Vit. D 1200 UI, Vit. E 200 UI, Tiamina 6 mg, Riboflavina 10 mg, Ácido pantotênico 40 mg, Niacina 60 mg, Piridoxina 6 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,1 mg e Colina 25 mg.

**Tabela 3.** Composição química analisada das dietas experimentais<sup>1</sup>. Valores sobre a matéria original.

| Item  | Dietas <sup>2</sup> |       |       |       |
|---|---------------------|-------|-------|-------|
|   | CT                  | PCL   | BG1   | BG2   |
| Matéria seca (%)                            | 91,40               | 91,32 | 91,94 | 91,76 |
| Matéria Mineral (%)                         | 8,86                | 9,07  | 8,48  | 8,81  |
| Proteína bruta (%)                          | 25,92               | 25,58 | 25,57 | 25,98 |
| Extrato etéreo ácido (%)                    | 12,57               | 12,48 | 11,23 | 12,16 |
| Fibra bruta (%)                             | 1,71                | 2,58  | 2,18  | 2,12  |
| Cálcio (%)                                  | 1,95                | 1,79  | 1,88  | 1,92  |
| Fósforo (%)                                 | 1,38                | 1,35  | 1,36  | 1,33  |
| Energia Metabolizável (kcal/g) <sup>3</sup> | 3,69                | 3,61  | 3,62  | 3,65  |

<sup>1</sup> - n=2; CV < 5%

<sup>2</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>3</sup> - Calculada segundo NRC (2006)

#### 4.3 Delineamento experimental

Os cães foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de seis animais, com três machos e três fêmeas em cada grupo. A cada grupo foi fornecida uma das quatro rações por todo o período experimental de 126 dias. A quantidade de ração administrada foi inicialmente calculada de acordo com a estimativa da energia metabolizável do alimento, obtida à partir de sua composição química (NRC, 2006) e a necessidade energética média dos cães do laboratório, de 124kcal x peso<sup>0,75</sup>. Esta quantidade foi reajustada conforme a necessidade energética individual de cada cão, para que mantivessem o peso corporal constante ao longo do estudo. O alimento foi fornecido uma vez ao dia, certificando-se que cada animal ingeriu toda a quantidade calculada para o período. A água foi fornecida *ad libitum*. Durante todo o período experimental os cães foram alojados em baias com solário, sendo soltos para se exercitarem em área gramada duas vezes ao dia. Os procedimentos realizados durante o experimento encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Procedimentos realizados durante o período experimental.

| Análise  | Dia Experimental |    |    |    |    |    |    |    |     |
|--|------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|
|  | 0                | 14 | 42 | 49 | 56 | 70 | 84 | 98 | 126 |
| Hemograma e análise bioquímica                           | X                | X  | X  |    | X  | X  | X  | X  |     |
| Vacinação  |                  |    | X  |    |    |    |    |    |     |
| Titulação de anticorpos                                  | X                |    | X  |    |    | X  |    | X  |     |
| Imunofenotipagem   | X                | X  | X  |    | X  | X  | X  | X  |     |
| IgA fecal  | X                |    | X  |    |    | X  |    | X  |     |
| Teste de hipersensibilidade tardia                       | X                |    |    | X  |    |    |    | X  |     |
| Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular |                  |    |    |    |    |    |    |    | X   |

#### 4.4 Hemograma e Exames Bioquímicos

Para se avaliar a saúde dos animais foram realizados hemograma e exames bioquímicos. Estes exames foram feitos nos dias 0, 14, 42, 56, 70, 84 e 98. O perfil bioquímico incluiu a mensuração das proteínas totais, albumina, uréia e creatinina e da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

As alíquotas sanguíneas foram obtidas por venipunção cefálica, após anti-sepsia local. Para o hemograma, 1 mL do sangue foi separado em tubo de ensaio de vidro contendo anticoagulante EDTA e 8 mL do sangue separados em tubo de ensaio de vidro sem anticoagulante para as análises bioquímicas. As contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, a taxa de hemoglobina e o volume globular foram obtidos com auxílio de um contador veterinário automático de células ABC Vet (Horiba

ABX Brasil, São Paulo). A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida utilizando-se de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de Metanol – May Grunwald – Giemsa. A fórmula leucocitária absoluta foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias, por uma regra de três direta. As determinações das concentrações séricas de ureia, creatinina, proteínas totais e albumina e a atividade das enzimas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina foram conduzidas com auxílio de conjuntos de reagentes específicos para cada parâmetro (Labtest Diagnóstica Ltda, Lagoa Santa - MG), sendo as leituras realizadas em aparelho analisador bioquímico semi-automático (modelo LABQUEST, Labtest Diagnóstica Ltda, Lagoa Santa – MG).

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

#### **4.5 Vacinação e dosagem de anticorpos**

Para imunoestimulação antígeno-específica dos animais, realizou-se desafio antigênico aplicando-se por via subcutânea uma vacina contra leptospirose (Duramune® LCI/GP, Fort Dodge, Campinas, Brasil) no dia experimental 42. Os sorovares de *Leptospira* contidos nesta vacina foram *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa* e *pomona*. A titulação de anticorpos anti-*Leptospira*, dos quatro sorovares presentes na vacina foi realizada nos dias experimentais 0, 42, 70 e 98. Esta foi realizada pelo método de soroaglutinação microscópica, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Unesp, campus de Jaboticabal,.

As amostras foram inicialmente diluídas em 1/50, sendo uma parte de soro sanguíneo para 49 partes de solução tamponada de Sørensen. Dessa diluição foram colocadas alíquotas de 30 µL em placas de polietileno, com fundo plano, e adicionada igual quantidade do antígeno. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica BOD à temperatura de 28°C por uma hora. A leitura foi realizada em microscopia de campo escuro direto da placa, com objetiva de 10x.

O critério adotado para considerar um soro como reagente foi a aglutinação de pelo menos 50% das leptospiros no campo microscópico no aumento de 100X. Os soros reagentes na triagem inicial foram reexaminados em quatro diluições seriadas de razão dois e selecionadas apenas as amostras com titulação mínima de 40.

#### 4.6 Imunofenotipagem

Os cães foram submetidos à avaliação quantitativa de células CD5<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico, para a imunofenotipagem dos linfócitos. Esta foi obtida por citometria de fluxo nos dias 0, 14, 42, 56, 70, 84 e 98.

Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a coleta do sangue. Para tanto as alíquotas do sangue periférico foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus de Araraquara. A metodologia para a avaliação citofluorométrica consistiu, inicialmente, na identificação de cinco tubos estéreis para cada amostra (tubo 1 – somente células, tubo 2 – IgG1FITC/IgG2aPE, tubo 3 - CD5FITC/CD4PE , tubo 4 – CD5FITC/CD8PE e tubo 5- CD45FITC/CD21PE). A cada tubo foi adicionado 100 µL de sangue com EDTA. Então, adicionaram-se dois µL dos respectivos anticorpos, conforme esquema:

1. Só células: não se colocou anticorpo.
2. Isotipo controle: IgG1 PE (Serotec, MCA1123PE) + IgG2a FITC (Serotec, MCA1212F).
3. CD5/CD4: CD5 FITC (Serotec, MCA1037F) + CD4 PE (Serotec, MCA1038PE).
4. CD5/CD8: CD5 FITC (Serotec, MCA1037F) + CD8 PE (Serotec, MCA1039PE).
5. CD21/CD45: CD45 FITC (Serotec, MCA1042F) + Bcells (CD21) (Serotec, MCA1781PE).

Após isto, os tubos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente 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 dez minutos à temperatura ambiente protegidos de luz. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com PBS por três vezes, que consistiu na centrifugação a 1800 rpm por três minutos, desprezando o sobrenadante e adicionando dois mililitros de PBS.

Depois de desprezado o sobrenadante, adicionaram-se 500  $\mu$ L de PBS + 1% de formol nos cinco tubos e as amostras foram submetidas à análise no citofluorômetro (FACSCanto, Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, EUA) para classificação e contagem das subpopulações linfocitárias. As porcentagens de células foram aplicadas às contagens de leucócitos e linfócitos do hemograma para se obterem os valores absolutos.

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

Os anticorpos utilizados para determinar as subpopulações linfocitárias estão listados na Tabela 5. Todos eles foram 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  |
|------------|---------------|----------------------|----------------------------|-------------|
| $\gamma$ 1 | PE            | MCA1123PE            | Isotipo controle           | AbD Serotec |
| $\gamma$ 2 | FITC          | MCA1212F             | Isotipo controle           | AbD Serotec |
| CD5        | FITC          | MCA1037F             | Linfócitos T totais        | AbD Serotec |
| CD4        | PE            | MCA1038PE            | Linfócitos T <i>helper</i> | AbD Serotec |
| CD8        | PE            | MCA1039PE            | Linfócitos T citotóxicos   | AbD Serotec |
| CD45       | FITC          | MCA1042F             | Leucócitos totais          | AbD Serotec |
| CD21       | PE            | MCA1781PE            | Linfócitos B               | AbD Serotec |

#### 4.7 Avaliação da concentração de IgA nas fezes

Foram realizadas dosagens do anticorpo IgA nas fezes dos cães nos dias 0, 42, 70 e 98. Para isto, amostras de fezes frescas foram recolhidas diariamente e congeladas, por três dias consecutivos, em cada período de coleta. Logo após este período as amostras foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra por período e por cão. A extração de IgA fecal foi realizada por extração salina de acordo com Peters et al. (2004), para isto a matéria fecal foi descongelada à temperatura ambiente e pesou-se quantitativamente um grama da amostra (peso úmido). Esta 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 1500 g por 20 minutos à 5°C. Uma porção do sobrenadante (2ml) foi transferida a um tubo de eppendorf contendo 20 microlitros de coquetel inibidor de protease® (Sigma-Aldrich, São Paulo-Brasil), sendo, então, a amostra homogeneizada e depois centrifugada a 15.000 g por 15 minutos à 5°C e o sobrenadante transferido a um tubo estéril e armazenado a -20°C até quantificação da IgA.

Para a quantificação da concentração total de IgA no extrato de fezes utilizou-se um kit de ELISA específico para IgA canina (Bethyl laboratories, Montgomery, USA). A placa foi recoberta com o anticorpo de captura (100 µL por poço) e incubada por 1 hora. Após 3 lavagens com PBS + Tween 80, adicionou-se 200 µL por poço de solução de bloqueio (PBS + Tween 80 + 6% leite em pó) e a placa foi incubada por 30 minutos. Repetiu-se o mesmo procedimento de lavagem e então foram colocados na placa os padrões (7 diluições) e as amostras de extrato fecal, em duplicata. Após incubação por 1 hora e nova lavagem, foi colocado 100 µL por poço do anticorpo conjugado HRP na diluição 1:100.000. Realizou-se então a última incubação de 1 hora e lavagem. Colocou-se a solução de revelação TMB, aguardando 15 minutos e parando a reação com a adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. 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. Todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente.

Dos resultados obtidos, fez-se a subtração dos valores do branco. Obteve-se a curva padrão, através da absorbância e a concentração já conhecida dos padrões (fornecida no kit). Calculou-se então a equação da curva, gerando uma equação polinomial de segundo grau (as curvas tiveram R<sup>2</sup> superior a 0,99). Substituindo-se os valores de absorbância das amostras, pôde-se encontrar a concentração de IgA nestas, em ng/mL. Estes resultados foram divididos pelo peso das amostras de fezes, expressando-se os valores por grama de fezes úmidas. Devido à alta concentração de IgA nas amostras, elas tiveram que ser diluídas em 1:1.200 para que ficassem entre os valores máximos e mínimos de leitura da amostra padrão.

#### **4.8 Teste de hipersensibilidade tardia**

Os procedimentos realizados foram adaptados dos descritos por Kim, H. et al. (2000). Para este teste, foram injetados pela via intradérmica, na fossa paralombar dos animais, após a devida tricotomia, 100 µL de cada uma das soluções que seguem: 1) salina (0,9%) como controle negativo; 2) fito-hemaglutinina (0,5 g/L) (FHG - Lectina obtida de *Phaseolus vulgaris*; L8754; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para mensurar a

resposta inespecífica; 3) vacina polivalente para cães (Duramune® Max - 5CvK/4L, contra Parvovirose, Cinomose, Adenovírus tipo 2, Hepatite, Parainfluenza, Coronavirose e Leptospirose sorovares *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* e *L. pomona*; Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, Brasil) para mensurar a resposta específica.

A espessura da pele foi mensurada com um medidor digital de espessura (Mitutoyo modelo 700-122, Tóquio, Japão - calibrado para exercer pressão automática no local da leitura, com força de 2 N) nos momentos 24, 48 e 72h após as injeções intra-dérmicas e as medidas comparadas com as obtidas no momento inicial. Este teste foi conduzido nos dias 0, 49 e 98.

#### **4.9 Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular**

Estas dosagens foram realizadas apenas no último dia experimental (dia 126). Primeiramente, realizou-se a separação das células mononucleares do sangue periférico. Para isto coletou-se 2 ml de sangue, que foi diluído em 2 ml de PBS e colocado cuidadosamente sobre uma camada de 3 ml de Ficoll-Paque PREMIUM® (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Este foi então centrifugado à 400g, por 40 minutos, à 18°C, sendo então coletada a camada referente às células mononucleares. Após 3 lavagens com PBS as células foram diluídas em meio RPMI 1640 até atingirem a concentração de  $2 \times 10^6$  por ml. Cada amostra foi incubada em 3 poços diferentes, o primeiro contendo somente as células; no segundo foi adicionado 100 µL de LPS (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil); e ao último acrescentaram-se 100 µL da vacina contra leptospirose (Duramune® LCI/GP, Fort Dodge, Campinas, Brasil), na diluição de 1:32. As células foram colocadas em cultura celular e mantidas em estufa à 37°C por 24 horas. Após esse período realizou-se a centrifugação e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -70°C até posterior análise.

As citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-6 foram dosadas pelo painel de citocinas MILLIPLEX™MAP (CCYTO-90K, MILLIPORE, Billerica, Massachusetts, EUA). As amostras e padrões foram incubados com as microesferas acopladas a cada um dos

anticorpos monoclonais específicos para cada uma das quatro citocinas avaliadas. Após lavagem, adicionou-se os anticorpos de detecção biotinizados. Então, realizou-se uma incubação com estreptavidina-PE. As amostras foram lidas no sistema de *array* líquido – MILLIplex (Luminex 200, Luminex Corporation, St. Charles, Missouri, EUA). Os coeficientes de variação do ensaio, fornecidos pelo fabricante, estão demonstrados na tabela 6.

**Tabela 6.** Precisão intra e inter-ensaio do painel de citocinas MILLIPLEX™MAP.

| <b>Citocina</b>                | <b>Precisão Intra-ensaio (CV %)</b> | <b>Precisão Inter-ensaio (CV %)</b> |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | 13,2                                | 20,0                                |
| <i>IFN-<math>\gamma</math></i> | 8,0                                 | 17,6                                |
| <i>IL-4</i>                    | 11,6                                | 19,2                                |
| <i>IL-6</i>                    | 3,9                                 | 15,8                                |

#### 4.10 Análise Estatística

O experimento foi conduzido dentro de um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (CT, PCL, BG1 e BG2) e 24 cães, totalizando seis repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (General Linear Models) do software Statistical Analysis System (Versão 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), sendo previamente testadas quanto às suposições da análise de variância (normalidade e homocedascidade da variância). Quanto necessária utilizou-se a transformação logarítmica das variáveis ( $\log x + 1$ ). Quando diferenças significativas foram detectadas pelo teste F da ANOVA, comparações múltiplas foram conduzidas pelo Teste de Tukey, adotando-se como significativo  $p \leq 0,10$ . As variáveis hemograma, análises bioquímicas, imunofenotipagem e IgA fecal foram analisadas por análise de variância de medidas

repetidas no tempo. Comparações múltiplas das médias foram feitas usando o teste de Tukey. Um valor de  $p \leq 0,10$  foi adotado como significativo.

## 5. RESULTADOS

As dietas foram bem consumidas e os cães mantiveram o peso corporal, com os ajustes de quantidade de alimento sendo realizados individualmente. A produção de fezes foi normal, com fezes firmes, sem diarreia. Os animais também não apresentaram vômito. O consumo médio de alimento foi de  $167,2 \pm 3,8$  g/cão/dia, sem diferenças entre tratamentos, isto gerou uma ingestão diária média para cada cão de 33,2 mg de PCL; 2,6 mg de BG1 e 2,4 mg de BG2, respectivamente para os grupos PCL, BG1 e BG2.

### 5.1 Hemograma e exames bioquímicos

Os resultados eritroleucométricos e plaquetários de cães mediante consumo das dietas experimentais são apresentados na Tabela 7. Os parâmetros bioquímicos estão apresentados na Tabela 8. Os valores de normalidade de tais parâmetros para a espécie canina encontram-se no Anexo 1.

A quantificação das hemácias levou apenas a uma diferença ao longo do tempo, no grupo PCL, sendo significativamente maior no dia 98, em relação ao dia 0. O hematócrito teve bastante variação entre os grupos e entre os dias, mas esses valores permaneceram dentro dos parâmetros de normalidade.

Observou-se um aumento na contagem dos linfócitos para o grupo BG2, ao longo do tempo. Esta contagem elevou-se significativamente no dia 42, em relação ao dia 0, mas voltou a diminuir no dia 70. Em relação aos monócitos, para CT, notou-se que nos dias 14, 56 e 98 o número de células foi significativamente menor que no dia 42.

**Tabela 7.** Resultados de hemograma de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Item                               | Dietas <sup>1</sup> |                      |                      |                     | EPM <sup>2</sup> | CV     | P    |
|------------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|--------|------|
|                                    | CT                  | PCL                  | BG1                  | BG2                 |                  |        |      |
| Hemácias<br>(x10 <sup>6</sup> /μL) |                     |                      |                      |                     |                  |        |      |
| <i>Dia 0</i>                       | 5,87 <sup>aA</sup>  | 5,43 <sup>aA</sup>   | 5,59 <sup>aA</sup>   | 5,54 <sup>aA</sup>  | 0,12             | 10,70  | 0,19 |
| <i>Dia 14</i>                      | 5,24 <sup>aA</sup>  | 4,99 <sup>aAB</sup>  | 4,92 <sup>aA</sup>   | 4,92 <sup>aA</sup>  | 0,09             | 8,65   | 0,38 |
| <i>Dia 42</i>                      | 5,79 <sup>aA</sup>  | 5,38 <sup>aAB</sup>  | 5,47 <sup>aA</sup>   | 5,59 <sup>aA</sup>  | 0,11             | 9,32   | 0,22 |
| <i>Dia 56</i>                      | 6,11 <sup>aA</sup>  | 5,91 <sup>aAB</sup>  | 5,93 <sup>aA</sup>   | 5,87 <sup>aA</sup>  | 0,11             | 8,87   | 0,66 |
| <i>Dia 70</i>                      | 5,86 <sup>aA</sup>  | 5,75 <sup>aAB</sup>  | 5,66 <sup>aA</sup>   | 5,45 <sup>aA</sup>  | 0,13             | 11,01  | 0,26 |
| <i>Dia 84</i>                      | 6,28 <sup>aA</sup>  | 6,17 <sup>aAB</sup>  | 6,23 <sup>aA</sup>   | 5,71 <sup>aA</sup>  | 0,13             | 10,80  | 0,03 |
| <i>Dia 98</i>                      | 5,94 <sup>aA</sup>  | 6,32 <sup>aB</sup>   | 6,33 <sup>aA</sup>   | 5,77 <sup>aA</sup>  | 0,13             | 10,14  | 0,01 |
| Hematócrito<br>(%)                 |                     |                      |                      |                     |                  |        |      |
| <i>Dia 0</i>                       | 40,5 <sup>aAB</sup> | 38,6 <sup>aABC</sup> | 39,4 <sup>aABC</sup> | 38,5 <sup>aAB</sup> | 0,92             | 11,49  | 0,47 |
| <i>Dia 14</i>                      | 36,1 <sup>aA</sup>  | 35,1 <sup>aAC</sup>  | 34,8 <sup>aB</sup>   | 34,0 <sup>aA</sup>  | 0,63             | 8,85   | 0,51 |
| <i>Dia 42</i>                      | 40,1 <sup>aAB</sup> | 37,9 <sup>aC</sup>   | 38,7 <sup>aAB</sup>  | 39,0 <sup>aB</sup>  | 0,81             | 10,20  | 0,48 |
| <i>Dia 56</i>                      | 42,6 <sup>aB</sup>  | 41,7 <sup>aBC</sup>  | 42,3 <sup>aAC</sup>  | 40,5 <sup>aB</sup>  | 0,86             | 10,03  | 0,46 |
| <i>Dia 70</i>                      | 40,5 <sup>aAB</sup> | 40,4 <sup>aBC</sup>  | 39,9 <sup>aAC</sup>  | 37,8 <sup>aAB</sup> | 0,99             | 12,20  | 0,16 |
| <i>Dia 84</i>                      | 43,3 <sup>aB</sup>  | 43,3 <sup>aB</sup>   | 43,9 <sup>aCD</sup>  | 39,8 <sup>aB</sup>  | 1,02             | 11,69  | 0,01 |
| <i>Dia 98</i>                      | 40,9 <sup>aAB</sup> | 44,4 <sup>aB</sup>   | 44,8 <sup>aD</sup>   | 40,5 <sup>aB</sup>  | 0,93             | 10,69  | 0,01 |
| Hemoglobina<br>(g/dL)              |                     |                      |                      |                     |                  |        |      |
| <i>Dia 0</i>                       | 15,25 <sup>aA</sup> | 14,58 <sup>aA</sup>  | 14,85 <sup>aA</sup>  | 14,43 <sup>aA</sup> | 0,35             | 11,50  | 1,00 |
| <i>Dia 14</i>                      | 15,22 <sup>aA</sup> | 15,00 <sup>aA</sup>  | 15,07 <sup>aA</sup>  | 14,53 <sup>aA</sup> | 0,29             | 9,57   | 1,00 |
| <i>Dia 42</i>                      | 15,05 <sup>aA</sup> | 14,48 <sup>aA</sup>  | 14,77 <sup>aA</sup>  | 15,15 <sup>aA</sup> | 0,32             | 10,57  | 1,00 |
| <i>Dia 56</i>                      | 16,03 <sup>aA</sup> | 15,93 <sup>aA</sup>  | 16,23 <sup>aA</sup>  | 15,17 <sup>aA</sup> | 0,33             | 10,10  | 1,00 |
| <i>Dia 70</i>                      | 15,10 <sup>aA</sup> | 15,18 <sup>aA</sup>  | 14,88 <sup>aA</sup>  | 14,03 <sup>aA</sup> | 0,38             | 12,50  | 1,00 |
| <i>Dia 84</i>                      | 14,57 <sup>aA</sup> | 14,63 <sup>aA</sup>  | 14,80 <sup>aA</sup>  | 13,42 <sup>aA</sup> | 4,60             | 118,33 | 1,00 |
| <i>Dia 98</i>                      | 14,2 <sup>aA</sup>  | 15,35 <sup>aA</sup>  | 15,40 <sup>aA</sup>  | 14,15 <sup>aA</sup> | 0,32             | 10,77  | 1,00 |

Continua...

| Item  | Dietas <sup>1</sup> |                      |                      |                     | EPM <sup>2</sup> | CV     | P    |
|---|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|--------|------|
|   | CT                  | PCL                  | BG1                  | BG2                 |                  |        |      |
| <b>Leucócitos</b><br>(x10 <sup>3</sup> /μL)   |                     |                      |                      |                     |                  |        |      |
| <i>Dia 0</i>                                  | 7,02 <sup>aA</sup>  | 8,05 <sup>aA</sup>   | 7,82 <sup>aA</sup>   | 7,23 <sup>aA</sup>  | 0,24             | 15,55  | 0,46 |
| <i>Dia 14</i>                                 | 7,43 <sup>aA</sup>  | 9,68 <sup>aA</sup>   | 9,43 <sup>aA</sup>   | 7,87 <sup>aA</sup>  | 0,35             | 20,21  | 0,01 |
| <i>Dia 42</i>                                 | 9,08 <sup>aA</sup>  | 9,48 <sup>aA</sup>   | 8,85 <sup>aA</sup>   | 8,55 <sup>aA</sup>  | 0,36             | 19,63  | 0,63 |
| <i>Dia 56</i>                                 | 7,33 <sup>aA</sup>  | 6,85 <sup>aA</sup>   | 8,20 <sup>aA</sup>   | 7,15 <sup>aA</sup>  | 0,25             | 16,89  | 0,30 |
| <i>Dia 70</i>                                 | 7,35 <sup>aA</sup>  | 8,78 <sup>aA</sup>   | 8,40 <sup>aA</sup>   | 7,72 <sup>aA</sup>  | 0,36             | 21,88  | 0,20 |
| <i>Dia 84</i>                                 | 7,55 <sup>aA</sup>  | 7,67 <sup>aA</sup>   | 8,70 <sup>aA</sup>   | 8,28 <sup>aA</sup>  | 0,40             | 24,12  | 0,36 |
| <i>Dia 98</i>                                 | 7,55 <sup>aA</sup>  | 9,00 <sup>aA</sup>   | 7,70 <sup>aA</sup>   | 9,00 <sup>aA</sup>  | 0,32             | 19,03  | 0,08 |
| <b>Eosinófilos</b><br>(céls/μL)               |                     |                      |                      |                     |                  |        |      |
| <i>Dia 0</i>                                  | 191,3 <sup>aA</sup> | 298,3 <sup>aA</sup>  | 233,3 <sup>aA</sup>  | 201,8 <sup>aA</sup> | 36,53            | 77,35  | 0,84 |
| <i>Dia 14</i>                                 | 311,2 <sup>aA</sup> | 480,7 <sup>aA</sup>  | 521,8 <sup>aAB</sup> | 208,1 <sup>aA</sup> | 57,63            | 74,21  | 0,06 |
| <i>Dia 42</i>                                 | 497,7 <sup>aA</sup> | 604,0 <sup>aA</sup>  | 792,3 <sup>aB</sup>  | 473,5 <sup>aA</sup> | 69,25            | 57,32  | 0,07 |
| <i>Dia 56</i>                                 | 283,3 <sup>aA</sup> | 431,0 <sup>aA</sup>  | 402,5 <sup>aAB</sup> | 241,0 <sup>aA</sup> | 45,49            | 65,65  | 0,40 |
| <i>Dia 70</i>                                 | 363,5 <sup>aA</sup> | 528,5 <sup>aA</sup>  | 415,7 <sup>aAB</sup> | 309,2 <sup>aA</sup> | 46,40            | 56,23  | 0,38 |
| <i>Dia 84</i>                                 | 316,8 <sup>aA</sup> | 308,3 <sup>aA</sup>  | 483,7 <sup>aAB</sup> | 486,2 <sup>aA</sup> | 52,79            | 64,85  | 0,32 |
| <i>Dia 98</i>                                 | 333,2 <sup>aA</sup> | 437,3 <sup>aA</sup>  | 510,7 <sup>aAB</sup> | 309,1 <sup>aA</sup> | 57,19            | 70,47  | 0,38 |
| <b>Neutrófilos</b><br>bastonetes<br>(céls/μL) |                     |                      |                      |                     |                  |        |      |
| <i>Dia 0</i>                                  | 136,3 <sup>aA</sup> | 164,8 <sup>aA</sup>  | 115,5 <sup>aA</sup>  | 59,4 <sup>aA</sup>  | 14,31            | 58,91  | 0,05 |
| <i>Dia 14</i>                                 | 113,5 <sup>aA</sup> | 169,5 <sup>aA</sup>  | 192,3 <sup>aA</sup>  | 160,8 <sup>aA</sup> | 22,57            | 69,52  | 0,21 |
| <i>Dia 42</i>                                 | 40,8 <sup>aA</sup>  | 59,8 <sup>aA</sup>   | 63,2 <sup>aA</sup>   | 0 <sup>aA</sup>     | 12,86            | 153,78 | 0,33 |
| <i>Dia 56</i>                                 | 68,7 <sup>aA</sup>  | 79,7 <sup>aA</sup>   | 82,0 <sup>aA</sup>   | 82,1 <sup>aA</sup>  | 6,95             | 43,62  | 0,98 |
| <i>Dia 70</i>                                 | 100,8 <sup>aA</sup> | 175,33 <sup>aA</sup> | 195,3 <sup>aA</sup>  | 125,2 <sup>aA</sup> | 16,52            | 54,24  | 0,05 |
| <i>Dia 84</i>                                 | 99,5 <sup>aA</sup>  | 88,00 <sup>aA</sup>  | 60,2 <sup>aA</sup>   | 133,5 <sup>aA</sup> | 11,96            | 61,49  | 0,29 |
| <i>Dia 98</i>                                 | 62,5 <sup>aA</sup>  | 75,2 <sup>aA</sup>   | 89,2 <sup>aA</sup>   | 75,5 <sup>aA</sup>  | 7,26             | 47,07  | 0,92 |

Continua...

| Item   | Dietas <sup>1</sup>  |                     |                     |                     | EPM <sup>2</sup> | CV    | P    |
|--|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|-------|------|
|  | CT                   | PCL                 | BG1                 | BG2                 |                  |       |      |
| Neutrófilos segmentados (x10 <sup>3</sup> /μL) |                      |                     |                     |                     |                  |       |      |
| <i>Día 0</i>                                   | 4,83 <sup>aA</sup>   | 5,97 <sup>aA</sup>  | 5,66 <sup>aA</sup>  | 5,27 <sup>aA</sup>  | 0,23             | 20,96 | 0,44 |
| <i>Día 14</i>                                  | 5,19 <sup>aA</sup>   | 6,83 <sup>aA</sup>  | 6,84 <sup>aA</sup>  | 5,01 <sup>aA</sup>  | 0,35             | 28,62 | 0,01 |
| <i>Día 42</i>                                  | 5,94 <sup>aA</sup>   | 6,51 <sup>aA</sup>  | 5,68 <sup>aA</sup>  | 5,11 <sup>aA</sup>  | 0,32             | 26,97 | 0,29 |
| <i>Día 56</i>                                  | 5,72 <sup>aA</sup>   | 5,01 <sup>aA</sup>  | 5,94 <sup>aA</sup>  | 4,74 <sup>aA</sup>  | 0,26             | 23,43 | 0,31 |
| <i>Día 70</i>                                  | 5,11 <sup>aA</sup>   | 6,53 <sup>aA</sup>  | 6,27 <sup>aA</sup>  | 5,40 <sup>aA</sup>  | 0,37             | 30,86 | 0,18 |
| <i>Día 84</i>                                  | 5,42 <sup>aA</sup>   | 5,33 <sup>aA</sup>  | 6,36 <sup>aA</sup>  | 5,81 <sup>aA</sup>  | 0,35             | 30,37 | 0,49 |
| <i>Día 98</i>                                  | 5,60 <sup>aA</sup>   | 6,23 <sup>aA</sup>  | 5,56 <sup>aA</sup>  | 6,13 <sup>aA</sup>  | 0,28             | 23,47 | 0,71 |
| Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)              |                      |                     |                     |                     |                  |       |      |
| <i>Día 0</i>                                   | 1,61 <sup>aAB</sup>  | 1,35 <sup>aA</sup>  | 1,50 <sup>aA</sup>  | 1,24 <sup>aA</sup>  | 0,07             | 24,34 | 0,50 |
| <i>Día 14</i>                                  | 1,61 <sup>aAB</sup>  | 1,91 <sup>aA</sup>  | 1,60 <sup>aA</sup>  | 2,15 <sup>aAB</sup> | 0,14             | 36,64 | 0,11 |
| <i>Día 42</i>                                  | 2,07 <sup>aA</sup>   | 1,88 <sup>aA</sup>  | 1,89 <sup>aA</sup>  | 2,18 <sup>aB</sup>  | 0,11             | 28,09 | 0,60 |
| <i>Día 56</i>                                  | 1,03 <sup>aB</sup>   | 1,14 <sup>aA</sup>  | 1,53 <sup>aA</sup>  | 1,83 <sup>aAB</sup> | 0,14             | 49,00 | 0,01 |
| <i>Día 70</i>                                  | 1,45 <sup>aAB</sup>  | 1,15 <sup>aA</sup>  | 1,15 <sup>aA</sup>  | 1,22 <sup>aA</sup>  | 0,90             | 35,28 | 0,61 |
| <i>Día 84</i>                                  | 1,45 <sup>aAB</sup>  | 1,62 <sup>aA</sup>  | 1,50 <sup>aA</sup>  | 1,49 <sup>aAB</sup> | 0,93             | 30,22 | 0,91 |
| <i>Día 98</i>                                  | 1,35 <sup>aAB</sup>  | 1,95 <sup>aA</sup>  | 1,29 <sup>aA</sup>  | 1,82 <sup>aAB</sup> | 0,11             | 34,94 | 0,02 |
| Monócitos (céls/μL)                            |                      |                     |                     |                     |                  |       |      |
| <i>Día 0</i>                                   | 244,3 <sup>aAB</sup> | 266,7 <sup>aA</sup> | 305,8 <sup>aA</sup> | 268,0 <sup>aA</sup> | 20,08            | 36,27 | 0,90 |
| <i>Día 14</i>                                  | 202,2 <sup>aA</sup>  | 293,8 <sup>aA</sup> | 278,0 <sup>aA</sup> | 243,3 <sup>aA</sup> | 22,44            | 43,22 | 0,69 |
| <i>Día 42</i>                                  | 518,2 <sup>aB</sup>  | 431,5 <sup>aA</sup> | 422,5 <sup>aA</sup> | 372,2 <sup>aA</sup> | 49,80            | 55,95 | 0,36 |
| <i>Día 56</i>                                  | 211,3 <sup>aA</sup>  | 184,8 <sup>aA</sup> | 243,8 <sup>aA</sup> | 152,8 <sup>aA</sup> | 17,96            | 44,39 | 0,72 |
| <i>Día 70</i>                                  | 278,5 <sup>aAB</sup> | 393,7 <sup>aA</sup> | 361,5 <sup>aA</sup> | 212,6 <sup>aA</sup> | 28,50            | 44,81 | 0,12 |
| <i>Día 84</i>                                  | 264,0 <sup>aAB</sup> | 266,0 <sup>aA</sup> | 303,0 <sup>aA</sup> | 247,9 <sup>aA</sup> | 20,70            | 37,52 | 0,92 |
| <i>Día 98</i>                                  | 208,3 <sup>aA</sup>  | 301,2 <sup>aA</sup> | 239,0 <sup>aA</sup> | 388,8 <sup>aA</sup> | 31,07            | 53,54 | 0,14 |

Continúa...

| Item                             | Dietas <sup>1</sup>  |                     |                     |                     | EPM <sup>2</sup> | CV    | P     |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|-------|-------|
|                                  | CT                   | PCL                 | BG1                 | BG2                 |                  |       |       |
| Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL) |                      |                     |                     |                     |                  |       |       |
| <i>Dia 0</i>                     | 253,3 <sup>aAB</sup> | 282,3 <sup>aA</sup> | 247,7 <sup>aA</sup> | 293,8 <sup>aA</sup> | 14,11            | 25,68 | 0,23  |
| <i>Dia 14</i>                    | 212,0 <sup>aA</sup>  | 229,7 <sup>aA</sup> | 204,3 <sup>aA</sup> | 246,7 <sup>aA</sup> | 12,92            | 28,35 | 0,38  |
| <i>Dia 42</i>                    | 227,7 <sup>aAB</sup> | 254,7 <sup>aA</sup> | 226,7 <sup>aA</sup> | 235,3 <sup>aA</sup> | 11,99            | 24,87 | 0,69  |
| <i>Dia 56</i>                    | 276,3 <sup>aAB</sup> | 263,0 <sup>aA</sup> | 246,2 <sup>aA</sup> | 297,5 <sup>aA</sup> | 13,40            | 24,25 | 0,25  |
| <i>Dia 70</i>                    | 252,0 <sup>aAB</sup> | 247,2 <sup>aA</sup> | 246,8 <sup>aA</sup> | 291,2 <sup>aA</sup> | 14,49            | 27,37 | 0,27  |
| <i>Dia 84</i>                    | 321,0 <sup>aB</sup>  | 253,8 <sup>aA</sup> | 282,8 <sup>aA</sup> | 322,5 <sup>aA</sup> | 26,41            | 49,33 | <0,01 |
| <i>Dia 98</i>                    | 303,0 <sup>aAB</sup> | 284,8 <sup>aA</sup> | 286,3 <sup>aA</sup> | 263,4 <sup>aA</sup> | 15,53            | 26,66 | 0,88  |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>a, b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

<sup>A, B</sup> - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

Comparação válida apenas para uma mesma variável.

**Tabela 8.** Resultados de exames bioquímicos de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Item                           | Dietas <sup>1</sup>  |                       |                     |                      | EPM  | CV    | P     |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|------|-------|-------|
|                                | CT                   | PCL                   | BG1                 | BG2                  |      |       |       |
| <b>Proteínas totais (g/dL)</b> |                      |                       |                     |                      |      |       |       |
| <i>Dia 0</i>                   | 7,35 <sup>abAB</sup> | 7,60 <sup>bAC</sup>   | 6,38 <sup>cAB</sup> | 6,75 <sup>acAB</sup> | 0,14 | 9,97  | <0,01 |
| <i>Dia 14</i>                  | 6,38 <sup>aD</sup>   | 6,48 <sup>aB</sup>    | 6,23 <sup>aA</sup>  | 6,40 <sup>aAB</sup>  | 0,12 | 8,95  | 0,69  |
| <i>Dia 42</i>                  | 6,86 <sup>aCD</sup>  | 6,61 <sup>aB</sup>    | 6,40 <sup>aAB</sup> | 6,50 <sup>aAB</sup>  | 0,10 | 7,73  | 0,16  |
| <i>Dia 56</i>                  | 6,59 <sup>aCD</sup>  | 6,42 <sup>aB</sup>    | 6,28 <sup>aAB</sup> | 6,19 <sup>aA</sup>   | 0,08 | 6,12  | 0,27  |
| <i>Dia 70</i>                  | 7,81 <sup>aB</sup>   | 7,60 <sup>abC</sup>   | 7,04 <sup>bB</sup>  | 6,99 <sup>bB</sup>   | 0,17 | 11,28 | <0,01 |
| <i>Dia 84</i>                  | 7,30 <sup>aABC</sup> | 6,92 <sup>abABC</sup> | 6,30 <sup>bAB</sup> | 6,37 <sup>bAB</sup>  | 0,14 | 10,27 | <0,01 |
| <i>Dia 98</i>                  | 7,27 <sup>aABC</sup> | 7,10 <sup>aABC</sup>  | 6,94 <sup>aAB</sup> | 6,85 <sup>aAB</sup>  | 0,10 | 6,82  | 0,21  |
| <b>Albumina (g/dL)</b>         |                      |                       |                     |                      |      |       |       |
| <i>Dia 0</i>                   | 2,98 <sup>aA</sup>   | 3,01 <sup>aA</sup>    | 3,09 <sup>aAB</sup> | 3,18 <sup>aA</sup>   | 0,05 | 7,52  | 0,26  |
| <i>Dia 14</i>                  | 3,24 <sup>aAB</sup>  | 3,22 <sup>aA</sup>    | 3,28 <sup>aAB</sup> | 3,34 <sup>aABC</sup> | 0,04 | 6,12  | 0,71  |
| <i>Dia 42</i>                  | 3,24 <sup>aAB</sup>  | 3,16 <sup>aA</sup>    | 3,07 <sup>aAB</sup> | 3,36 <sup>aABC</sup> | 0,05 | 7,50  | 0,07  |
| <i>Dia 56</i>                  | 3,01 <sup>aA</sup>   | 2,98 <sup>aA</sup>    | 2,95 <sup>aA</sup>  | 2,98 <sup>aA</sup>   | 0,05 | 8,72  | 0,97  |
| <i>Dia 70</i>                  | 3,56 <sup>aB</sup>   | 3,39 <sup>aA</sup>    | 3,31 <sup>aAB</sup> | 3,39 <sup>aBC</sup>  | 0,07 | 10,56 | 0,19  |
| <i>Dia 84</i>                  | 3,48 <sup>aB</sup>   | 3,22 <sup>aA</sup>    | 3,16 <sup>aAB</sup> | 3,22 <sup>aABC</sup> | 0,06 | 8,87  | 0,03  |
| <i>Dia 98</i>                  | 3,43 <sup>aB</sup>   | 3,35 <sup>aA</sup>    | 3,41 <sup>aB</sup>  | 3,60 <sup>aB</sup>   | 0,07 | 9,86  | 0,15  |
| <b>Creatinina (mg/dL)</b>      |                      |                       |                     |                      |      |       |       |
| <i>Dia 0</i>                   | 0,82 <sup>aA</sup>   | 0,98 <sup>aA</sup>    | 0,95 <sup>aA</sup>  | 0,92 <sup>aA</sup>   | 0,02 | 13,04 | 0,99  |
| <i>Dia 14</i>                  | 1,03 <sup>aA</sup>   | 1,11 <sup>aA</sup>    | 1,2 <sup>aA</sup>   | 1,15 <sup>aA</sup>   | 0,03 | 12,50 | 0,99  |
| <i>Dia 42</i>                  | 0,93 <sup>aA</sup>   | 1,02 <sup>aA</sup>    | 1,12 <sup>aA</sup>  | 0,89 <sup>aA</sup>   | 0,04 | 19,19 | 0,97  |
| <i>Dia 56</i>                  | 0,97 <sup>aA</sup>   | 1,02 <sup>aA</sup>    | 1,00 <sup>aA</sup>  | 1,03 <sup>aA</sup>   | 0,03 | 13,00 | 1,00  |
| <i>Dia 70</i>                  | 1,15 <sup>aB</sup>   | 1,15 <sup>aA</sup>    | 1,17 <sup>aA</sup>  | 1,17 <sup>aA</sup>   | 0,04 | 12,80 | 0,99  |
| <i>Dia 84</i>                  | 0,94 <sup>aA</sup>   | 1,04 <sup>aA</sup>    | 1,02 <sup>aA</sup>  | 0,96 <sup>aA</sup>   | 0,03 | 15,15 | 0,99  |
| <i>Dia 98</i>                  | 0,90 <sup>aA</sup>   | 1,01 <sup>aA</sup>    | 1,04 <sup>aA</sup>  | 1,05 <sup>aA</sup>   | 0,03 | 15,00 | 0,99  |

Continua...

| Item                 | Dietas <sup>1</sup> |                      |                     |                      | EPM  | CV    | P     |
|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|------|-------|-------|
|                      | CT                  | PCL                  | BG1                 | BG2                  |      |       |       |
| <b>Ureia (mg/dL)</b> |                     |                      |                     |                      |      |       |       |
| <i>Dia 0</i>         | 19,8 <sup>aA</sup>  | 21,0 <sup>aA</sup>   | 19,1 <sup>aA</sup>  | 23,6 <sup>aA</sup>   | 1,15 | 27,01 | 0,63  |
| <i>Dia 14</i>        | 30,1 <sup>aAB</sup> | 30,3 <sup>aAB</sup>  | 30,8 <sup>aAB</sup> | 34,2 <sup>aABC</sup> | 1,21 | 18,92 | 0,66  |
| <i>Dia 42</i>        | 28,9 <sup>aAB</sup> | 20,7 <sup>aA</sup>   | 23,3 <sup>aA</sup>  | 25,3 <sup>aAB</sup>  | 1,40 | 27,94 | 0,15  |
| <i>Dia 56</i>        | 38,9 <sup>aB</sup>  | 39,4 <sup>aB</sup>   | 38,5 <sup>aB</sup>  | 44,1 <sup>aC</sup>   | 2,39 | 29,14 | 0,40  |
| <i>Dia 70</i>        | 29,7 <sup>aAB</sup> | 30,4 <sup>aAB</sup>  | 29,0 <sup>aAB</sup> | 37,6 <sup>aBC</sup>  | 1,23 | 19,10 | 0,08  |
| <i>Dia 84</i>        | 29,9 <sup>aAB</sup> | 30,7 <sup>aAB</sup>  | 31,2 <sup>aAB</sup> | 36,3 <sup>aABC</sup> | 1,21 | 18,55 | 0,31  |
| <i>Dia 98</i>        | 39,5 <sup>aB</sup>  | 35,0 <sup>aB</sup>   | 31,1 <sup>aAB</sup> | 37,9 <sup>aB</sup>   | 1,86 | 25,36 | 0,12  |
| <b>ALT (U/L)</b>     |                     |                      |                     |                      |      |       |       |
| <i>Dia 0</i>         | 38,4 <sup>aA</sup>  | 43,6 <sup>abA</sup>  | 49,8 <sup>abA</sup> | 67,2 <sup>bA</sup>   | 4,33 | 42,58 | <0,01 |
| <i>Dia 14</i>        | 36,7 <sup>aA</sup>  | 47,1 <sup>aA</sup>   | 45,4 <sup>aA</sup>  | 61,1 <sup>aAB</sup>  | 5,17 | 53,24 | 0,01  |
| <i>Dia 42</i>        | 37,5 <sup>aA</sup>  | 47,1 <sup>aA</sup>   | 38,4 <sup>aA</sup>  | 37,5 <sup>aB</sup>   | 2,80 | 34,11 | 0,38  |
| <i>Dia 56</i>        | 36,7 <sup>aA</sup>  | 44,5 <sup>aA</sup>   | 43,6 <sup>aA</sup>  | 56,7 <sup>aAB</sup>  | 3,11 | 33,62 | 0,02  |
| <i>Dia 70</i>        | 38,4 <sup>aA</sup>  | 44,5 <sup>aA</sup>   | 42,8 <sup>aA</sup>  | 49,8 <sup>aAB</sup>  | 2,33 | 26,05 | 0,37  |
| <i>Dia 84</i>        | 42,4 <sup>aA</sup>  | 50,1 <sup>aA</sup>   | 48,1 <sup>aA</sup>  | 56,8 <sup>aAB</sup>  | 2,31 | 22,90 | 0,17  |
| <i>Dia 98</i>        | 41,4 <sup>aA</sup>  | 58,7 <sup>aA</sup>   | 48,4 <sup>aA</sup>  | 54,9 <sup>aAB</sup>  | 3,99 | 38,46 | 0,04  |
| <b>FA (U/L)</b>      |                     |                      |                     |                      |      |       |       |
| <i>Dia 0</i>         | 92,2 <sup>aAB</sup> | 74,3 <sup>aAB</sup>  | 78,3 <sup>aA</sup>  | 100,3 <sup>aA</sup>  | 5,33 | 30,27 | 0,14  |
| <i>Dia 14</i>        | 64,9 <sup>aA</sup>  | 77,4 <sup>aAB</sup>  | 55,3 <sup>aA</sup>  | 80,2 <sup>aA</sup>   | 5,08 | 35,87 | 0,17  |
| <i>Dia 42</i>        | 88,2 <sup>aAB</sup> | 70,4 <sup>aA</sup>   | 51,1 <sup>aA</sup>  | 71,9 <sup>aA</sup>   | 7,28 | 50,66 | 0,04  |
| <i>Dia 56</i>        | 73,1 <sup>aA</sup>  | 85,6 <sup>aAB</sup>  | 76,0 <sup>aA</sup>  | 109,1 <sup>aA</sup>  | 6,39 | 36,41 | 0,02  |
| <i>Dia 70</i>        | 88,0 <sup>aAB</sup> | 100,5 <sup>aAB</sup> | 60,3 <sup>aA</sup>  | 89,5 <sup>aA</sup>   | 6,89 | 39,91 | 0,01  |
| <i>Dia 84</i>        | 95,3 <sup>aAB</sup> | 86,0 <sup>aAB</sup>  | 61,0 <sup>aA</sup>  | 89,2 <sup>aA</sup>   | 6,07 | 35,88 | 0,04  |
| <i>Dia 98</i>        | 119,3 <sup>aB</sup> | 122,6 <sup>aB</sup>  | 74,6 <sup>bA</sup>  | 130,9 <sup>aA</sup>  | 9,69 | 42,44 | <0,01 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>a, b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,10$ ).

<sup>A, B</sup> - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,10$ ).

## 5.2 Dosagem de anticorpos anti-*Leptospira*

A titulação de anticorpos contra os sorovares de *Leptospira* avaliados encontra-se na Tabela 9. Somente o sorovar Icterohaemorrhagiae induziu resposta mais consistente em alguns cães, mas no geral a resposta vacinal foi baixa, indicando que a técnica escolhida é pouco sensível.

**Tabela 9.** Titulação de anticorpos anti-*Leptospira* de cães controle e mediante consumo de dietas com derivados de parede celular de levedura.

| Grupo | Animal | Icterohaemorrhagiae |     |     |    | Canicola |    |    |    | Pomona |    |    |    | Grippotyphosa |    |     |    |   |   |
|-------|--------|---------------------|-----|-----|----|----------|----|----|----|--------|----|----|----|---------------|----|-----|----|---|---|
|       |        | Dia                 |     |     |    |          |    |    |    |        |    |    |    |               |    |     |    |   |   |
|       |        | 0                   | 42  | 70  | 98 | 0        | 42 | 70 | 98 | 0      | 42 | 70 | 98 | 0             | 42 | 70  | 98 |   |   |
| CT    | 1      | -                   | 100 | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | 40  | -  | - | - |
|       | 2      | -                   | 100 | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | 100 | -  | - | - |
|       | 3      | -                   | 100 | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | 40  | -  | - | - |
|       | 4      | -                   | 100 | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | 40  | -  | - | - |
|       | 5      | -                   | -   | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - | - |
|       | 6      | -                   | 100 | 500 | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - | - |
| PCL   | 1      | -                   | 100 | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 2      | -                   | -   | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 3      | -                   | 80  | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 4      | -                   | -   | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 5      | -                   | -   | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 6      | -                   | -   | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
| BG1   | 1      | -                   | -   | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 2      | -                   | -   | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 3      | -                   | -   | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 4      | -                   | 40  | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 5      | -                   | 80  | 100 | -  | -        | 40 | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 6      | -                   | 40  | 100 | -  | -        | 40 | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
| BG2   | 1      | -                   | 80  | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 2      | -                   | 100 | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | 40 | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 3      | -                   | -   | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 4      | -                   | -   | 40  | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 5      | -                   | 40  | 100 | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |
|       | 6      | -                   | -   | -   | -  | -        | -  | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -             | -  | -   | -  | - |   |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

### 5.3 Imunofenotipagem

Os resultados da imunofenotipagem dos linfócitos de cães mediante consumo das dietas experimentais estão apresentados nas Tabelas 10 a 14 e ilustrados na Figura 3.

Houve interação entre tratamento e dia ( $p=0,03$ ) para os linfócitos T totais ( $CD5^+$ ). Estas células diferiram significativamente entre tratamentos no dia 98, quando BG1 foi menor que PCL (Tabela 10). Em relação ao dia 0, notou-se aumento significativo ao longo do tempo no número de células para o grupo BG2, maior no dia 42.

**Tabela 10.** Resultados de contagem de linfócitos T totais ( $CD5^+$ ) de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Dia       | Dietas <sup>1</sup>   |                    |                    |                      | EPM <sup>2</sup> | CV    | P     |
|-----------|---|--------------------|--------------------|----------------------|------------------|-------|-------|
|           | CT  | PCL                | BG1                | BG2                  |                  |       |       |
|           | <b><math>CD5^+</math> (célis x <math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b> |                    |                    |                      |                  |       |       |
| <b>0</b>  | 0,96 <sup>aA</sup>  | 0,87 <sup>aA</sup> | 0,99 <sup>aA</sup> | 0,72 <sup>aA</sup>   | 0,06             | 32,76 | 0,43  |
| <b>14</b> | 0,99 <sup>aA</sup>  | 1,18 <sup>aA</sup> | 1,05 <sup>aA</sup> | 1,35 <sup>aAB</sup>  | 0,10             | 40,95 | 0,20  |
| <b>42</b> | 1,32 <sup>aA</sup>  | 1,24 <sup>aA</sup> | 1,33 <sup>aA</sup> | 1,47 <sup>aB</sup>   | 0,09             | 32,35 | 0,62  |
| <b>56</b> | 0,74 <sup>aA</sup>  | 0,75 <sup>aA</sup> | 1,07 <sup>aA</sup> | 1,21 <sup>aAB</sup>  | 0,09             | 46,05 | 0,19  |
| <b>70</b> | 0,96 <sup>aA</sup>  | 0,76 <sup>aA</sup> | 0,70 <sup>aA</sup> | 0,79 <sup>aA</sup>   | 0,07             | 40,63 | 0,46  |
| <b>84</b> | 0,81 <sup>aA</sup>  | 0,85 <sup>aA</sup> | 0,75 <sup>aA</sup> | 0,72 <sup>aA</sup>   | 0,05             | 31,70 | 0,89  |
| <b>98</b> | 0,91 <sup>abA</sup>   | 1,34 <sup>aA</sup> | 0,77 <sup>bA</sup> | 1,22 <sup>abAB</sup> | 0,08             | 36,17 | <0,01 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>a, b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,10$ ).

<sup>A, B</sup> - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,10$ ).

Para os linfócitos T helper (CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), Tabela 11, verificou-se interação tratamento e dia (p= 0,03). No grupo BG2, o número de células se elevou significativamente nos dias 14 e 42 com relação ao dia 0. Entre grupos, observou-se que BG1 foi menor que o BG2 no dia 14 e menor que PCL e BG2 no dia 98.

**Tabela 11.** Contagem de linfócitos T *helper* (CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Dia       | Dietas <sup>1</sup>  |                     |                    |                      | EPM <sup>2</sup> | CV    | P     |
|-----------|--|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|-------|-------|
|           | CT   | PCL                 | BG1                | BG2                  |                  |       |       |
|           | <b>CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (célx x 10<sup>3</sup>/μL)</b> |                     |                    |                      |                  |       |       |
| <b>0</b>  | 0,49 <sup>aA</sup>   | 0,45 <sup>aA</sup>  | 0,49 <sup>aA</sup> | 0,43 <sup>aA</sup>   | 0,04             | 43,21 | 0,89  |
| <b>14</b> | 0,53 <sup>abA</sup>  | 0,67 <sup>abA</sup> | 0,47 <sup>aA</sup> | 0,81 <sup>bBC</sup>  | 0,05             | 40,46 | <0,01 |
| <b>42</b> | 0,71 <sup>aA</sup>   | 0,68 <sup>aA</sup>  | 0,63 <sup>aA</sup> | 0,85 <sup>aC</sup>   | 0,05             | 34,57 | 0,15  |
| <b>56</b> | 0,41 <sup>aA</sup>   | 0,44 <sup>aA</sup>  | 0,51 <sup>aA</sup> | 0,68 <sup>aABC</sup> | 0,05             | 45,36 | 0,22  |
| <b>70</b> | 0,48 <sup>aA</sup>   | 0,43 <sup>aA</sup>  | 0,32 <sup>aA</sup> | 0,43 <sup>aAB</sup>  | 0,04             | 43,72 | 0,44  |
| <b>84</b> | 0,45 <sup>aA</sup>   | 0,49 <sup>aA</sup>  | 0,33 <sup>aA</sup> | 0,41 <sup>aAB</sup>  | 0,03             | 30,59 | 0,40  |
| <b>98</b> | 0,47 <sup>abA</sup>  | 0,72 <sup>aA</sup>  | 0,35 <sup>bA</sup> | 0,70 <sup>aABC</sup> | 0,04             | 34,90 | <0,01 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>a, b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

<sup>A, B</sup> - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

Para os linfócitos T citotóxicos (CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) também houve interação tratamento e dia (p=0,08), como pode ser visto na Tabela 12. Em relação ao tempo 0, o grupo PCL apresentou aumento significativo destas células no dia 98 e o BG2 no dia 42. Além disso, no dia 98, o PCL apresentou maior contagem de CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> que CT e BG1.

**Tabela 12.** Contagem de linfócitos T citotóxicos (CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Dia       | Dietas <sup>1</sup>   |                     |                    |                      | EPM <sup>2</sup> | CV    | P     |
|-----------|---|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|-------|-------|
|           | CT  | PCL                 | BG1                | BG2                  |                  |       |       |
|           | <b>CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (cél/s x 10<sup>3</sup>/μL)</b> |                     |                    |                      |                  |       |       |
| <b>0</b>  | 0,24 <sup>aA</sup>  | 0,25 <sup>aA</sup>  | 0,25 <sup>aA</sup> | 0,17 <sup>aA</sup>   | 0,02             | 36,40 | 0,54  |
| <b>14</b> | 0,26 <sup>aA</sup>  | 0,32 <sup>aAB</sup> | 0,34 <sup>aA</sup> | 0,31 <sup>aAB</sup>  | 0,03             | 50,57 | 0,62  |
| <b>42</b> | 0,36 <sup>aA</sup>  | 0,37 <sup>aAB</sup> | 0,41 <sup>aA</sup> | 0,41 <sup>aB</sup>   | 0,04             | 44,35 | 0,79  |
| <b>56</b> | 0,20 <sup>aA</sup>  | 0,22 <sup>aA</sup>  | 0,32 <sup>aA</sup> | 0,34 <sup>aAB</sup>  | 0,03             | 51,24 | 0,24  |
| <b>70</b> | 0,25 <sup>aA</sup>  | 0,23 <sup>aA</sup>  | 0,20 <sup>aA</sup> | 0,25 <sup>aAB</sup>  | 0,02             | 48,47 | 0,84  |
| <b>84</b> | 0,21 <sup>aA</sup>  | 0,23 <sup>aA</sup>  | 0,23 <sup>aA</sup> | 0,19 <sup>aAB</sup>  | 0,02             | 39,57 | 0,90  |
| <b>98</b> | 0,24 <sup>aA</sup>  | 0,50 <sup>bB</sup>  | 0,26 <sup>aA</sup> | 0,34 <sup>abAB</sup> | 0,04             | 57,81 | <0,01 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>a, b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

<sup>A, B</sup> - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

Na relação CD4:CD8 foi observada interação entre tratamento e tempo ( $p=0,08$ ), BG1 demonstrou menor contagem de células que BG2 e PCL no 14º dia após o início da administração dos derivados de parede celular de levedura. No dia 84, BG1 também foi menor que CT (Tabela 13).

**Tabela 13.** Relação CD4:CD8 de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Dia       | Dietas <sup>1</sup> |                     |                    |                     | EPM <sup>2</sup> | CV    | P     |
|-----------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------|-------|
|           | CT                  | PCL                 | BG1                | BG2                 |                  |       |       |
|           | Relação CD4:CD8     |                     |                    |                     |                  |       |       |
| <b>0</b>  | 2,07 <sup>aA</sup>  | 2,06 <sup>aA</sup>  | 2,04 <sup>aA</sup> | 2,60 <sup>aA</sup>  | 0,19             | 42,89 | 0,12  |
| <b>14</b> | 2,17 <sup>abA</sup> | 2,68 <sup>bA</sup>  | 1,39 <sup>aA</sup> | 2,90 <sup>bA</sup>  | 0,20             | 43,79 | <0,01 |
| <b>42</b> | 2,24 <sup>aA</sup>  | 2,10 <sup>aA</sup>  | 1,54 <sup>aA</sup> | 2,21 <sup>aA</sup>  | 0,15             | 36,92 | 0,35  |
| <b>56</b> | 2,21 <sup>aA</sup>  | 2,13 <sup>aA</sup>  | 1,51 <sup>aA</sup> | 2,25 <sup>aA</sup>  | 0,14             | 33,08 | 0,22  |
| <b>70</b> | 2,18 <sup>aA</sup>  | 2,10 <sup>aA</sup>  | 1,86 <sup>aA</sup> | 1,70 <sup>aA</sup>  | 0,18             | 43,73 | 0,69  |
| <b>84</b> | 2,46 <sup>aA</sup>  | 2,28 <sup>abA</sup> | 1,44 <sup>bA</sup> | 2,23 <sup>abA</sup> | 0,17             | 39,21 | <0,01 |
| <b>98</b> | 2,32 <sup>aA</sup>  | 1,84 <sup>aA</sup>  | 1,39 <sup>aA</sup> | 2,16 <sup>aA</sup>  | 0,17             | 42,13 | 0,24  |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>a, b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,10$ ).

<sup>A, B</sup> - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,10$ ).

Com relação aos linfócitos B (CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>) notou-se aumento no número de células no dia 98 para os tratamentos PCL e BG2, que se revelaram maiores que o verificado para o grupo controle (Tabela 14).

**Tabela 14.** Contagem de linfócitos B (CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>) de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

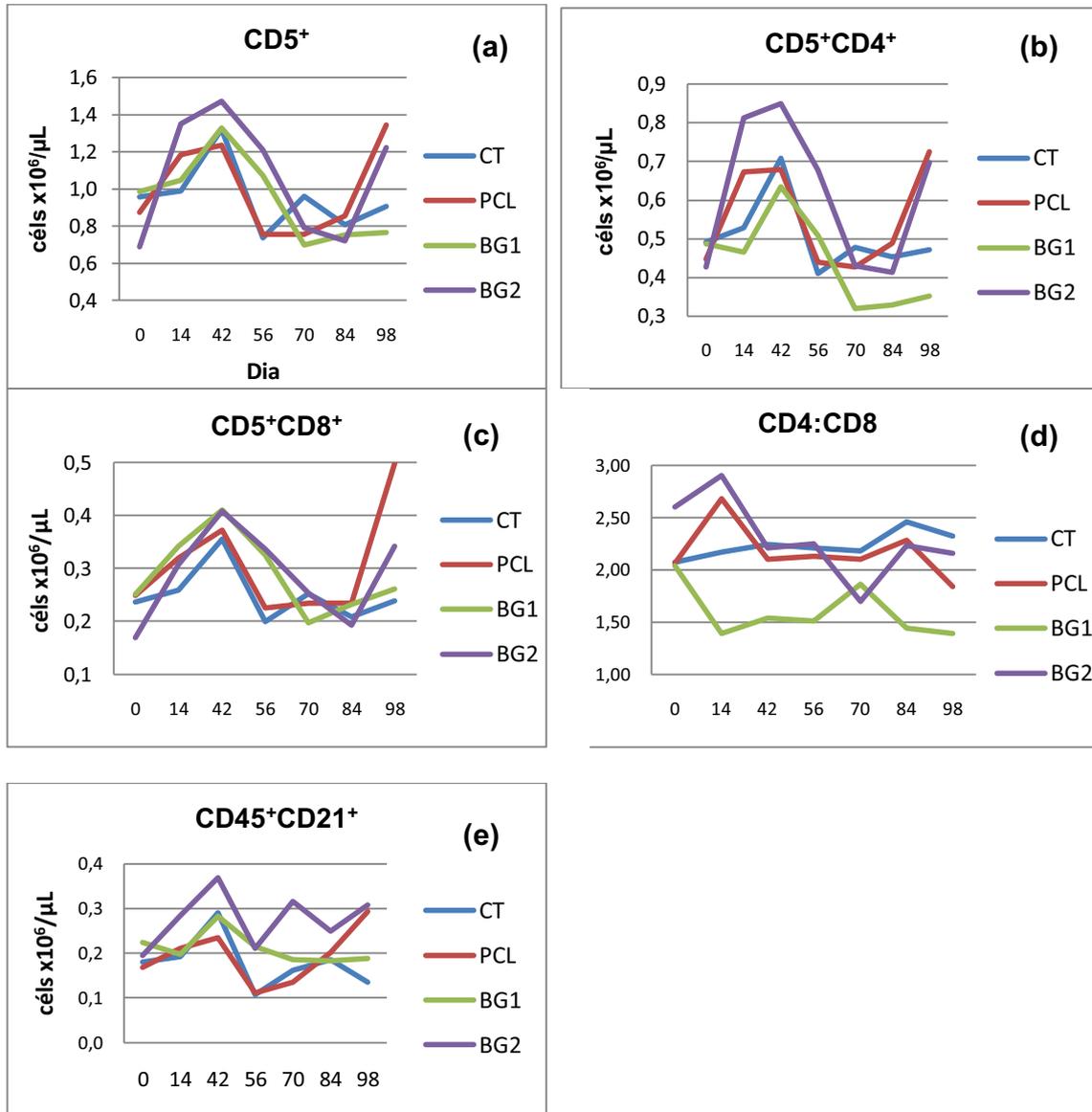
| Dia       | Dietas <sup>1</sup>   |                    |                     |                    | EPM <sup>2</sup> | CV    | P     |
|-----------|---|--------------------|---------------------|--------------------|------------------|-------|-------|
|           | CT  | PCL                | BG1                 | BG2                |                  |       |       |
|           | <b>CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> (célis x 10<sup>3</sup>/μL)</b> |                    |                     |                    |                  |       |       |
| <b>0</b>  | 0,18 <sup>aAB</sup>   | 0,17 <sup>aA</sup> | 0,22 <sup>aA</sup>  | 0,19 <sup>aA</sup> | 0,02             | 47,10 | 0,73  |
| <b>14</b> | 0,19 <sup>aAB</sup>   | 0,21 <sup>aA</sup> | 0,20 <sup>aA</sup>  | 0,28 <sup>aA</sup> | 0,03             | 58,41 | 0,25  |
| <b>42</b> | 0,29 <sup>aA</sup>  | 0,23 <sup>aA</sup> | 0,28 <sup>aA</sup>  | 0,37 <sup>aA</sup> | 0,03             | 51,61 | 0,43  |
| <b>56</b> | 0,11 <sup>aB</sup>  | 0,11 <sup>aA</sup> | 0,21 <sup>aA</sup>  | 0,21 <sup>aA</sup> | 0,02             | 58,31 | 0,10  |
| <b>70</b> | 0,16 <sup>aAB</sup>   | 0,13 <sup>aA</sup> | 0,18 <sup>aA</sup>  | 0,31 <sup>aA</sup> | 0,03             | 71,37 | 0,11  |
| <b>84</b> | 0,18 <sup>aAB</sup>   | 0,20 <sup>aA</sup> | 0,18 <sup>aA</sup>  | 0,25 <sup>aA</sup> | 0,02             | 48,81 | 0,55  |
| <b>98</b> | 0,13 <sup>aAB</sup>   | 0,29 <sup>bA</sup> | 0,19 <sup>abA</sup> | 0,31 <sup>bA</sup> | 0,02             | 43,50 | <0,01 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>a, b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

<sup>A, B</sup> - médias na coluna sem uma letra maiúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).



**Figura 3.** Contagens das subpopulações de linfócitos de cães controle e mediante consumo de derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar: (a) Linfócitos T totais (CD5<sup>+</sup>); (b) Linfócitos T *helper* (CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>); (c) Linfócitos T citotóxicos (CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>); (d) Relação CD4:CD8; (e) Linfócitos B (CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>). CT = grupo controle; PCL = parede celular de levedura; BG1 = beta-glucano 1; BG2 = beta-glucano 2.

#### 5.4 Avaliação de IgA nas fezes

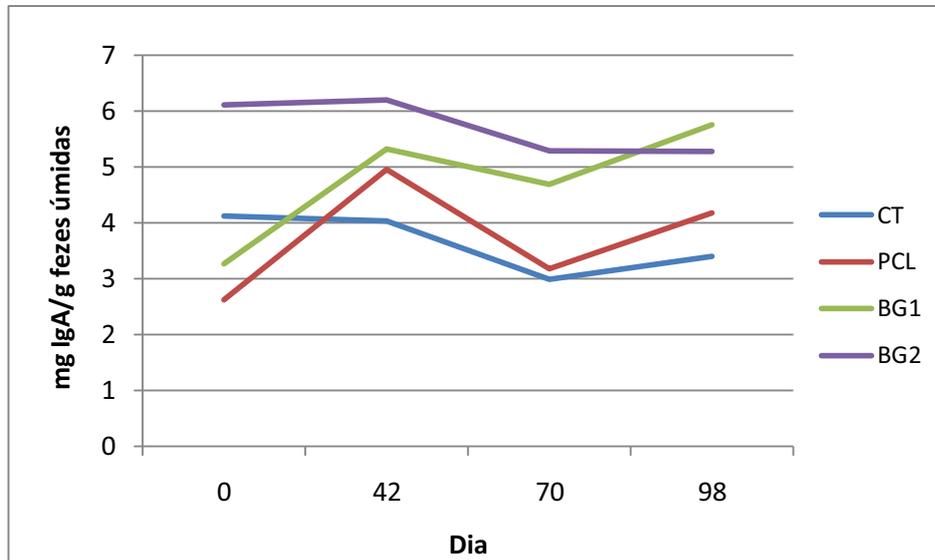
Foram observadas discretas variações nas concentrações fecais de IgA. Não houve interação entre tratamento e dia ( $p=0,82$ ), nem efeito geral de tratamento ou dia de mensuração ( $p>0,1$ ).

**Tabela 15.** Concentração de IgA nas fezes de cães (mg IgA por g fezes úmidas) de cães controle e mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Dia                                 | Dietas <sup>1</sup> |      |      |      | EPM <sup>2</sup> | CV    | P    |
|-------------------------------------|---------------------|------|------|------|------------------|-------|------|
|                                     | CT                  | PCL  | BG1  | BG2  |                  |       |      |
| mg de IgA por grama de fezes úmidas |                     |      |      |      |                  |       |      |
| <b>0</b>                            | 4,12                | 2,62 | 3,27 | 6,11 | 0,40             | 48,09 |      |
| <b>42</b>                           | 4,04                | 4,96 | 5,32 | 6,20 | 0,53             | 50,78 |      |
| <b>70</b>                           | 2,99                | 3,18 | 4,69 | 5,29 | 0,66             | 83,00 |      |
| <b>98</b>                           | 3,40                | 4,18 | 5,76 | 5,28 | 0,57             | 60,30 |      |
| Média                               | 3,59                | 3,74 | 4,76 | 5,72 |                  |       | 0,18 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.



**Figura 4.** Concentração de IgA nas fezes de cães (mg IgA por g fezes úmidas) mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar. CT = grupo controle; PCL = parede celular de levedura; BG1 = beta-glucano 1; BG2 = beta-glucano 2.

### 5.5 Teste de hipersensibilidade tardia

Os resultados do teste de hipersensibilidade tardia estão apresentados na Tabela 16. Os grupos PCL e BG2 apresentaram maior resposta de hipersensibilidade que o grupo controle à inoculação intradérmica de vacina polivalente (Figura 5).

**Tabela 16.** Resposta de hipersensibilidade tardia de cães mediante consumo de dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Injeção  | Dia | Hora | Dietas <sup>1</sup> |                     |                     |                     | EPM <sup>2</sup> | CV    | P    |
|--|-----|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|-------|------|
|  |     |      | CT                  | PCL                 | BG1                 | BG2                 |                  |       |      |
| <i>Varição percentual da espessura cutânea em relação à hora 0</i> |     |      |                     |                     |                     |                     |                  |       |      |
| Salina   | 0   | 24   | -12,30 <sup>a</sup> | -17,32 <sup>a</sup> | -17,87 <sup>a</sup> | -15,35 <sup>a</sup> | 1,32             | 25,18 | 0,37 |
| Salina   | 0   | 48   | -10,39 <sup>a</sup> | -14,66 <sup>a</sup> | -16,12 <sup>a</sup> | -13,20 <sup>a</sup> | 1,36             | 25,14 | 0,48 |
| Salina   | 0   | 72   | -13,12 <sup>a</sup> | -9,68 <sup>a</sup>  | -15,47 <sup>a</sup> | -14,81 <sup>a</sup> | 1,96             | 13,53 | 0,84 |
| Salina   | 49  | 24   | -16,21 <sup>a</sup> | -6,59 <sup>a</sup>  | -14,89 <sup>a</sup> | -8,11 <sup>a</sup>  | 1,59             | 15,52 | 0,15 |
| Salina   | 49  | 48   | -11,97 <sup>a</sup> | -5,80 <sup>a</sup>  | -13,55 <sup>a</sup> | -9,87 <sup>a</sup>  | 1,33             | 13,07 | 0,41 |
| Salina   | 49  | 72   | -11,77 <sup>a</sup> | -9,33 <sup>a</sup>  | -14,02 <sup>a</sup> | -13,24 <sup>a</sup> | 1,05             | 12,26 | 0,56 |
| Salina   | 98  | 24   | -9,24 <sup>a</sup>  | -9,19 <sup>a</sup>  | -13,14 <sup>a</sup> | -6,82 <sup>a</sup>  | 1,33             | 10,32 | 0,51 |
| Salina   | 98  | 48   | -8,00 <sup>a</sup>  | -7,64 <sup>a</sup>  | -9,54 <sup>a</sup>  | -5,45 <sup>a</sup>  | 0,98             | 7,24  | 0,55 |
| Salina   | 98  | 72   | -7,60 <sup>a</sup>  | -7,00 <sup>a</sup>  | -7,34 <sup>a</sup>  | -6,30 <sup>a</sup>  | 1,22             | 8,43  | 0,99 |
| FHG <sup>3</sup>   | 0   | 24   | 5,56 <sup>a</sup>   | 4,31 <sup>a</sup>   | 6,65 <sup>a</sup>   | 6,71 <sup>a</sup>   | 1,63             | 5,80  | 0,96 |
| FHG  | 0   | 48   | 0,49 <sup>a</sup>   | -1,47 <sup>a</sup>  | -5,25 <sup>a</sup>  | -5,61 <sup>a</sup>  | 1,71             | 0,31  | 0,60 |
| FHG  | 0   | 72   | -5,01 <sup>a</sup>  | -6,12 <sup>a</sup>  | -9,54 <sup>a</sup>  | -14,17 <sup>a</sup> | 1,81             | 14,84 | 0,29 |
| FHG  | 49  | 24   | 10,55 <sup>a</sup>  | 9,38 <sup>a</sup>   | 12,25 <sup>a</sup>  | 9,57 <sup>a</sup>   | 1,84             | 5,67  | 0,96 |
| FHG  | 49  | 48   | -3,31 <sup>a</sup>  | 1,28 <sup>a</sup>   | 3,31 <sup>a</sup>   | -5,29 <sup>a</sup>  | 1,35             | 6,95  | 0,08 |
| FHG  | 49  | 72   | -4,98 <sup>a</sup>  | -5,04 <sup>a</sup>  | -5,94 <sup>a</sup>  | -10,79 <sup>a</sup> | 1,12             | 7,82  | 0,20 |

Continua...

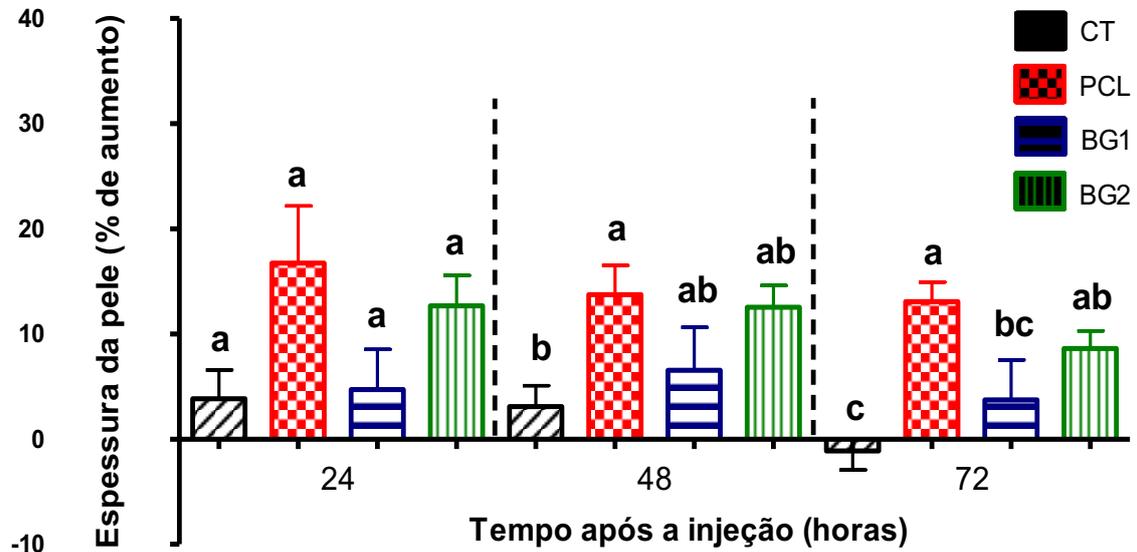
| Injeção  | Dia | Hora | Diets <sup>1</sup> |                    |                     |                     | EPM <sup>2</sup> | CV    | P     |
|--|-----|------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|-------|-------|
|  |     |      | CT                 | PCL                | BG1                 | BG2                 |                  |       |       |
| <i>Varição percentual da espessura cutânea em relação à hora 0</i> |     |      |                    |                    |                     |                     |                  |       |       |
| <i>FHG</i>   | 98  | 24   | 11,26 <sup>a</sup> | 8,70 <sup>a</sup>  | 9,02 <sup>a</sup>   | 9,80 <sup>a</sup>   | 1,70             | 6,20  | 0,86  |
| <i>FHG</i>   | 98  | 48   | -4,14 <sup>a</sup> | -2,91 <sup>a</sup> | -1,09 <sup>a</sup>  | -1,5 <sup>a</sup>   | 1,30             | 7,09  | 0,91  |
| <i>FHG</i>   | 98  | 72   | -6,53 <sup>a</sup> | -1,90 <sup>a</sup> | -4,05 <sup>a</sup>  | -5,28 <sup>a</sup>  | 1,30             | 8,28  | 0,79  |
| <i>Vacina</i>  | 0   | 24   | 5,42 <sup>a</sup>  | 14,83 <sup>a</sup> | 1,83 <sup>a</sup>   | 9,28 <sup>a</sup>   | 3,78             | 16,28 | 0,38  |
| <i>Vacina</i>  | 0   | 48   | 7,07 <sup>a</sup>  | 15,66 <sup>a</sup> | 2,92 <sup>a</sup>   | 10,05 <sup>a</sup>  | 3,39             | 16,99 | 0,42  |
| <i>Vacina</i>  | 0   | 72   | 0,51 <sup>a</sup>  | 9,59 <sup>a</sup>  | -2,26 <sup>a</sup>  | -0,25 <sup>a</sup>  | 2,42             | 22,22 | 0,28  |
| <i>Vacina</i>  | 49  | 24   | 11,50 <sup>a</sup> | 28,33 <sup>a</sup> | 10,70 <sup>a</sup>  | 25,07 <sup>a</sup>  | 3,52             | 7,62  | 0,16  |
| <i>Vacina</i>  | 49  | 48   | 7,92 <sup>b</sup>  | 25,70 <sup>a</sup> | 12,41 <sup>ab</sup> | 19,99 <sup>ab</sup> | 2,45             | 6,06  | 0,06  |
| <i>Vacina</i>  | 49  | 72   | 5,87 <sup>a</sup>  | 18,22 <sup>a</sup> | 3,62 <sup>a</sup>   | 13,81 <sup>a</sup>  | 2,30             | 10,59 | 0,18  |
| <i>Vacina</i>  | 98  | 24   | 3,83 <sup>a</sup>  | 16,75 <sup>a</sup> | 4,71 <sup>a</sup>   | 12,69 <sup>a</sup>  | 1,94             | 6,59  | 0,08  |
| <i>Vacina</i>  | 98  | 48   | 3,08 <sup>b</sup>  | 13,73 <sup>a</sup> | 6,54 <sup>ab</sup>  | 12,54 <sup>ab</sup> | 1,43             | 5,19  | 0,05  |
| <i>Vacina</i>  | 98  | 72   | -1,13 <sup>c</sup> | 13,08 <sup>a</sup> | 3,74 <sup>bc</sup>  | 8,62 <sup>ab</sup>  | 1,22             | 5,07  | <0,01 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 por tratamento.

<sup>3</sup> - fitoemaglutinina

<sup>a, b, c</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,10).



**Figura 5.** Resposta de hipersensibilidade tardia de cães (expressa como porcentagem de aumento na espessura de pele em relação à hora 0) à vacina polivalente no dia 98. A espessura da pele foi medida 0, 24, 48 e 72 horas após a injeção. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, médias em cada tempo sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,10$ ).

### 5.6 Dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular

Os resultados da produção *ex vivo* de citocinas mediante estimulação de cultura de células mononucleares estão apresentados na Tabela 17. A concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) diferiu entre os grupos, sendo no grupo BG2 significativamente maior que o controle nas culturas de células estimuladas com LPS e com vacina. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$ .

**Tabela 17.** Concentrações médias de citocinas em sobrenadante de cultura celular de células mononucleares de cães mediante consumo das dietas com diferentes derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar.

| Citocina            | Dieta <sup>1</sup>  |                      |                      |                     | EPM <sup>2</sup> | CV    | P    |
|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|-------|------|
|                     | CT                  | PCL                  | BG1                  | BG2                 |                  |       |      |
|                     | <i>pg/mL</i>        |                      |                      |                     |                  |       |      |
| <b><i>IL-4</i></b>  |                     |                      |                      |                     |                  |       |      |
| Células             | 8,65 <sup>a</sup>   | 35,13 <sup>a</sup>   | 67,9 <sup>a</sup>    | 106,52 <sup>a</sup> | 19,64            | 176,3 | 0,35 |
| LPS                 | 174,41 <sup>a</sup> | 134,12 <sup>a</sup>  | 26,36 <sup>a</sup>   | 51,62 <sup>a</sup>  | 31,69            | 160,7 | 0,34 |
| Vacina              | 36,59 <sup>a</sup>  | 163,2 <sup>a</sup>   | 39,24 <sup>a</sup>   | 74,72 <sup>a</sup>  | 30,24            | 188,9 | 0,43 |
| <b><i>IFN-γ</i></b> |                     |                      |                      |                     |                  |       |      |
| Células             | 12,71 <sup>a</sup>  | 17,11 <sup>a</sup>   | 19,64 <sup>a</sup>   | 116,92 <sup>a</sup> | 25,56            | 301,8 | 0,42 |
| LPS                 | 15,21 <sup>a</sup>  | 16,88 <sup>a</sup>   | 12,37 <sup>a</sup>   | 43,67 <sup>a</sup>  | 7,44             | 165,5 | 0,43 |
| Vacina              | 12,30 <sup>a</sup>  | 17,99 <sup>a</sup>   | 16,98 <sup>a</sup>   | 97,37 <sup>a</sup>  | 20,89            | 283,0 | 0,43 |
| <b><i>TNF-α</i></b> |                     |                      |                      |                     |                  |       |      |
| Células             | 105,06 <sup>b</sup> | 186,79 <sup>ab</sup> | 245,10 <sup>ab</sup> | 320,13 <sup>a</sup> | 29,51            | 67,5  | 0,10 |
| LPS                 | 156,8 <sup>b</sup>  | 285,7 <sup>ab</sup>  | 136,5 <sup>b</sup>   | 460,0 <sup>a</sup>  | 39,49            | 74,5  | 0,03 |
| Vacina <sup>3</sup> | 143,4 <sup>b</sup>  | 306,1 <sup>ab</sup>  | 179,3 <sup>ab</sup>  | 381,7 <sup>a</sup>  | 38,07            | 73,8  | 0,05 |
| <b><i>IL-6</i></b>  |                     |                      |                      |                     |                  |       |      |
| Células             | 0,00 <sup>a</sup>   | 1,25 <sup>a</sup>    | 1,28 <sup>a</sup>    | 1,20 <sup>a</sup>   | 0,34             | 179,8 | 0,49 |
| LPS                 | 10,76 <sup>a</sup>  | 1,30 <sup>a</sup>    | 4,32 <sup>a</sup>    | 4,60 <sup>a</sup>   | 2,36             | 225,3 | 0,57 |
| Vacina              | 22,62 <sup>a</sup>  | 0,69 <sup>a</sup>    | 1,20 <sup>a</sup>    | 2,41 <sup>a</sup>   | 4,69             | 324,9 | 0,30 |

<sup>1</sup> - CT = grupo controle; PCL = 0,2% de parede celular de levedura; BG1 = 0,015% beta-glucano 1; BG2 = 0,015% beta-glucano 2.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=6 cães por dieta

<sup>3</sup> - resultados estatísticos obtidos mediante transformação logarítmica das variáveis - log (x + 1).

<sup>a,b</sup> - médias na linha sem uma letra minúscula em comum diferem pelo teste de Tukey (p≤0,10).

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo é, até então, o primeiro localizado na literatura envolvendo a inclusão de beta-1,3/1,6-glucano em alimento extrusado para cães. A ingestão dos alimentos com derivados de parede celular de levedura resultou em alteração em alguns dos parâmetros imunes mensurados para os grupos PCL e BG2, mas não para BG1, demonstrando que nem todos estes compostos têm ação semelhante.

O experimento foi conduzido em um planejamento inicial de 84 dias (12 semanas) de duração. Por indisponibilidade de laboratórios, a terceira coleta precisou ser adiada, estendendo o período total em duas semanas, totalizando 98 dias. Quase ao término desse período, considerou-se a possibilidade de realização das dosagens de citocinas em sobrenadante de cultura celular. Devido à dificuldade em padronizar a técnica, este exame só foi possível no dia experimental 126, sendo, então, realizado apenas uma vez, ao final do período experimental.

Os parâmetros de bioquímica sérica apresentaram certa variação entre os grupos. Apesar disso, todos permaneceram dentro dos valores de normalidade para cães preconizados por Kaneko et al. (1997). Algumas das diferenças encontradas já estavam presentes na avaliação basal, sugerindo que não houve influência dos nutracêuticos sobre tais parâmetros. Na avaliação eritroleucométrica as médias de alguns grupos ficaram abaixo dos valores de normalidade para cães sugeridos por Feldman; Zinkl; Jain (2000) para hemácias, hematócrito, eosinófilos e monócitos. Entretanto, ficaram muito próximas dos limites inferiores, indicando alterações discretas. Ao longo do estudo estes valores se elevaram, atingindo todos os grupos os valores de normalidade para cães, exceto para eosinófilos.

Apesar de avaliar a imunocompetência de forma não antígeno-específica, a contagem de linfócitos do hemograma revelou aumento ao longo do tempo no grupo BG2. Esse aumento foi mais evidenciado na quantificação das subpopulações dessa célula pela imunofenotipagem, à qual também foram notadas diferenças para os cães consumindo PCL. A adição de BG2 à dieta levou ao aumento no tempo do número de linfócitos T totais, T helper, T citotóxicos, enquanto a adição de PCL em aumento de linfócitos T citotóxicos. Efeitos entre tratamentos em cada tempo, no entanto, foram

menos pronunciados, ficando estes mais evidentes, de maneira geral, no dia 98 com menores contagens de linfócitos T totais, T helper e T citotóxicos para o tratamento BG1, apresentando o tratamento CT valores intermediários ou mais baixos que BG2 e PCL. As contagens de linfócitos B no dia 98, no entanto, foram maiores para BG2 e PCL, intermediárias para BG1 e menores para CT.

Efeitos sobre a imunidade, resultantes da ingestão oral de parede celular de levedura, já foram estudados na espécie canina. Gomes (2009) encontrou resultados semelhantes aos do presente estudo, também com aumento de linfócitos B e linfócitos T totais. Outros estudos envolvendo PCL e subpopulações linfocitárias com cães não foram encontrados. Com relação aos efeitos da fração beta-glucano por via oral, os resultados encontrados são os primeiros com este tipo de avaliação, mostrando sua ação também na espécie canina.

Talvez os efeitos observados não tenham sido mais significativos pelas doses empregadas. Chae et al. (2006) mostraram que a suplementação com beta-glucano em frangos de corte foi benéfica, causando aumento das células CD8<sup>+</sup>. No entanto, a dose empregada por estes pesquisadores foi quase o triplo (0,04%) da usada no atual trabalho. Na dose de 0,02% eles não notaram diferença nas concentrações sanguíneas destas células. Diferenças nas subpopulações de células CD4<sup>+</sup> e linfócitos B também não foram encontradas. Em outro trabalho com aves, Guo; Ali; Qureshi (2003) notaram aumento de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> em linfócitos intestinais intraepiteliais. Em suínos, resposta ao BG foi demonstrada com 0,02% de inclusão, estes animais tiveram elevação das células T *helper* e T citotóxicas após 8 semanas de experimento (Hahn et al., 2006). Estes autores também observaram efeitos positivos sobre a digestibilidade, sendo essa aumentada para a matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo, cálcio e fósforo.

As contagens de linfócitos T e B não demonstraram aumento após a estimulação vacinal com antígenos de *Leptospira*. De maneira geral, a contagem dos diferentes subtipos de linfócitos não se alterou no tempo ( $p > 0.1$ ), com exceção do grupo BG2 e de T citotóxico para PCL. Aplicou-se a vacina contra leptospirose para imunoestimulação dos animais e melhor avaliação de sua competência imunológica, semelhante ao desafio antigênico realizado por Stuyven et al. (2010) em cães, que utilizaram uma

vacina bivalente, contra *Bordetella bronchiseptica* e o vírus da Parainfluenza tipo 2. Supôs-se que com essa carga antigênica, diferenças na resposta imune entre os grupos seriam mais evidenciadas. A escolha desta vacina se deu pelos animais serem previamente vacinados com os sorovares contidos nela e pela metodologia de avaliação sorológica estar bem padronizada. A soroaglutinação microscópica, no entanto, se mostrou técnica pouco sensível na detecção de anticorpos anti-*Leptospira*. Notaram-se baixos títulos, mesmo após a vacinação, sendo que os animais responderam de maneira um pouco maior em somente um dos quatro sorovares presentes na vacina (*Icterohaemorrhagiae*). É possível que o emprego de técnica mais sensível e específica, que permitisse a quantificação de anticorpos anti-*Leptospira*, resultasse em melhor avaliação da imunidade humoral dos animais. Outra possibilidade a ser considerada seria a baixa efetividade da vacina empregada, que teria baixa capacidade imunogênica, pelo protocolo utilizado.

Na avaliação da imunidade de mucosa, pela quantificação de IgA nas fezes, não se observou influência dos nutracêuticos. Outros trabalhos avaliaram, em cães, a ação da PCL sobre a secreção intestinal de IgA. Middelbos et al. (2007) encontraram tendência a aumento de IgA ( $p < 0,09$ ) no conteúdo ileal com suplementação de 0,25% de PCL por 14 dias, no entanto, Swanson et al. (2002), ao avaliarem o fornecimento oral de cápsulas com 1 grama de PCL não verificaram efeito sobre a concentração de IgA ileal. Desta forma, ainda são muito poucos os estudos sobre os efeitos da PCL sobre a concentração de IgA em conteúdo intestinal de cães, merecendo este aspecto futuras investigações. Em suínos, efeitos sobre o aumento dessa classe de imunoglobulinas foram observados para leitões que receberam PCL na dose de 1 g/kg de alimento (NOCHTA et al., 2009), apontando, talvez, para melhores resultados da PCL em filhotes.

Para a fração beta-glucano, alterações nas quantidades de IgA também já foram relatadas para cães. Estudando a administração oral de 225 mg de beta-1,3/1,6-glucano de *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de tabletes, Stuyven et al. (2010) encontraram redução significativa de IgA salivar e lacrimal (comparado a uma dose de aproximadamente 24 mg por animal, do presente estudo). Levantaram como hipótese

para esse declínio um direcionamento da resposta imune para o tipo T helper 1 (Th1), induzida pelas citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$ , secretadas após a interação do  $\beta$ -glucano com o receptor dectina-1. Esta hipótese também se evidenciou pelo aumento da secreção de IgA após cessar o fornecimento de  $\beta$ -glucano.

O teste de hipersensibilidade tardia evidenciou aumento significativo na resposta cutânea à aplicação de vacina polivalente para os animais que consumiram PCL e BG2. A utilização da vacina polivalente para este teste foi considerada, pois seis meses antes do início do experimento os animais tinham recebido esta mesma vacina. Além disso, os quatro sorovares de leptospira contidos na vacina polivalente foram os mesmos da vacina contra leptospirose usada para imunoestimulação. Estudos com outras espécies também mostraram efeitos positivos sobre a resposta de hipersensibilidade tardia em camundongos que receberam beta-1,3-glucano (PAULÍK et al., 2006; CHEN; ZHANG, CHEUNG, 2010).

O teste de hipersensibilidade tardia é considerado um bom indicador *in vivo* da imunidade mediada por células (KIM, S. et al., 2000). Os resultados encontrados para BG2 no presente experimento podem estar relacionados ao aumento dos linfócitos T helper, envolvidos neste tipo de imunidade, verificado para este tratamento. Segundo Kim, et al. (2000), o aumento de resposta de hipersensibilidade à vacina é indicativo de uma resposta imune específica, mediada pela ação de células T *helper* que atuam como células efetoras no local da reação, ou pelo aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, classe II, resultando em uma apresentação antigênica mais eficiente. Citocinas como IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são também importantes participantes na resposta de hipersensibilidade tardia (KIM, S. et al., 2000). Assim, o aumento de TNF- $\alpha$ , verificado no sobrenadante da cultura de células mononucleares dos cães que consumiram BG2, pode também ter influenciado o aumento da resposta de hipersensibilidade deste grupo.

O aumento de resposta neste teste, também para o grupo PCL, pode ser pela presença de mananos em sua composição. Sugimoto et al. (1995), utilizaram mananos, inclusive derivados de levedura, na inoculação intradérmica, juntamente com

ovalbumina, em camundongos, e observaram uma resposta aumentada, sugerindo que esse produto poderia ser usado com adjuvante para indução de imunidade celular.

Aumento na secreção de citocinas mediante suplementação com  $\beta$ -glucano já foi demonstrado em outras espécies (OLSON et al., 1996; BERNER et al., 2005). O  $\beta$ -glucano parece atuar mediante estímulo à produção de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, INF- $\gamma$  e IL-8. Seu efeito está relacionado à ação em monócitos/macrófagos, ativando estas células e direcionando a resposta imune para o tipo Th1 (BARAN et al., 2007). Estudos com cães não foram localizados para comparar os dados aqui encontrados. A ausência de resposta sobre as demais citocinas avaliadas pode se dever a uma baixa suplementação de  $\beta$ -glucano ou a uma baixa sensibilidade do método, que levou a obtenção de coeficientes de variação extremamente elevados.

As partículas de glucano são captadas por macrófagos do trato gastrintestinal e transportadas para o baço, linfonodos e medula óssea (HONG et al., 2004). Baran et al. (2007) formularam a hipótese de que os macrófagos nos tecidos linfóides secretam IL-12, que estimula as células T *naive* a se tornarem células Th1 IFN- $\gamma$ +, em vez de células Th2 IL-4+.

Esse direcionamento de resposta para Th1, induzido pelo glucano, pode representar um mecanismo de proteção para o organismo. Este tipo de imunidade é importante para a erradicação de parasitas intracelulares, incluindo bactérias, parasitas, fungos e vírus, apesar de que, se descontrolada, pode mediar imunopatologia, provocando doenças auto-imunes. A resposta Th2 é importante para controlar helmintos e outros parasitas extracelulares, entretanto pode mediar manifestações alérgicas e atópicas (O'GARRA & ARAI, 2000).

Mais estudos seriam necessários para se explicar a ausência de resposta à suplementação com BG1. Mesmo com quantidade maior de glucanos em sua composição que BG2, a ação sobre a imunidade não foi observada. Provavelmente, esta se deva ao tipo de partícula utilizada. Variações no processo de purificação da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a extração das frações específicas podem ter alterado a configuração espacial da molécula de beta-1,3/1,6-

glucano, interferindo em seu reconhecimento pelos receptores dectina-1 ou complemento 3.

Alguns trabalhos já mostraram que o tipo de partícula pode influenciar diretamente no tipo de resposta desenvolvida ao glucano. Lee et al. (2001) demonstraram que uma purificação maior do produto, com remoção completa das mananoproteínas, levou a uma estimulação maior de macrófagos. Hunter; Gault; Berner (2002) sugerem que também o tamanho da partícula pode afetar essa resposta, partículas menores e não agregadas foram mais efetivas para melhorar a fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos, após ingestão oral da substância.

## **7. CONCLUSÃO**

Verificou-se que a parede celular de levedura spray dry e derivado desta concentrado em beta 1,3/1,6-glucano atuam sobre a imunidade de cães. Diferenças entre os tipos de partículas e sua forma de obtenção devem ser consideradas. A inclusão desses nutracêuticos no alimento de cães promove imunoestimulação, necessitando-se, no entanto, se definir as melhores doses de suplementação.

## 8. REFERÊNCIAS

BARAN, J. et al Oral  $\beta$ -glucan adjuvant therapy converts nonprotective Th2 response to protective Th1 cell-mediated immune response in mammary tumor-bearing mice. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 45, n. 2, p. 107-114, 2007.

BERNER, M.D. et al. IFN- $\gamma$  primes macrophages for enhanced TNF- $\alpha$  expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate B-glucan. *Immunology letters*, v. 98, n.1, p. 115-122, 2005.

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

CHAE, B.J. et al. Effects of supplementation of b-glucan on the growth performance and immunity in broilers. **Research in veterinary science**, v. 80, n.1, p. 291–298, 2006.

CHEN, X; ZHANG, L.; CHEUNG, P.C.K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated  $\beta$ -(1,3)-d-glucan from *Poria cocos* **International Immunopharmacology** Article in press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/15675769>>, 2010.

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

CROSS, G.G. et al. Immunostimulant oxidized  $\beta$ -glucan conjugates. **International immunopharmacology**, v.1, n.1, p. 539–550, 2001.

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

FRANKLIN, S.T. et al. Immune Parameters of Dry Cows Fed Mannan Oligosaccharide and Subsequent Transfer of Immunity to Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 766-775, 2005.

GIBSON G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota, introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1400-1412, 1995.

GOMES, M.O.S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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

GUO, Y.; ALI, R.A.; QURESHI, M.A. The Influence of  $\beta$ -Glucan on Immune Responses in Broiler Chicks. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 461-472, 2003.

HAHN, T.W. et al. Effects of supplementation of  $\beta$ -glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1422-1428, 2006.

HALADOVÁ, E. et al. The effect of  $\beta(1,3/1,6)$ d-glucan on selected non-specific and specific immunological parameters in dogs after vaccination **Folia Veterinaria**, v. 53, n. 1, p. 43-46, 2009.

HOHL, T.M.; PAMER, E.G. Cracking the fungal armor. **Nature Medicine**. v. 12, p. 730-732.

HONG F. et al. Mechanism by which orally administered  $\beta$ -glucans enhance the activity of anti-tumor antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 797-806, 2004.

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932p.

KIM, H.W. et al. Dietary lutein stimulates immune response in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 74, p.315-327, 2000.

KIM, S.Y. et al. Biomedical Issues of Dietary fiber Beta-Glucan. **Journal of korean medical science**, v. 21, n. 1, p. 781-789, 2006.

KOGAN, G.; KOCHER A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109 , n.1-3, p. 161-165, 2007.

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

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

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

MANTOVANI, M.S. et al. Beta-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation research**, v. 658 , n. 3, p. 154-161, 2008.

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

MIDDELBOSS, I.S.; GODOY, M.R.; FASTINGER, N.D.; FAHEY, G.C.Jr. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, p.3022–3032, 2007.

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

NOCHTA, I. et al. Effect of different levels of mannan-oligosaccharide supplementation on some immunological variables in weaned piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 496-504, 2009.

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

OLSON, E.J. et al. Fungal  $\beta$ -Glucan Interacts with Vitronectin and Stimulates Tumor Necrosis Factor Alpha Release from Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3548–3554. 1996.

PAULÍK, et al. The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 43, n. 3, p. 129-136, 1996.

PELÍCIA, K. et al. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, n.3, p.163–169, 2004.

PETERS, I.R. et al. Measurement of Immunoglobulin Concentrations in the Feces of Healthy Dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n. 5, p. 841–848, 2004.

ROBINOW, C.F.; JOHNSON, B.F. Yeast cytology: an overview. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The Yeasts: yeast organelles**. 2. ed. London: Academic Press, 1991. v.4, cap. 2, p. 7-120.

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

SHASHIDHARA, R.G.; DEVEGOWDA, G. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide on Broiler Breeder Production Traits and Immunity. **Poultry Science**, v. 82, p. 1319–1325, 2003.

STAYKOV, Y. et al. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, p. 153–161, 2007.

STUYVEN, E. et al. Effect of  $\beta$ -glucans on an ETEC infection in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 60–66, 2009.

STUYVEN, E. et al. Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan to dogs temporally changes total and antigen 1 specific IgA and IgM **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 281-285, 2010.

SUGIMOTO, M. et al. Oligomannose-coated liposomes as an adjuvant for the induction of cell-mediated immunity. **FEBS Letters**, v. 363, n.1-2, p.53-56, 1995.

SUZUKI, I. et al. Immunomodulation by orally administered b-glucan in mice. **International journal of immunopharmacology**, v.11, n.1, p. 761–769, 1989.

SWANSON, K.S. et al. Effects of Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides on Colonic Microbial Populations, Immune Function and Fecal Odor Components in the Canine. **Journal of Nutrition**, v. 132, n.1, p. 1717S–1719S, 2002.

TINO, M. S. et al. Immunomodulatory effect of glucan on the response to experimental antirabies vaccination. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 431-435, 1993.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. et al. Mucosal immunity: its role in defense and allergy. **International archives of allergy and immunology**, v. 128, n. 2, p. 77-89, 2002.

**ANEXO 1.** Valores de referência para os parâmetros eritroleucométricos e bioquímicos<sup>1</sup>.

| <b>Parâmetro</b>                          | <b>Valor</b> |
|---|--------------|
| Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )    | 5,5 - 8,5    |
| Hematócrito (%)                           | 37 - 55      |
| Hemoglobina (g/dL)                        | 12 - 18      |
| Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )  | 6 - 18       |
| Eosinófilos ( $\times 10/\mu\text{L}$ )   | 120 - 180    |
| Bastonetes ( $\times 10/\mu\text{L}$ )    | 0 - 500      |
| Segmentados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 3,6 - 13,8   |
| Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )  | 0,72 - 5,4   |
| Monócitos ( $\times 10/\mu\text{L}$ )     | 180 - 1800   |
| Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )   | 180 - 400    |
| Proteínas Totais (g/dL)                   | 5,8 - 7,9    |
| Albumina (g/dL)                           | 2,6 - 4,0    |
| Creatinina (mg/dL)                        | 0,5 - 1,5    |
| Ureia (mg/dL)                             | 15 - 65      |
| ALT (U/L)                                 | 10 - 88      |
| FA (U/L)                                  | 20 - 150     |

<sup>1</sup>Feldman; Zinkl; Jain (2000); Kaneko et al. (1997).