

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

**MICROBIOTA FECAL, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO,
ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA MUCOSA
GASTRINTESTINAL E IMUNIDADE DE CÃES BEAGLE DE
DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS**

Márcia de Oliveira Sampaio Gomes

Médica veterinária

2013

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

**MICROBIOTA FECAL, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO,
ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA MUCOSA
GASTRINTESTINAL E IMUNIDADE DE CÃES BEAGLE DE
DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS**

Márcia de Oliveira Sampaio Gomes

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

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

2013

G633m Gomes, Márcia de Oliveira Sampaio
Microbiota fecal, produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa gastrintestinal e imunidade de cães beagle de diferentes grupos etários / Vanessa Morales Meirelles. -- Jaboticabal, 2013
x, 103 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
Banca examinadora: Aureo Evangelista Santana, Ricardo Souza Vasconcellos, Lilian Rose Marques de Sá, Márcio Antonio Brunetto.
Bibliografia

1. Aminas. 2. Butirato. 3. Envelhecimento. 4. Filhote. 5. qPCR. 6. Senescência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.66:636.7

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

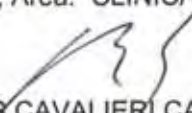
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MICROBIOTA FECAL, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO, ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA MUCOSA GASTRINTESTINAL E IMUNIDADE DE CÃES BEAGLE DE DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS

AUTORA: MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES

ORIENTADOR: Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

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


Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

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


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

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


Prof. Dr. RICARDO SOUZA VASCONCELLOS

Departamento de Zootecnia / Universidade Estadual de Maringá / Maringá/PR


Prof. Dra. LILIAN ROSE MARQUES DE SÁ

Departamento de Patologia / Universidade de São Paulo / São Paulo/SP


Prof. Dr. MARCIO ANTONIO BRUNETTO

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Data da realização: 01 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Márcia de Oliveira Sampaio Gomes – nascida em 28 de novembro de 1979, na cidade de Recife - PE, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco em março de 1998, concluindo-o em agosto de 2003. Cursou o Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária, área Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, nos anos de 2004 e 2005. Em Março de 2007 iniciou o curso de mestrado pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Clínica Médica) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), concluindo-o em fevereiro de 2009. Em março de 2009, iniciou o curso de doutorado pelo mesmo programa e instituição concluindo-o em fevereiro de 2013. Realizou doutorado sanduíche financiado pelo CNPq (Programa Conjunto de Bolsas de Doutorado na República Federal da Alemanha DAAD - CAPES - CNPq), no período de Abril de 2011 a Abril de 2012, junto ao Instituto de Nutrição Animal (Institu für Tierernährung) da Universidade Livre de Berlim (Freie Universität Berlin), na Alemanha. Suas linhas de pesquisa durante a pós-graduação foram o efeito do envelhecimento e o papel da nutrição sobre a microbiota intestinal e produtos fecais de fermentação e uso de alimentos funcionais e nutracêuticos em *pet food*.

Perseverança

s.f. Qualidade ou ato do que persevera; persistência.

Que insiste até alcançar.

Sinônimos: firmeza, constância, obstinação e tenacidade.

(Lat. Perseverantia, -ae)

A minha família por seu amor, apoio e
paciência com a minha ausência.

Ofereço

Aos meus pais, **Itamar** e **Marly**, pelo infinito
carinho e amor, por todos os ensinamentos e,
acima de tudo, por acreditarem em mim e
apoiarem minhas decisões.

Por essa razão, gostaria de dedicar e
reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e
sempre amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Nenhum dever é mais importante do que a gratidão”.

Cícero, filósofo, escritor e advogado romano.

(106 a.C. – 43 a.C.)

Por mais que uma tese seja um trabalho individual, são muitas as contribuições de diversas naturezas que auxiliam e possibilitam sua realização e que não podem deixar de ser destacados. Por essa razão, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar à Deus por todas as dádivas concedidas, por ter me carregado quando faltaram forças e porque sem Ele não teria sido possível concluir este trabalho e, tão pouco, estar aqui agradecendo a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos que me são mais importante nesta vida, minha Família. Sem eles nada do que faço teria sentido e é por eles que sempre busco fazer meu melhor. Obrigada especial às minhas tias-avós, Duda e Dirito, tias Gleide e Glória, meus primos e priminhos, Tércia, Lali, Edinho, Dedeco, Bebel, Fran, Amanda e o pequeno Matheus.

Agradeço especialmente ao meu irmão, Marcelo, por se fazer presente na minha vida, por sua amizade e companheirismo e também pelo melhor presente que poderia me dar nesta vida, meu sobrinho e afilhado Benjamin.

À minha cunhada Andressa, por sua essencial contribuição ao melhor presente que da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Aulus, pela disponibilidade e generosidade ao longo destes 10 anos de convivência e muito trabalho. Muito obrigada pelas críticas, correções e, principalmente, por sua amizade. Devo a você a fase mais importante da minha formação e, com certeza, será sempre referência na minha vida profissional e pessoal.

To my supervisor in Berlin, Professor Jürgen Zentek, I wish to express my gratitude for supportive and instructive guidance, for clarifying the big pictures for me and also for kind-hearted care for my well being during my stay there. Thank you the a life changing opportunity you granted me.

To my other supervisor in Berlin Dr. Wilfried Vahjen I wish to express my warm thanks for his valuable advice and appreciation especially for his expertise in qPCR analysis.

To Marita Eittinger, Petra Huck, Ingo Starke and Anett Kriesten for the patience, help and share of knowledge in the conduction of some analysis.

To the amazing “Institute Team” from the Freie Universität Berlin, I am indebted to all skilful and kind people I had the honor to meet there. You will always have a special place in my heart.

Aos membros da banca de qualificação: Profa. Mirela Tinucci, Prof. Pablo Schocken-Iturrino, Prof. Hélio Montassier e Prof. Gener Pereira, pelas suas sugestões e críticas essenciais à melhoria deste trabalho.

À Profa. Maria Beatriz Glória, da UFMG, que novamente acreditou em nosso projeto e nos possibilitou a realização de análise essencial para o entendimento dos nossos resultados e cumprimento de nossos objetivos.

À Profa. Lilian Sá, da USP, por sua orientação e disponibilidade, sempre tão atenciosa e prestativa, nos ajudando de forma brilhante neste projeto.

Ao Prof. Aureo Santana, querido amigo, sempre disposto a ensinar e compartilhar ensinamentos. Obrigada pelo exemplo de competência e generosidade.

Ao Prof. Ricardo Vasconcellos, da UEM, por sua amizade e por todos os anos de convivência onde aprendi a respeitá-lo como o excelente profissional e admirável pessoa que é.

Ao Prof. Márcio Brunetto, meu eterno R2, sempre trabalhamos juntos e muitos frutos nasceram deste trabalho. Obrigada pela confiança, apoio, orientação, ajuda, paciência e por todas as oportunidades que me proporcionou. Agradeço a Deus por sua amizade.

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

A querida anestesista veterinária Ana Paula Gering, por sua alegria e disposição em sempre ajudar. Obrigada por cuidar tão bem dos animais deste estudo durante os procedimentos que tiveram que ser submetidos.

À Aninha Judice, por toda fundamental ajuda na execução deste projeto e, principalmente, por cuidar e dar todo o carinho a Polly e ao Kuki no ano em que estive fora. Serei eternamente grata por isso.

Aos estagiários do Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Cães e Gatos, em especial à querida Mariana Monti, pela ajuda na condução deste estudo.

Ao Leandro Zaine, pelo auxílio na condução das análises imunes e pelos anos de convivência.

À Cris Prada, por toda atenção e carinho que sempre teve comigo e por me auxiliar no meu crescimento como pessoa e profissional.

À Mogiana Alimentos S/A (Guabi) pela manutenção financeira do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada".

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo e de bolsa sanduíche para realização de parte das atividades de doutoramento junto a Freie Universität Berlin.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela atenção e paciência.

À Pós-graduação em Medicina Veterinária, na pessoa do coordenador Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pela valiosa oportunidade para realização do curso de doutorado.

À Elaine e Diego, funcionários do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos, por todos estes anos de convivência e amizade. Sem a ajuda de vocês nada do que fazemos no laboratório seria possível.

À Claudinha Nogueira, técnica do Laboratório, amiga querida e sempre com uma mão estendida àqueles que necessitam de ajuda. Admiro muito sua força e forma de encarar a vida.

À Renata Lemos e Paulo Cesar, técnicos do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pela ajuda e orientação na condução de análises.

Ao Helinho, funcionário da Fábrica de Ração da Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão, sempre tão amigo e disposto a ajudar.

As minhas queridas amigas do Laboratório de Microbiologia Aplicada à Zootecnia do Departamento de Patologia Veterinária, Mari Beraldo, Uréia, Marita, Livia e Silvina, por me fazerem sentir parte do grupo, pela amizade, pelos ensinamentos, conselhos, pela agradável convivência e grande aprendizado que me proporcionaram.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Cães e Gatos de hoje e de outras épocas (e agregados), pela amizade, companhia diária, momentos de descontração e por tudo que dividimos e passamos saibam que sempre morarão em meu coração. Obrigada Marcitcho, Jujubis, Sandra Blé, Mayumi, Aninha, Bruninha Agy, Fabi (e Juju), RicVascon, Sivi, Zaine, Fer Kroll, Fer Mulambento, Flávio Carioca, Chayanne, Kate (e Miryelle), Micrisco, Leticia Tortola, Guilherme Palumbo, Luciana Domingues, Mamashima, Raquel Labres, Rodrigo Bazolli e minha querida amiga, Karina Kukavet.

À Bruna Ponciano, que em pouco tempo conquistou minha amizade e admiração e, cujo futuro sei que será brilhante.

Aos funcionários, residentes e pósgraduandos do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, em especial aos residentes em Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos por nos auxiliarem no cuidados de nossos animais.

À minha querida amiga Mayara, por sua amizade e todos os momentos especiais que dividimos e que dividiremos ainda.

A Paulinha Xuxu, minha pessoa, amiga de todo e qualquer momento à quem admiro por sua força e capacidade de superação. Obrigada por estar sempre ao meu lado dando esse exemplo de pessoa honesta e trabalhadora. E obrigada também pelas pessoas queridas que tenho em meu convívio por sua causa: Coka, Laerte, Victor e Fausto.

À Thailinha Queridov, obrigada por estar presente na minha vida! Agradeço a Deus todos os dias pela benção de te conhecer. Você sabe o quanto é e sempre será especial e importante para mim.

À Luciene, Victor e família, pela amizade e paciência com meus sumiços. Sua amizade é inestimável para mim.

Aos amigos que fiz na Alemanha, em especial a Claudita e meus queridos "Curitibas" Tati, Fernanda, Guilherme e Daniel e amigos indianos Kashyap, Dixit e Nihar por terem tornado minha estadia tão mais feliz.

Gostaria de agradecer aos meus amigos de infância João Paulo e Dudu e aos do Colégio Salesiano, Edson, Chapa, Smurf e suas queridas esposas, Manu, Danielle e Paty, que provavelmente nem lerão isto, mas que para sempre estarão guardados em meu coração.

Aos animais que, como disse em outro oportunidade, são um motivo, inspiração e filosofia de vida! Obrigada pelos momentos de companheirismo e por me incentivarem quanto à escolha da profissão. Em especial a Polly, Kuki, Dobby, Schumi e Vileneuve, e todos os cães e gatos do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.

Agradeço a todos, os aqui citados e os que por descuido não citei, pois me ensinaram muito mais do que podem imaginar, e porque fizeram desse período uma lição única e serão sempre um capítulo especial na minha vida.

A minha alegria e conquista devo a todos vocês. Muito obrigada!

“Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!

Benditos os que sofrem por amigos, os que falam com o olhar. Porque amigo não se cala, não questiona, nem se rende. Amigo a gente entende!

Benditos os que guardam amigos, os que entregam o ombro pra chorar. Porque amigo sofre e chora. Amigo não tem hora pra consolar!

Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade. Porque amigo é a direção. Amigo é a base quando falta o chão!

Benditos sejam todos os amigos de raízes, verdadeiros.

Porque amigos são herdeiros da real sagacidade.

Ter amigos é a melhor cumplicidade!”

Por Isabel Machado.

SUMÁRIO

	Página
Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Lista de abreviaturas	vii
Lista de tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de apêndices	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. O envelhecimento	14
2.2. Alterações na função e metabolismo do trato gastrintestinal de cães e gatos idosos	14
2.3. Microbiota intestinal	18
2.4. Microbiota intestinal e suas interações com o sistema imune	24
2.5. Imunosenescência e “inflammageing” em cães e gatos	26
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Animais e manejo	33
4.2. Delineamento experimental	34
4.3. Dieta	35
4.4. Métodos	37
4.4.1. Avaliação microbiológica das fezes	37
4.4.2. Avaliação de produtos de fermentação nas fezes.....	41
4.4.3. Parâmetros imunes	45
4.4.4. Análise histológica do estômago e dos intestinos delgado e grosso	49
4.5. Análise estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Avaliação microbiológica das fezes	52
5.2. Concentração de produtos de fermentação nas fezes	52
5.3. Avaliações da imunidade dos animais	57
5.4. Análise histológica de estômago e intestinos delgado e grosso	63
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÕES	82
8. REFERÊNCIAS	83
9. APÊNDICES	96



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 000994/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Influência do envelhecimento sobre a microbiota fecal, produtos de fermentação e imunidade intestinal de cães**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 10 de Fevereiro de 2011.

Jaboticabal, 11 de Fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

Microbiota fecal, produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa intestinal e imunidade de cães beagle de diferentes idades.

RESUMO – As possíveis diferenças que acometem cães de diferentes idades ainda são pouco estudadas e descritas para esta espécie. O presente estudo avaliou e comparou a composição da microbiota nas fezes e seus produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa intestinal e a imunidade de cães filhotes, adultos e velhos. Para tal, 30 cães beagle foram divididos igualmente em três grupos: o grupo filhotes (GF), composto por filhotes do desmame aos 10 meses de idade; o grupo adultos (GA), composto por cães adultos entre cinco e seis anos e o grupo velhos (GV), composto por cães velhos entre 10 e 13 anos. Os animais receberam a mesma dieta e nenhum outro tipo de intervenção por 30 dias e após este período amostras de fezes frescas foram colhidas para a mensuração de: pH, determinação da concentração de lactato, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, amônia, indol, fenol, aminas, imunoglobulina A e composição da microbiota. Também foi adquirida amostra de sangue periférico para quantificação das populações linfocitárias CD4+CD5+, CD5+, CD8+CD5+, e CD21+ por citometria de fluxo, sendo esta analisada em cinco idades (45, 66, 87, 105 e 300 dias) do GF e a média destas avaliações comparada com GA e GV. Após esta análise, foi realizado teste de hipersensibilidade cutânea tardia e ao final destes, os animais foram anestesiados e submetidos a procedimento endoscópico para coleta de fragmentos do estômago e intestinos delgado e grosso para análise histológica dos mesmos. Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$ e como tendência valores de $P < 0,1$. Observou-se que o GF apresentou maior número de *Bifidobacterium* spp. e Cluster IV. GV apresentou indicativo de menor atividade sacarolítica bacteriana observada pela menor concentração de acetato, propionato, butirato e ácidos graxos voláteis totais o que resultou em pH mais alto nas fezes deste grupo. GF apresentou menor concentração nas fezes de putrescina, cadaverina, triptamina e IgA. GV apresentou maiores concentrações de 2-, 2-3- e 7-metilindóis. Não foi observada diferença significativa para as concentrações nas fezes de lactato e amônia, assim como na matéria seca. Dentre os parâmetros hematológicos, GF apresentou maior número de linfócitos, leucócitos e eosinófilos e tendência a maior número de monócitos. Na

comparação longitudinal de GF, observou-se aumento linear de CD5+, CD4+CD5+ e CD8+CD5+, diminuição linear de CD21+ e quadrática na relação CD4+:CD8+ e diminuição quadrática na contagem relativa de CD5+. Na comparação entre os grupos, GF apresentou maior contagem absoluta e relativa de CD5+ e CD21+, GA menor número absoluto de CD4+CD5+ e GV menor número relativo de linfócitos CD4+CD5+. GV apresentou tendência a pele mais delgada e menor reação de hipersensibilidade cutânea tardia após 48 e 72 horas da estimulação vacinal. De maneira geral, o GV apresentou aspectos histológicos de discreta gastrite, enterite e colite, caracterizados por linfócitos intraepiteliais e linfócitos e plasmócitos em estômago, duodeno, íleo e cólon. Na presente pesquisa foi possível verificar importantes diferenças na composição da microbiota fecal, produtos de fermentação nas fezes, parâmetros imunológicos e características histológicas da mucosa intestinal de cães de diferentes grupos etários.

Palavras-chave: aminas, butirato, envelhecimento, filhote, qPCR, senescência

Fecal microbiota, fermentation products, histological aspects of intestinal mucosa and immunity of beagle dogs of different ages.

SUMMARY – Possible differences that may occur in dogs of different ages have been little studied and described in this specie. The aim of this study was to evaluate and compare the composition of microbiota and some fermentation products in the feces, histological aspects of intestinal mucosa and immunity of puppies, adults and senior dogs. To perform this, 30 beagle dogs were divided into three groups: Puppy group (GF), composed of puppies from weaning to 10 months old, Adult group (GA), composed of adult dogs between five and six years and Old group (GV), composed of old dogs between 10 and 13 years. Animals received the same diet and no other intervention for 30 days, and after this period, fresh fecal samples were collected for measurement of pH, determining the concentration of lactate, short and branched chain fatty acids, ammonia, indol, phenols, amines, immunoglobulin A and composition of the microbiota. It was also acquired a peripheral blood sample for quantification of lymphocyte populations CD4+CD5+, CD5+, CD8+CD5+, and CD21+ by flow cytometry, which was analyzed in five ages of GF (45, 66, 87, 105 and 300 days) and the average of these evaluations compared with GA and GV. After this analysis was performed the delayed type hypersensitivity test and by the end of this, animals were anesthetized and submitted to an endoscopic procedure for collecting fragments of stomach and small and large intestines for histological analysis. P values ≤ 0.05 was considered significant and P values < 0.1 as a trend. GF showed greater number of *Bifidobacterium* spp. and Cluster IV. GV presented an indication of reduced bacterial saccharolytic activity observed by the lower concentration of acetate, propionate, butyrate, and total volatile fatty acids which resulted in higher pH in the feces of this group. GF showed lower concentrations of putrescine, cadaverine, tryptamine and IgA in the feces. GV had higher fecal concentration of 2-, 2-3- and 7-metilindóis. No significant difference was observed for the concentrations of lactate and ammonia, as well as on dry matter. For the hematological parameters, GF had the greatest number of lymphocytes, leukocytes and eosinophils, and trend for greater numbers of monocytes. In longitudinal comparison of GF, there was a linear increase of CD5+, CD4+CD5+, and CD8+CD5+, a linear decrease of CD21+ and

quadratic of CD4+:CD8+ ratio, and a quadratic decrease in relative count of CD5+. When comparing three age groups, GF presented higher absolute and relative count of CD5+ and CD21+, GA smaller absolute number of CD4+CD5+ and GV the lowest relative number of CD4+CD5+. GV presented a trend to a thinner skin and a significant reduced in delayed hypersensitivity cutaneous reaction after 48 and 72 hours of vaccine stimulation. Generally, GV presented histological aspects of discrete gastritis, enteritis and colitis, characterized by intraepithelial lymphocytes and lymphocytes and plasma cells in stomach, duodenum, ileum and colon. In the present study was possible to observe significant differences in fecal microbiota composition, fermentation products in the feces, immunological parameters and histological characteristics of intestinal mucosa of dogs of different age groups.

Keywords: ageing, amines, butyrate, puppy, qPCR, senescence

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCR	Ácidos graxos de cadeia ramificada
AGV	Ácidos graxos voláteis
ANOVA	Análise de variância (<i>analysis of variance</i>)
CD	Cluster designation ou designação de agrupamento
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CoA	Coenzima A
CV	Coeficiente de variação
DTH	Teste de hipersensibilidade cutânea tardia
EPM	Erro padrão da média
FEDIAF	Federação Europeia das Indústrias de Pet Food (<i>The European Pet Food Industry Federation</i>)
FHG	Fitoemaglutinina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Grama(s)
GA	Grupo de animais adultos
GF	Grupo de animais filhotes
GLM	General linear models
GLP	Glucagon like-peptide
GV	Grupo de animais velhos
HRP	Horseradish peroxidase
IgA	Imunoglobulina A
kcal	Quilocalorias
L	Litro
LIE	Infiltrado de linfócitos intraepiteliais
LP	Infiltrado de linfócitos e plasmócitos
MS	Matéria seca
NRC	Nacional Research Council
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação de polimerização em cadeia (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
qPCR	PCR quantitativo
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidades formadoras de colônia
UI	Unidade internacional

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Grupos bacterianos predominantes no trato gastrintestinal de cães e gatos	20
Tabela 2. Algumas funções da microbiota intestinal no trato digestório	21
Tabela 3. Efeitos do envelhecimento observados sobre o sistema imune de cães e respectiva referência bibliográfica. Adaptado de DAY (2010)	29
Tabela 4. Fórmula e composição química da dieta experimental	36
Tabela 5. Sequências de oligonucleotídeos utilizados no PCR quantitativo e respectivas temperaturas de anelamento	38
Tabela 6. Espécies alvo dos pares de primers utilizados no PCR quantitativo	39
Tabela 7. Composição da microbiota das fezes de cães de diferentes idades, determinada por qPCR	53
Tabela 8. Concentração média e proporção de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada nas fezes de cães de diferentes idades	54
Tabela 9. Matéria seca, pH e concentração de amônia e lactato determinados nas fezes de cães de diferentes idades	55
Tabela 10. Concentração média de algumas aminas determinadas nas fezes cães de diferentes idades	56
Tabela 11. Concentração média de fenol e indóis nas fezes de cães de diferentes idades	58
Tabela 12. Parâmetros eritroleucométricos e plaquetários de cães de diferentes idades. Valores absolutos médios	59
Tabela 13. Populações linfocitárias médias no sangue de cães de diferentes idades. Dados apresentados em números absolutos e em contagem relativa	61
Tabela 14. Respostas médias de hipersensibilidade cutânea tardia de cães de diferentes idades	62
Tabela 15. Número de fragmentos coletados e adequação dos mesmos ao exame histológico da mucosa do trato gastrintestinal de cães de diferentes idades	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ilustração da sequência de procedimentos para realização do Teste de Hipersensibilidade Cutânea Tardia (DTH) em cães beagle de diferentes idades	49
Figura 2. Concentrações de imunoglobulina A nas fezes de cães de diferentes idades	57
Figura 3. Fotomicrografias da mucosa do trato gastrintestinal do grupo de cães filhotes	66
Figura 4. Fotomicrografias da mucosa do trato gastrintestinal do grupo de cães velhos	67

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice A. Perfil <i>Pet</i> 2011	97
Apêndice B. Referências apresentadas na Tabela 3 e citadas por Day (2010)	98
Apêndice C. Número de fragmentos coletados por região do trato gastrointestinal e adequação dos mesmos ao exame histológico da mucosa de cães de diferentes idades	100
Apêndice D. Análise histológica da mucosa do estômago de cães de diferentes idades	101
Apêndice E. Análise histológica da mucosa do duodeno de cães de diferentes idades	101
Apêndice F. Análise histológica da mucosa do íleo de cães de diferentes idades	102
Apêndice G. Análise histológica da mucosa do cólon de cães de diferentes idades	102
Apêndice H. Análise histológica da mucosa da válvula íleo-cecal de cães de diferentes idades	103

1. INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de *pet food* mudou consideravelmente nas últimas décadas, especialmente a partir de 1994 com o advento do Plano Real e da consequente estabilização de preços. Verificou-se aumento significativo na população de cães e gatos domésticos, mudança na maneira como são alimentados e no comportamento dos seus proprietários com relação à compra dos seus alimentos. Aumentaram também os cuidados com higiene, tratamento e prevenção de doenças e a preocupação com longevidade e qualidade de vida dos animais. Esse novo padrão de comportamento levou os proprietários de animais domésticos a buscarem informações, produtos e serviços que aumentassem a expectativa de vida, ampliassem o bem-estar e recompensassem o companheirismo dos seus animais de estimação (BERNASCONI; ALCÂNTARA, 2007).

Cada vez mais cães e gatos ocupam papéis importantes na sociedade. Calcula-se que existam cerca de 800 milhões de cães e gatos em todo o mundo sendo criados como “membros da família”. É um fenômeno mundial que está ligado ao aumento da expectativa de vida da sociedade moderna, maior número de idosos, redução do número de filhos, falta de segurança e, especialmente, por maior carência afetiva (RUSSO, 2005). Da mesma forma, a maior conscientização da população com relação aos benefícios da alimentação industrializada para cães e gatos, incluindo melhor custo/benefício e maior segurança de saúde do animal de estimação, tem levado ao aumento do uso de *pet food* no Brasil (HÁFEZ, 2002). Dentro deste contexto, o amadurecimento e “humanização” verificados no mercado *pet* têm contribuído para maior utilização de produtos de melhor qualidade, estimulando o desenvolvimento e produção de alimentos com maior valor agregado (AMBROZINI, 2007).

Após grande expansão inicial em volume produzido, com crescimentos de mais de 8% em produção por ano, o mercado de *pet food* encontra-se hoje mais amadurecido e com maior competitividade entre as empresas (ANFALPET, 2008). A implantação recente de Boas Práticas de Fabricação e a especialização e competitividade do mercado têm também gerado resultados positivos em aumento

de qualidade das rações. Neste cenário, a demanda pelo desenvolvimento de novos produtos que mantenham a competitividade do mercado tem crescido.

Os avanços na nutrição de animais de companhia frequentemente seguem aqueles que são verificados na nutrição humana. Os conceitos de nutrição estão se expandindo para além da fronteira da sobrevivência e satisfação da fome para enfatizar a utilização de alimentos que promovam bem estar e melhora na saúde, além de reduzir risco de doenças (FAHEY, 2003). Mais recentemente, o foco tem sido direcionado para obtenção de dieta balanceada que maximize a expectativa e a qualidade de vida pela utilização de formulações e ingredientes que desenvolvam a capacidade de resistir a doenças e melhorarem a saúde (TZORTZIS; GIBSON; RASTALL, 2003).

De acordo com a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação (ANFALPET, 2011), em 2010, a população de *pets* no Brasil tornou-se a quarta maior do mundo, com 98 milhões de animais. Destes 34 milhões são cães e 18 milhões gatos domésticos. Estima-se que cerca de 30% desta população de cães e gatos esteja dentro da faixa etária de animais considerados idosos. Nos últimos dez anos a expectativa de vida de cães e gatos aumentou significativamente, devido a fatores como melhora da nutrição, controle de doenças infecciosas, conscientização do proprietário e aos avanços na medicina veterinária (FAHEY JUNIOR; BARRY; SWANSON, 2008).

Estudos sobre alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento em cães e gatos tornaram-se mais frequentes nas últimas duas décadas. Envelhecer traz consigo alterações fisiológicas. Algumas mudanças são óbvias, como embranquecer dos pêlos, declínio geral nas condições corporais e de pelagem, e diminuição dos sentidos de visão e audição. Outras mudanças são menos aparentes, estas incluem alterações na fisiologia do trato digestório, sistema imune, rins e outros órgãos (BURKHOLDER, 1999; LAFLAMME, 2005). Dentre estas alterações de envelhecimento, as relacionadas ao trato digestório são particularmente pouco estudadas em cães e gatos. Atribui-se a esta faixa etária maior incidência de *disbioses*, diarreias, constipação e neoplasias (LAFLAMME, 2005). No entanto, um consenso dos mecanismos e causas destas alterações ainda não existe. Mesmo o efeito do envelhecimento na microbiota intestinal é ainda controverso e pouco

conhecido (CARCIOFI; GOMES, 2010). Entender tais alterações, bem como seus processos desencadeadores e consequências é fundamental para se propor mudanças alimentares que colaborem para que o aumento observado na expectativa de vida dos animais de estimação seja sempre acompanhado de melhora na qualidade de vida dos mesmos.

Os dados disponíveis sobre o envelhecimento de cães relacionam-se em sua maioria ao estudo das disfunções cognitivas e neurológicas nestes animais, sendo também, muitas vezes, o cão usado como modelo para estudo de tais alterações no homem. É possível também encontrar pesquisas relacionando as alterações imunes que decorrem do envelhecimento, porém em menor número. Já do ponto de vista da saúde intestinal, considerando a microbiota autóctone, seus produtos de fermentação e efeitos sobre a imunidade do hospedeiro, as pesquisas são raras e os poucos dados produzidos são conflitantes.

É possível que pela manipulação da composição de ingredientes e nutricional do alimento se module a composição da microbiota intestinal, sua atividade metabólica e a formação de produtos de fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta, e que estas mudanças possam aumentar a saúde gastrointestinal destes animais no seu envelhecimento, aliviando algumas das consequências da velhice, e promovendo saúde e bem-estar. Porém, para cães e gatos geriátricos ainda não foram estabelecidas necessidades nutricionais específicas que possam claramente os diferenciar de animais adultos em manutenção (NRC, 2006). Dessa forma sua nutrição consiste mais em uma abordagem de bom senso que deve incluir vários aspectos da dieta como palatabilidade, forma física (influência direta na apreensão e mastigação), composição nutricional, densidade energética, digestibilidade e o uso de nutrientes e ingredientes para promover saúde e bem estar (CARCIOFI; GOMES, 2010). A intervenção nutricional nestes animais tem por finalidade favorecer a longevidade, aumentar sua qualidade de vida e também retardar o aparecimento das disfunções e doenças relacionadas ao envelhecimento. Para cumprir com estas metas é importante entender as alterações relacionadas ao avançar da idade: conhecer tais mecanismos é fundamental para se definir as intervenções que realmente possam prolongar a vida do animal e mantê-lo clinicamente saudável por maior período de sua vida (DAY, 2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O envelhecimento

Todas as pessoas, animais e plantas passam por transformações com o avanço de idade. Essas modificações podem ser consideradas como uma involução morfológica e funcional que afeta a maioria dos órgãos e leva ao gradual declínio no desempenho dos indivíduos, culminando com a morte. O termo envelhecimento é utilizado para indicar tais transformações. Outra definição de envelhecimento seria: as alterações progressivas nos sistemas fisiológicos e processos metabólicos que ocorrem em diversos órgãos após a maturidade, levando a diminuição da funcionalidade dos mesmos. O envelhecimento biológico é inexorável, dinâmico e irreversível. Entretanto, envelhecer não significa adoecer. Senilidade não é diagnóstico. Em condições basais, o idoso funciona tão bem quanto o jovem (MORAES, 2008).

Infelizmente, estas alterações não são bem definidas para animais de estimação. Embora os termos "idoso", "velho", "sênior/senil" e "geriátrico" sejam frequentemente referidos como sinônimos, eles possuem definições distintas. Os termos "sênior e idoso" referem-se à funcionalidade de um animal. Um animal é considerado sênior ou idoso quando este diminui sua atividade, ganha ou perde peso e desenvolve outras alterações físicas e comportamentais relacionadas à idade. Diferentemente, o termo "geriátrico e velho" refere-se à idade cronológica do animal. Geralmente, cães de raças grandes ou gigantes são considerados geriátricos aos 5 anos de idade, enquanto os de porte médio a pequeno e os gatos não são considerados geriátricos até os 7 ou mais anos de idade (NRC, 2006).

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

Cães e gatos, assim como pessoas, não envelhecem de forma consistente e a idade cronológica nem sempre equivale à idade fisiológica. Embora muitos permaneçam ativos na sua maturidade, a maioria dos cães torna-se menos ativa e

pode mostrar sinais do envelhecimento com 5 ou 6 anos (BURKHOLDER, 1999; LAFLAMME, 2005). A fisiologia e a função do intestino são alteradas durante o processo de envelhecimento, o que é frequentemente acompanhado por maior incidência de infecções do trato gastrointestinal (TGI). Em seres humanos, com o avançar da idade, várias disfunções deste sistema podem se manifestar, incluindo redução na velocidade de trânsito intestinal, redução de reservas orgânicas, alterações na atividade enzimática, circulação prejudicada e secreção biliar e pancreática reduzidas (GREENBERG; HOLT, 1986; HARPER, 1998a). Não existe consenso se essas alterações acometem cães e gatos na mesma situação (TESHIMA et al., 2010). Em gatos idosos alterações na função do TGI relacionam-se principalmente à diminuição na digestibilidade da proteína, gordura, amido e energia (PÉREZ-CAMARGO, 2004; TESHIMA et al., 2010). Por outro lado, a idade avançada em cães não reduz a digestibilidade aparente dos nutrientes (SHEFFY et al., 1985; GOMES et al., 2011). Outras alterações conhecidas para estas espécies incluem incidência aumentada de doença periodontal, dificuldade em preensão e mastigação, frequência aumentada de diarreia, vômito e regurgitação (KIRK; DEBRAEKELEER; ARMSTRONG, 2000).

Digestibilidade reduzida em gatos idosos parece não se relacionar ao tempo de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal, uma vez que nenhuma diferença foi observada nestes tempos de passagem de alimentos entre animais velhos e jovens (PEACHEY; DAWSON; HARPER, 2000). Mudanças morfológicas no intestino não parecem ser a causa de digestibilidade de nutrientes reduzida em seres humanos (CORAZZA et al., 1986). Entretanto, não foram encontrados estudos que avaliaram os possíveis efeitos do envelhecimento na morfologia intestinal de gatos, sendo assim, esta hipótese não pode ser rejeitada como causa da redução na digestibilidade nesta espécie (HARPER, 1998b). As consequências da digestibilidade reduzida em gatos idosos não são completamente conhecidas, mas esta diminuição pode contribuir para a redução das reservas de tecido adiposo e muscular e do peso corporal (TAYLOR; ADAMS; NEVILLE, 1995; PEACHEY; HARPER, 2002). Este efeito é reforçado por não haver mudança no consumo alimentar voluntário em animais velhos. Dessa forma, a manutenção dos hábitos de

ingestão alimentar associada à utilização reduzida da energia do alimento, resultaria em menor consumo de nutrientes biodisponíveis (TESHIMA et al., 2010).

Deve-se considerar que as duas funções principais do intestino são a digestão e absorção de nutrientes e a proteção do corpo. Além de sua reconhecida função em prover nutrientes ao organismo, o TGI é órgão imunológico muito ativo, com estrutura complexa e diversos tipos celulares especializados que cumprem papel importante na proteção contra o meio ambiente externo (FERGUSON, 1994; CUNNINGHAM-RUNDLES; LIN, 1998). Como órgão linfóide ativo, o TGI tem elevada demanda nutricional, utilizando quantidade significativa da energia, proteína e aminoácidos necessários ao animal (LI et al., 1995; SCHOOR; REEDS; STOOL, 2002). A mucosa intestinal possui as taxas mais altas de proliferação e renovação celular de todo o corpo, este processo pode utilizar de 10 a 20% da necessidade energética diária, e até 50% da necessidade de proteína (ROEDIGER, 1990). Assim, fornecer adequadamente nutrientes para o TGI é importante para dar suporte ao bom desenvolvimento e funcionamento deste órgão durante toda a vida do animal.

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

Carboidratos fermentáveis podem ser considerados parte importante da "nutrição do intestino" na velhice. Estes incluem alguns tipos de fibras, amido resistente, polissacarídeos não-amiláceos como os mananoligossacarídeos,

frutoligosacarídeos, estaquiose e rafinose, bem como açúcares não absorvidos. Estes alcançam o cólon, e se tornam disponíveis para fermentação bacteriana, fornecendo matéria orgânica adequada para o intestino grosso (DROCHNER; MEYER, 1991). A fermentação bacteriana destes compostos resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido láctico com consequente redução do pH, o que pode modificar a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal (CAMPBELL et al., 1997). Os AGCC, em especial o butirato, são fontes de energia importantes para os colonócitos (NRC, 2006), estes auxiliam na absorção de íons e atuam no fluxo sanguíneo intestinal e peristaltismo. A presença destes compostos também reduz a quantidade de resíduos de compostos nitrogenados que entram na circulação sanguínea. Em estudo com cães, fibras fermentáveis promoveram melhor desenvolvimento da mucosa do cólon, maior relação entre volume e superfície do cólon e melhora na estrutura histológica da mucosa (HALLMAN et al., 1995). Estudos apontam que a atividade fermentativa intestinal parece estar diminuída em cães idosos, Gomes et al. (2011) verificaram maior pH e concentrações reduzidas de butirato e das aminas biogênicas agmatina, histamina e espermina nas fezes dos cães idosos. Estas alterações podem resultar em menor formação de compostos importantes ao suporte nutricional da mucosa, como os AGCC, que poderiam influenciar sua estrutura ou função. Esta hipótese merece estudo, mas ainda não foi confirmada ou explorada em cães.

A fermentação microbiana de aminoácidos não digeridos, por outro lado, resulta na produção de diversos compostos de putrefação. Estes incluem a amônia, que resulta da desaminação dos aminoácidos, fenóis, indoís (produtos de descarboxilação de aminas aromáticas), ácidos graxos de cadeia ramificada e várias aminas biogênicas, tais como putrescina, cadaverina, histamina, feniletilamina, entre outros. Os catabólitos da proteína não só resultam em mau odor das fezes, mas podem também ser tóxicos em altas concentrações (KUZMUK et al., 2005). As aminas biogênicas podem causar desnaturação ou efeitos tóxicos quando consumidas em grande quantidade. Um exemplo destes efeitos, observado em seres humanos, é enxaqueca e crise hipertensiva. A intoxicação alimentar causada por ingestão de histamina provoca efeitos cutâneos, gastrintestinais, hemodinâmicos e neurológicos. Outras aminas, como putrescina, espermina, espermidina podem

acelerar o desenvolvimento de tumores, devendo pacientes que estejam sob tratamento de câncer ter sua ingestão limitada (AVELAR; FRANCA; FERRAZ, 2005). Considerando que os produtos putrefativos de proteína e mesmo as bactérias do gênero *Clostridium* têm sua produção aumentada em cães alimentados com dietas ricas em proteína de origem animal (ZENTEK et al., 2003), o estudo de intervenções incluindo o consumo de proteínas vegetais e fibra fermentável para cães idosos pode fornecer informações importantes para se mitigar estes efeitos nocivos potenciais.

Alterações no perfil nutricional e padrão de fermentação intestinal relacionadas ao envelhecimento ainda não foram adequadamente estudadas em animais de companhia. É possível que pelas manipulações da composição nutricional do alimento, da composição da microbiota intestinal ou da atividade metabólica e formação de produtos de fermentação no intestino, como os AGCC, se possa melhorar a saúde gastrointestinal de animais idosos, aliviando algumas das consequências de velhice e promovendo saúde e bem-estar.

2.3. *Microbiota intestinal*

O intestino de cães e gatos apresenta padrão de colonização microbiano semelhante ao de outros mamíferos. Ao nascimento o tubo digestível é estéril, sendo rapidamente colonizado por bactérias presentes no ambiente, principalmente obtidas pelo contato materno. O processo de colonização ocorre com mudanças sucessivas na composição das populações, de acordo com a idade, estado de saúde, dieta e ambiente (BUDDINGTON; PAULSEN, 1998; FAHEY JUNIOR; BARRY; SWANSON, 2008). A microbiota intestinal autóctone cumpre papel importante no processo de digestão e metabolismo do hospedeiro e representa mecanismo de defesa natural contra os patógenos invasores, por meio da competição por nutrientes, controle das concentrações de oxigênio, pH e produção de substâncias antimicrobianas (NRC, 2006).

A população microbiana do trato gastrointestinal de cães e gatos adultos possui grande variabilidade de espécies, existindo entre elas alta complexidade de interações para manutenção de seu ecossistema. Na caracterização da composição

bacteriana de fezes de cães, Simpson et al. (2002) encontraram 4×10^{10} UFC (unidades formadoras de colônias) de anaeróbios totais, enquanto que a concentração de aeróbios foi 20 vezes menor (2×10^9 UFC). Os autores puderam observar ainda que tanto a idade como a raça dos animais influenciou a composição da microbiota. Dessa forma, foi verificado que cães mais velhos (10,9 anos) possuíam menor concentração de *Bacteroides* em comparação a cães jovens (2,5 anos). Na avaliação de raças (schnauzer miniatura, pastor alemão e setter inglês), estes verificaram diferenças entre *Fusobacterium* e *Clostridiales*, entretanto esta não esteve diretamente relacionada ao porte dos animais. Diferenças individuais, ligadas à genética, imunidade e fisiologia podem também levar a diferenças entre indivíduos na composição da microbiota intestinal.

Ao comparar a microbiota intestinal de cães e gatos, Handl et al. (2011) observaram que ambos possuem maior prevalência do filo *Firmicutes* (*Clostridium* spp. e *Lactobacillus* spp.; 95,3% nos cães e 92,1% nos gatos). Nos cães o segundo filo mais predominante foi o *Bacteroidetes* (2,3%), enquanto nos gatos destacaram-se as *Actinobacterias* (7,3%). Dentro do filo *Firmicutes* a classe *Clostridia* foi a predominante, se destacando os grupos de *Clostridium* (cluster XIVa e XI) e *Ruminococcus*. Na Tabela 1 podem ser observados os grupos bacterianos predominantes no intestino delgado e grosso de cães e gatos.

A fonte principal de nutrientes para a mucosa intestinal são os compostos absorvidos do lúmen, o fornecimento sanguíneo de nutrientes assume menor importância no cumprimento dessa função (TESHIMA, 2003). Estes compostos absorvidos do lúmen advêm dos ingredientes da dieta ou são produzidos e liberados pela microbiota intestinal. Diversos produtos produzidos a partir do metabolismo bacteriano da matéria orgânica, como as vitaminas, aminas e ácidos graxos de cadeia curta, possuem importante função para as células intestinais (MIDDELBOS et al., 2007). As principais funções da microbiota intestinal encontram-se apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1. Grupos bacterianos predominantes no trato gastrointestinal de cães e gatos.

	Resultados de cultivo		Resultados gene 16S rRNA	
	Grupo bacteriano	Contagem, log de ufc/g	Grupo bacteriano	% sequência total
Intestino delgado				
	Espirilos	3,0 a 6,8	Clostridiales	30 a 50
	<i>Bacteroides</i>	0 a 5,5	Enterobacterales	20 a 60
	<i>Lactobacillus</i> spp.	1,0 a 5,4	Lactobacillales	5 a 30
	<i>Streptococcus</i> spp.	3,0 a 5,2	Bacteroidales	0 a 5
	<i>Escherichia coli</i>	2,3 a 5,0	Campylobacterales	0 a 2
	<i>C. perfringens</i>	1,0 a 2,5	Actinomycetales	0 a 3
			Fusobacterales	0 a 10
			Pasteurellales	2 a 5
			Espiroquetas	0 a 12
Intestino grosso				
	<i>Bacteroides</i>	7,3 a 10,2	Aeromonadales	0,2 a 0,5
	<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,0 a 10,0	Bacteroidales	0,5 a 35
	<i>C. perfringens</i>	5,5 a 8,0	<i>Bifidobacterium</i> sp.	N/A
	<i>E. coli</i>	6,4 a 8,6	Coriobacterales	1 a 2,5
	<i>Lactobacillus</i> spp.	5,5 a 9,0	Clostridiales	10 a 78
	Prevotella	7,0 a 8,5	Enterobacterales	0,1 a 2
	Ruminococcus	7,0 a 8,0	Erysipelotrichales	0 a 8
	<i>Staphylococcus</i> spp.	5,2 a 5,3	Fusobacterales	0,3 a 25
	<i>Streptococcus</i> spp.	8,8 a 9,1	Lactobacillales	1 a 5

N/A = não aplicável

Fonte: Suchodolski (2011).

Tabela 2. Algumas funções da microbiota intestinal no trato digestório.

Atividade microbiana	Produto	Representantes
Descarboxilação e desaminação de aminoácidos	Amônia	<i>Clostridium</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Peptococcus</i> spp.
Desconjugação e desidroxilação de ácidos biliares	Ácidos biliares secundários (colato / desoxicolato)	<i>Clostridium hiranonis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.
Síntese de vitaminas	Vitamina K ₂ , B ₁₂ , biotina e ácido fólico	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
Fermentação de carboidratos	Ácidos láctico, propiônico, acético e butírico	<i>Clostridium</i> cluster XIVa, <i>Prevotella</i> spp., <i>Faecalibacterium</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.
Fermentação de aminoácidos	Hidrogênio, metano, aminas, fenóis, amônia, ácidos orgânicos e sulfeto de hidrogênio	Bactérias redutoras de sulfato, <i>Desulfovibrio</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp.
Degradação de oxalato	Metanoato e CO ₂	<i>Oxalobacter formigenes</i>
Degradação de inulina e amido	Ácido láctico	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Metabolismo de H ₂ , alcoóis e ácido acético	Metano e CO ₂	Metanobactérias

Fonte: Suchodolski (2011).

Muitos ácidos orgânicos são produzidos pela microbiota, por exemplo, ácidos acético, propiônico e butírico, usualmente descritos como ácidos graxos de cadeia curta. O ácido acético e propiônico são prontamente absorvidos e entram na corrente sanguínea, sendo fonte de energia extra para o hospedeiro. O ácido butírico é a principal fonte de energia para os colonócitos, sendo importante regulador do crescimento e diferenciação celular (NRC, 2006). Os ácidos láctico, succínico e pirúvico e o etanol são usualmente metabolizados a AGCC. Ácidos orgânicos de maneira geral têm atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias Gram negativas como *E. coli* e espécies de *Salmonella* e *Campylobacter* (ADAM, 2003).

A produção desses metabólitos pelos microrganismos é processo complexo, onde uma bactéria pode fornecer substratos para outros gêneros, dando suporte a seu crescimento, no chamado metabolismo cruzado. Em seres humanos o ácido butírico é produzido principalmente pelas bactérias dos grupos *Clostridium* cluster IV e XIVa. A fermentação para produção de ácido butírico pode ser realizada por três vias metabólicas, sendo elas: a sequência de reação de beta-oxidação reversa e duas vias alternativas a partir do butiril CoA (LOUIS et al., 2007). O ácido acético é co-substrato para esta reação e tem sido relatado que altas concentrações de acetato estimulam a síntese de CoA-transferase em bactérias butíricas, o que poderia levar a aumento na síntese de ácido butírico e detoxicação do excesso de ácido acético.

Como exemplo destas interações pode-se citar estudos sobre a produção intestinal de butirato. Ao avaliarem a produção de ácido butírico pela microbiota intestinal de seres humanos, Belenguer et al. (2006) demonstraram que em culturas de *Bifidobacterium adolescentis* houve produção de butirato pelo metabolismo cruzado com cepas de *Eubacterium hallii*. O ácido láctico formado pelo *Bifidobacterium* é convertido em acetil-CoA, que é via para síntese de ácido acético e este, por sua vez, precursor do ácido butírico. Os autores observaram ainda que a bactéria *Roseburia* spp. é capaz de produzir ácido butírico na presença de *Bifidobacterium adolescentis*, não pela conversão do lactato a butirato, mas pela hidrólise parcial dos substratos pela *Bifidobacterium adolescentis*, que facilitariam a ação da *Roseburia* spp.

Segundo o NRC (2006) a presença de AGCC no trato gastrointestinal de cães e gatos estimula a secreção de glucagon like-peptide 2 (GLP-2), que atua sobre a diferenciação e proliferação celular e na expressão de determinados genes ligados ao transporte de nutrientes no íleo. Desta forma, estes poderiam estar relacionados à melhora na função digestiva dos animais. Neste sentido o butirato também se destaca tendo sido apontado como responsável por outras importantes mudanças fisiológicas, tais como a capacidade de reverter alterações neoplásicas, efeitos nutritivos exercidos no epitélio do cólon e indução de apoptose em células danificadas (MENTSCHHEL; CLAUS, 2003).

A composição da microbiota intestinal pode ser influenciada, até certo ponto, por fatores exógenos, como a dieta (SIMPSON et al., 2002;. BARRY et al., 2010, MIDDELBOS et al., 2010). No entanto, a microbiota é resistente às influências ambientais, voltando rapidamente ao seu estado anterior quando esta influência cessa. Já a administração de antibióticos promove alterações mais profundas na microbiota intestinal, com alguns grupos de bactérias permanecendo reduzidos por várias semanas a meses (DETHLEFSEN et al., 2008;. SUCHODOLSKI et al., 2009;. GRØNVOLD et al., 2010).

Técnicas de cultivo tradicionais tem sido comumente usadas para caracterizar a composição da microbiota intestinal canina e felina (BENNO et al., 1992;. JOHNSTON; LAMPORT; BATT, 1993;. MENTULA et al., 2005). O cultivo bacteriano é também útil para a detecção de agentes patogênicos intestinais específicos (por exemplo, *Salmonella* spp.), permitindo a realização do antibiograma ou teste de susceptibilidade aos antibióticos e a genotipagem de isolados nesta cultura. No entanto, considerando-se as técnicas moleculares hoje disponíveis, os métodos dependentes de cultivo não se apresentam adequados para a caracterização profunda de ambientes complexos, como é o caso do TGI de mamíferos. Limitação destes métodos de cultivo inclui a incapacidade de cultivar e classificar corretamente a grande maioria dos microrganismos intestinais (GREETHAM et al., 2002). Ferramentas moleculares tornaram-se agora o método padrão para investigar a ecologia microbiana do tubo digestório, sendo cada vez mais utilizadas para a caracterização da microbiota intestinal de cães e gatos (SUCHODOLSKI, 2011).

Embora a microbiota de cães adultos tenha sido estudada, pouco é conhecido sobre as mudanças que acontecem com o avançar da idade (BENNO et al., 1992; SIMPSON et al., 2002; GOMES et al., 2011). Estas alterações, se presentes, podem ter consequências importantes para cães e gatos idosos, especialmente para os que são submetidos à terapia antibiótica e que são mais suscetíveis à *disbiose* (desequilíbrio da microbiota intestinal). Segundo Hopkins, Sharp e Macfarlane (2001) cães mais velhos parecem abrigar maiores números de clostrídios e enterococos, enquanto cães adultos jovens maior número de bacteroides, bifidobactéria, lactobacilos, e cocos anaeróbios. Estes dados, porém, não são consenso, pois alguns estudos encontraram resultados contraditórios, como maior número de lactobacilos e bacteróides em cães velhos (KEARNS et al., 1998), ou mesmo a não verificação de diferenças em relação à idade (GOMES et al., 2011).

As causas destas possíveis alterações na composição da microbiota intestinal de animais de estimação com o avançar da idade ainda são incertas. Várias mudanças fisiológicas e imunológicas acontecem no corpo com o passar dos anos. Hopkins, Sharp e Macfarlane (2001) sugeriram que algumas cepas bacterianas pudessem tirar proveito de novos nichos ecológicos, induzindo assim troca na composição do microbioma intestinal. Foi proposto que adesão reduzida à mucosa possa ser fator envolvido na menor colonização por algumas espécies de bifidobactérias em humanos velhos (SAUNIER; DORÉ, 2002). Esta troca na comunidade bacteriana do intestino grosso pode ter grandes efeitos na fisiologia e metabolismo do hospedeiro, porém estes aspectos necessitam de estudos adicionais.

2.4. *Microbiota intestinal e suas interações com o sistema imune*

Evidências em animais *germ-free* ou de animais criados em ambiente estéril, demonstram o importante papel da microbiota do TGI na fisiologia do hospedeiro. Por exemplo, porcos da Índia, galinhas, camundongos e ratos *germ-free*, em comparação com os animais convencionais foram descritos como tendo necessidades aumentadas de energia e vitaminas do complexo B e K, possuem alterações na estrutura e morfologia intestinal, demonstrarem reduzida motilidade

gástrica e aptidão imune, o que indica que a microbiota autóctone é um componente essencial ao desenvolvimento normal e funcional do TGI (TANNOCK, 1997; KIL; SWANSON, 2011).

Conforme descrito em revisão elaborada por Suchodolski (2011), cães *germ-free* apresentam taxas de crescimento semelhantes aos cães criados de forma convencional, porém apresentam sistema linfóide subdesenvolvido e reduzidas concentrações de imunoglobulinas. No entanto, cães com criação *germ-free* são capazes de apresentar resposta imune adequada a estimulação antigênica. A cicatrização de feridas e os mecanismos de coagulação do sangue de cães *germ-free* também são semelhantes aos dos animais não *germ-free*. O intestino dos cães *germ-free* se caracteriza por apresentar vilosidades mais finas e redução tanto da lâmina própria como da área de superfície da mucosa.

O sistema imune do trato gastrointestinal é capaz de diferenciar entre os vários tipos de bactérias que representam ameaça ou que devem ser toleradas, contribuindo dessa forma para a seleção do conjunto de bactérias comensais (OGRA, 2010). Este é o culminar da coevolução entre as bactérias residentes e os componentes inatos e adaptativos do sistema imune do trato digestório. Reações excessivas e aberrantes do sistema imune para com as bactérias comensais e outros antígenos presentes no TGI provocam inflamação e tem sido associadas com a ocorrência de várias doenças, incluindo enterocolite necrotizante em recém-nascidos prematuros e doença inflamatória intestinal, doença celíaca, e diversas alergias alimentares em crianças e adultos. Por outro lado, o inadequado reconhecimento ou resposta a patógenos presentes no tubo digestivo apresentam risco óbvio à saúde (BUDDINGTON; SANGILD, 2011).

As interações entre as bactérias que colonizam o tubo digestivo do recém-nascido e o desenvolvimento das funções imunes do TGI têm tanto consequências imediatas e como a longo prazo sobre a saúde do hospedeiro (DIMMITT et al., 2010; MSHVILDADZE; NEU, 2010). A combinação de bactérias comensais, alimentos e antígenos ambientais ativam o sistema imune do TGI imaturo do recém-nascido, desencadeando rápida maturação, proliferação e migração dos componentes celulares da divisão imune adaptativa. As interações durante a infância são críticas para o desenvolvimento de tolerância e para se evitar futuramente o risco de alergias

a alimentos e outros antígenos ambientais, sendo também fator-chave para redução do risco de desenvolvimento de atopia. As interações entre as bactérias e as células epiteliais gastrintestinais também influenciam a resposta imune inata, tais como a secreção de muco e peptídeos antimicrobianos (BUDDINGTON e SANGILD, 2011). Estes aspectos têm sido predominantemente estudados em neonatos, mas como e se ocorrem na senectude, bem como suas possíveis implicações não têm sido investigados.

Além da função da microbiota no fenótipo e funcionalidade do próprio TGI, estudos recentes apontam que diferenças na composição microbiana podem afetar alguns fenótipos metabólicos do hospedeiro, tais como obesidade (TURNBAUGH et al., 2006), diabetes e esteatohepatite e não-alcoólica (DUMAS et al., 2006). Embora os mecanismos pelos quais a microbiota promove tais mudanças fisiológicas ainda não sejam claramente definidos, a atividade metabólica microbiana e seus metabólitos (por exemplo, os ácidos graxo de cadeia curta) têm sido apontados como mediadores potenciais destas alterações (KIL; SWANSON, 2011).

2.5. *Imunosenescência e “inflammageing” em cães e gatos*

Existem dois conceitos atuais que vem sendo amplamente discutidos na comunidade científica acerca do envelhecimento, são eles a imunosenescência e o *inflammageing*.

A imunosenescência pode ser definida como o complexo multifatorial de mudanças que acometem o sistema imune de indivíduos idosos, predispondo-os a maior morbidade e mortalidade devido à ocorrência de infecções e doenças relacionadas à senilidade (DAY, 2010). Alterações no status imunológico são consideradas os principais fatores que contribuem para morbidade e mortalidade em seres humanos durante o envelhecimento. Em muitas outras espécies também foi reconhecida essa “remodelagem” do sistema imune com o envelhecer, comumente envolvendo deterioração de alguns aspectos da imunidade acompanhada pelo aumento de outros. Tais mudanças podem tornar os indivíduos velhos mais suscetíveis à infecção e são possivelmente relacionadas à ocorrência aumentada de

câncer observada em idosos de todas as espécies (BLOUNT; PRITCHARD; HEATON, 2005).

Franceschi et al. (2007), definem *inflammageing* como sendo o termo, em inglês e sem tradução para o português, que se refere ao comprometimento do equilíbrio de componentes pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que ocorre nos idosos. Durante toda uma vida de constantes desafios antigênicos, as adaptações do animal para produzir respostas inflamatórias eficientes podem conferir alta resistência a doenças infecciosas, mas também suscetibilidade aumentada à ocorrência de doenças inflamatórias com o passar do tempo. Por outro lado, baixas respostas inflamatórias, que tornam o indivíduo mais suscetível a doenças infecciosas, podem ser vantajosas para a sobrevivência na velhice. Grande parte do fenótipo (características observáveis) do envelhecimento, incluindo a imunosenescência, é explicada pelo desequilíbrio entre as redes inflamatórias e anti-inflamatórias que resultam em baixo grau de estado pró-inflamatório crônico no idoso, chamado de “inflammageing” (FRANCESCHI et al., 2007). Para a longevidade próspera, o indivíduo tem que achar os meios de reduzir o impacto dos fatores pró-inflamatórios, mantendo os aspectos essenciais de imunidade protetora e prevenindo o aparecimento da imunidade deletéria (por exemplo, excesso de reações inflamatórias e autoimunes).

Evidências que apontam para o prolongamento da saúde de cães e gatos por meio da intervenção nutricional estão se tornando disponíveis (KEALY et al., 2002; CUPP et al., 2006; GREELY et al., 2006). Os fabricantes de *pet food* estão investigando a imunosenescência e *inflammageing* do cão e gato, com o intuito de formular dietas específicas que possam reduzir a velocidade ou intensidade destes processos.

Os efeitos do processo de envelhecimento sobre o sistema imune de cães e gatos foram revisados por DAY (2010). De forma resumida, acredita-se que ocorra diminuição na resposta proliferativa de células mononucleares do sangue, declínio no número de linfócitos (B e T) no sangue periférico, menor porcentagem relativa de linfócitos T CD4+ (auxiliar) e maior na de linfócitos T CD8+ (citotóxicos), resultando em relação diminuída das células CD4+:CD8+. Estas alterações fenotípicas são acompanhadas por mudanças funcionais como habilidade reduzida de responder à

estimulação por mitógenos não-específicos, alteração no balanço da atividade de células CD4+ (Th1 para Th2) e resposta de hipersensibilidade tardia a mitógenos reduzida. Embora Day (2010) tenha proposto esta abordagem geral para as alterações imunológicas que acompanham o envelhecimento de cães e gatos, resultados contraditórios foram produzidos por diferentes grupos de pesquisa o que, em parte, pode ser atribuído ao uso de técnicas diferentes ou critérios divergentes na seleção de indivíduos para estudo (BLOUNT; PRITCHARD; HEATON, 2005). Assim, Gomes et al. (2011) verificaram em cães beagle idosos menor quantidade de linfócitos T e B e de leucócitos, no entanto a quantidade de linfócitos T CD4+ foi semelhante e a de linfócitos T CD8+ menor em idosos do que em beagles adultos.

Na Tabela 3 podem ser observados alguns dos resultados obtidos em estudos publicados entre 1999 e 2009 que avaliaram o efeito do envelhecimento sobre o sistema imune de cães (adaptado de DAY, 2010).

Estas alterações em linfócitos no sangue periférico parecem também acontecer dentro da lâmina própria do intestino de cães idosos, com número reduzido de células T e menor atividade proliferativa das populações de células intestinais (KLEINSCHMIDT et al., 2008; DAY, 2010). O TGI é o maior órgão linfóide do corpo, tendo papel principal na imunidade local e sistêmica, inclusive protegendo contra patógenos e modulando a resposta imune e a tolerância oral aos antígenos (KLEINSCHMIDT et al., 2008). Como resultado, estas consequências imunológicas do envelhecimento são prováveis de ter impacto na saúde intestinal destes animais. O sistema imune da mucosa do TGI de cães consiste em estruturas linfóides organizadas, incluindo as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e a lâmina própria intestinal (STOKES; WALY, 2006). Nestes encontram-se tipos celulares específicos, como linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos (GERMAN; HALL; DAY, 1999). O tecido linfóide associado ao intestino (gut associated lymphoid tissue - GALT) realiza as seguintes atividades: a) captura, processamento e apresentação dos antígenos ingeridos; b) produção de anticorpo locais, em especial IgA; c) ativação de respostas imunes citomediadas, particularmente as mediadas por linfócitos T CD8+ (células citotóxicas) e macrófagos.

Tabela 3. Efeitos do envelhecimento observados sobre o sistema imune de cães e respectiva referência bibliográfica. Adaptado de DAY (2010).

Efeito	Referência*
Redução na resposta proliferativa de células mononucleares do sangue a mitógenos, PHA, ConA e PWM Redução n° de linfócitos Redução n° de células T Redução n° de células T CD4+ Redução ou aumento n° de células T CD8+ Redução ou aumento n° de células B	Greeley et al. (1996, 2001, 2006); Kearns et al. (1999); Strasser et al. (2000); Meydani et al. (2000); Faldyna et al. (2001); Massimino et al. (2003); HogenEsch et al. (2004); Blount et al. (2005); Reis et al. (2005); Lawler et al. (2008)
Redução na relação entre linfócitos CD4:CD8	HogenEsch et al. (2004); Blount et al. (2005)
Reduzida expressão de MHC II por linfócitos do sangue; Redução na expressão por linfócitos sanguíneos de CD45RA e aumentou CD29 (possíveis células T de memória)	HogenEsch et al. (2004); Reis et al. (2005)
Redução na resposta a injeção com PHA ou SRBC no DTH (ou nenhum efeito)	Kearns et al. (1999); Massimino et al. (2003)
Aumento da % de céls. T CD4+ produtoras de IFN-g e IL-4; Aumento relativo de céls. Th1 versus Th2	Horiuchi et al. (2007)
Concentração reduzida de IL-2 sérica, mas sem efeito na atividade sérica de TNF-a	Strasser et al. (2000)
Nenhum efeito na produção de TNF-a ou IL-6 por céls. mononucleares estimuladas por LPS	Kearns et al. (1999)
Nenhum efeito significativo na atividade fagocítica ou bacteriocida de neutrófilos	Strasser et al. (2000); Greeley et al. (2001, 2006)
Sem efeito significativo na atividade de céls. NK	Greeley et al. (2001, 2006); Strasser et al. (2000)
Aumento na atividade de céls. NK em fêmeas	
Redução de céls. NK CD56+	
Aumento na concentração salivar de IgA	HogenEsch et al. (2004) Blount et al. (2005)
Sem diferença significativa nas concentrações séricas IgG e IgM	HogenEsch et al. (2004); Strasser et al. (2000); Blount et al. (2005)

(continua na próxima página)

Continuação...

Efeito	Referência*
Sem diferença significativa nas concentrações séricas de globulina alfa e beta	Strasser et al. (2000)
Sem diminuição na capacidade de promover a resposta primária de anticorpos a KLH	Greeley et al. (1996); Hall et al. (2003); Kearns et al. (1999)
Redução capacidade dos anticorpos responderem a SRBC (dependente da raça)	Kearns et al. (1999)
Persistência de títulos protetores de anticorpos para os componentes principais de vírus vacinais em cães não vacinados quando adultos	HogenEsch et al. (2004); Mouzin et al. (2004)
Capacidade de responder a vacinação com elevado título de anticorpos	HogenEsch et al. (2004)
Aumento da atividade funcional do complemento; Nenhum efeito sobre a concentração de proteína do complemento ou de fase aguda	Strasser et al. (2000)
Redução de céls. T CD3+ e macrófagos em lamina propria intestinal	Kleinschmidt et al. (2008)
Aumento da IgA plasmática na lamina propria intestinal	Kleinschmidt et al. (2008)
Sem alteração em mastócitos ou IgG ou IgM plasmáticos em lamina propria intestinal	Kleinschmidt et al. (2008)
Redução na proliferação de células em lamina propria intestinal	Baum et al. (2007)
Aumento plasmático de IgA, IgG e IgM; Redução de céls. dendríticas CD1+ MHCII+ Redução de céls. T CD4+ em tonsila faríngea,	Billen et al. (2006)
Aumento plasmático de IgA, IgG e IgM; Aumento de céls. dendríticas CD1+; Redução de MHC II + APC e aumento de células T CD4+ e CD8+ no trato respiratório	Peeters et al. (2005)

* Referências apresentadas por Day (2010). Apêndice B.

PHA, fitohemaglutinina; ConA, concanavalina A; PWM, mitógeno pokeweed; MHC, complexo de histocompatibilidade principal; DTH, teste de hipersensibilidade cutânea tardia; SRBC, eritrócito de ovelha; IFN, interferon; IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; NK, natural killer; Ig, imunoglobulina; KLH, hemocianina; APC, célula apresentadora de antígeno.

Especula-se, também, que estas mudanças imunológicas associadas ao intestino possam estar relacionadas com alterações na microbiota intestinal de cães idosos (DAY, 2010). O maior número de bactérias aeróbias e anaeróbias em amostras fecais de cães velhos comparativamente ao de cães jovens, em especial maior número de bactérias do gênero *Clostridium*, poderia ser uma das causas dessas alterações imunes, hipótese que necessita ainda de estudos confirmatórios.

Sendo assim, o estudo e o maior conhecimento da dinâmica inter-relação entre nutrição, imunidade e microbiota do intestino abrem oportunidade para melhorar a saúde intestinal e o status imunológico de cães e gatos idosos pela formulação de dietas apropriadas para esta faixa etária.

3. OBJETIVOS

Considerando os dados conflitantes e escassos sobre as alterações relacionadas ao envelhecimento na saúde intestinal, bem como sua relação com a imunidade de cães, realizou-se o presente estudo cujo objetivo foi comparar em cães filhotes em crescimento, adultos e geriátricos a composição da microbiota fecal, produtos fecais de fermentação intestinal, parâmetros imunológicos e características histológicas da mucosa intestinal e comparar longitudinalmente as subpopulações linfocitárias de cães filhotes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição (Protocolo n°000994/11).

4.1. Animais e manejo

Foram utilizados 30 cães beagle, machos ou fêmeas, divididos em três grupos de dez animais cada, diferindo entre si pela faixa etária. O Grupo Filhotes (GF) consistiu de animais filhotes com 10 meses de idade ($0,83 \pm 0,001$ anos), provenientes de duas ninhadas, nascidas em um mesmo dia (10/02/2010) no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos. O segundo grupo, Grupo Adulto (GA), foi composto por animais adultos com idade entre 5 e 6 anos ($5,3 \pm 0,48$ anos) e o último por animais idosos, Grupo Velhos (GV), com idade entre 10 e 13 anos ($10,7 \pm 1,25$ anos).

O estado de saúde dos cães foi confirmado previamente ao início do estudo por meio de exame físico, sanguíneo (hemograma e mensuração da atividade sérica de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e das concentrações séricas de creatinina e uréia) e coproparasitológico, o que comprovou que todos os cães estavam clinicamente saudáveis, desverminados e vacinados. O GF foi submetido a protocolo de vacinação com quatro doses da 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) aos 45, 66, 87 e 105 dias de vida, sendo junto com a quarta dose de vacina polivalente aplicada vacina contra vírus rábico (Rai-Vac I; Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, Brasil). Os GV e GA foram vacinados em fevereiro de 2010, aproximadamente oito meses antecedentes ao protocolo experimental.

Todos os animais foram provenientes do canil experimental do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos. Na primeira semana os cães receberam alimento suficiente para atender sua demanda energética de manutenção, conforme recomendações do NRC (2006). Na sequência foram pesados semanalmente e para os grupos GA e GV a quantidade de alimento foi reajustada conforme a necessidade energética individual de cada cão, para que mantivessem o peso corporal constante ao longo do estudo, enquanto para o GF a quantidade de alimento foi reajustada de maneira que apresentassem crescimento adequado. O consumo de alimentos foi registrado diariamente e o escore das fezes produzidas avaliadas segundo metodologia proposta por Carciofi et al. (2008): 0 = fezes líquidas; 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 = fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 = fezes bem formadas e consistentes e que não aderem ao piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas

4.2. Delineamento experimental

O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado, utilizando 30 cães divididos em três grupos divergentes na idade, gerando dez repetições por grupo etário. Os três grupos receberam a mesma dieta padrão e nenhum outro tipo de alimento ou intervenção por 30 dias antes das avaliações. Ao final deste período, foram coletadas amostras de fezes frescas durante três dias consecutivos para mensuração do pH fecal e determinação das concentrações de lactato, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, amônia, indol, fenol, aminas bioativas, concentração de imunoglobulina A e composição da microbiota. Ao final da coleta de fezes, foi colhida amostra de sangue por venipunção jugular para quantificação das populações linfocitárias CD5+CD4+ (linfócitos T auxiliares), CD5+ (linfócitos T), CD5+CD8+ (linfócitos T citotóxicos) e CD45+CD21+ (linfócitos B) por citometria de fluxo. Foi também realizado o teste de hipersensibilidade cutânea tardia ao final da coleta sanguínea, durante três dias seguidos e após isso os animais foram anestesiados e submetidos a procedimento endoscópico e colonoscópico para coleta de fragmentos do estômago, intestino delgado e intestino grosso. Nestes

fragmentos foi realizada análise histológica. Adicionalmente, os animais do GF foram desmamados e permaneceram alimentados com a ração experimental durante todo o ensaio, tendo sido avaliados quanto à composição das subpopulações linfocitárias em cinco momentos, aos 45, 66, 87, 120 e 300 dias de idade.

4.3. Dieta

Os animais receberam dieta extrusada, à base de farinha de vísceras de frango, milho e arroz. Considerando que as necessidades nutricionais de cães em fase de crescimento não seriam adequadamente atendidas com o fornecimento de alimento para animais adultos, mas que o inverso não seria inadequado a dieta experimental foi formulada de modo que sua composição nutricional atendesse às recomendações da FEDIAF (2008) para cães em crescimento. A fórmula da dieta experimental e sua composição química encontram-se na Tabela 4.

Para o preparo do alimento os ingredientes foram moídos em moinho de martelos com peneira com crivos de 0,8mm e extrusados em extrusora Tipo MAB 400S, com capacidade de processamento de 150kg de ração/hora, na Fábrica de Rações da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal. O processo de produção foi controlado ajustando-se a densidade dos *kibbles* a cada 20 minutos, sendo mantida entre 410 e 420g/L. O pré-condicionador foi mantido à temperatura de 90°C. Água, vapor, velocidade da rosca e o fluxo de ração foram ajustados conforme necessidade para manter a dieta na densidade almejada. A temperatura no canhão da extrusora foi mantida entre 125°C e 135°C.

Tabela 4. Fórmula e composição química da dieta experimental.

Fórmula da dieta experimental	
Ingrediente	%
Farinha de vísceras de frango	28,0
Quirera de arroz	20,0
Milho	31,5
Óleo de vísceras de frango	8,0
Glúten de milho	4,6
Fibra de cana de açúcar	3,0
Palatabilizante líquido	2,0
Premix vitamínico-mineral ¹	0,7
Óleo de peixe	0,6
Sal	0,5
Cloreto de potássio	0,5
Cloreto de colina	0,2
Antifúngico	0,18
Fosfato bicálcico	0,16
L-lisina	0,01
Antioxidante	0,05
Composição química estimada	
Item	%
Matéria seca (%)	91,0
Matéria mineral (%)	6,0
Proteína bruta (%)	26,0
Extrato etéreo ácido (%)	14,0
Fibra bruta (%)	2,0
Cálcio (%)	1,3
Fósforo (%)	0,9
Energia metabolizável (kcal/g) ²	3,7

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

² Calculada segundo NRC (2006).

4.4. Métodos

4.4.1. Avaliação microbiológicas das fezes

A avaliação da contagem de microrganismo nas fezes foi realizada de forma indireta através de análise do DNA da amostra fecal e amplificação pelo PCR quantitativo (qPCR). Amostras de fezes frescas foram colhidas de forma asséptica (imediatamente após a defecação em recipiente estéril sem contato com o solo) e congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em ultrafreezer a -70°C para posterior extração de DNA. Esta análise foi realizada no Instituto de Nutrição Animal da Universidade Livre de Berlim, Alemanha (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin). A extração do DNA foi realizada com Kit comercial (Qiagen Stool kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante, divergindo apenas por aumento na temperatura durante a etapa de lise para 90°C . Foram utilizados 200mg de fezes, em triplicata, sendo o DNA purificado agrupado e armazenado em freezer a -20°C até o momento da análise.

As sequências dos Primers empregados encontram-se apresentadas na Tabela 5. Todos os Primers foram adquiridos da MWG Biotech (Straubing, Alemanha). A amplificação e aquisição dos dados de fluorescência foram realizadas em PCR Stratagene MX3000p (Stratagene, Amsterdã, Holanda). O mastermix consistiu de 12,5 microlitros de Brilliant SYBR Green QPCR Mastermix (Stratagene, Amsterdã, Holanda), 0,5 microlitro de cada primer ($10\mu\text{M}$) e 10,75 microlitros de água livre de RNA. Um microlitro de cada amostra foi adicionado antes da amplificação do PCR. Todos os programas para amplificação apresentaram etapa inicial de desnaturação com temperatura de 95°C por 15 minutos para ativação da polimerase, após isso o tempo de anelamento de 30 segundos seguido por 30 segundos de extensão a 72°C . As temperaturas de anelamento encontram-se apresentadas na Tabela 5. As espécies alvo dos pares de primer utilizados para realização do PCR quantitativo encontram-se na Tabela 6.

A quantificação seguiu metodologia descrita por Vahjen, Taras e Simon (2007). Em resumo, uma série de amostras autoclavadas de fezes de cão

Tabela 5. Sequências de oligonucleotídeos utilizados no PCR quantitativo e respectivas temperaturas de anelamento.

Designação de grupo	Seqüência de oligonucleotídeos	Par de primers	T.A.* (°C)	Referência
<i>Lactobacillus</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	LAC-1 LAC-2	58	Rinttilä et al., 2004
<i>Escherichia coli</i> - <i>Hafnia</i> - <i>Shigella</i>	GTTAATACCTTTGCTCATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Entero-F Entero-R	55	Mallinen et al., 2003
Enterobacteriaceae	GTBTCDCCRCGCAGRC TGCGYCTGGTRATCTA	EntqPCR3417f EntqPCR3852r	55	Vahjen, Pieper e Zentek, 2011
<i>Bifidobacterium</i> spp.	TCGGGTCYGGGTGAAAG CCACATCCAGCRTCCAC	g-BIFID-F g-BIFID-R	58	Rinttilä et al., 2004
<i>Bacteroides</i> - <i>Prevotella</i> - <i>Porphyromonas</i>	GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT CGGAYGTAAGGGCCGTGC	BPP1 BPP2	58	Rinttilä et al., 2004
Cluster XIVA (Grupo <i>Coccoides</i>)	AAATGACGGTACCTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	g-Ccoc-F g-Ccoc-R	55	Matsuki et al., 2004
Cluster IV (Grupo <i>Clostridium leptum</i>)	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCCTCCGTTTTGTCAA	sg-Clept-F sg-Clept-R	55	Matsuki et al., 2004
Cluster I (Grupo <i>Clostridia</i>)	TACCHRAGGAGGAAGCCAC GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT	CI-F1 CI-R2	55	Song, Liu e Finegold, 2004

* T.A. = temperatura de anelamento em °C

Tabela 6. Espécies alvo dos pares de primer utilizados no PCR quantitativo.

Designação de grupo	Espécies alvo
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. amylolyticus</i> , <i>L. cetotolerans</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. kefirii</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. animalis</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> , <i>L. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>L. manihotivorans</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>L. zeae</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> , <i>L. bifermentans</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>fusiformis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>Weissella halotolerans</i> , <i>W. confusus</i> , <i>W. Paramesenteroides</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>W. kandleri</i> , <i>W. minor</i> e <i>Leuconostoc lactis</i>
<i>Escherichia coli</i> - <i>Hafnia</i> - <i>Shigella</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> e <i>Shigella</i> spp.
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>C. gillenbergii</i> , <i>C. murliniae</i> , <i>C. sp. F1-4</i> , <i>C. sp. F3-1</i> , <i>C. werkmanii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>E. sp. 638</i> , <i>E. sp. IMD1260</i> , <i>E. sp. pptphilum</i> , <i>E. sp. TUT1390</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> , <i>Erwinia rhapsodica</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella granulomatis</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. sp. HF13</i> , <i>K. sp. LB-2</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>P. sp. Co9941</i> , <i>P. sp. TNT6</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Serratia grimesii</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Citrobacter</i> sp. não cultivável
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. minimum</i> , <i>B. angulatum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. dentium</i> , <i>B. ruminantium</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. subtile</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. boum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. choerinum</i> , <i>B. gallicum</i> , <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> , <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> , <i>B. magnum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. indicum</i> , <i>B. gallinarum</i> , <i>B. pullorum</i> , <i>B. saeculare</i> , <i>B. suis</i>

(Continua na próxima página)

Continuação...	Designação de grupo	Espécies alvo
<i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>		<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>B. stercoris</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. eggerthii</i> , <i>B. acidofaciens</i> , <i>B. caccae</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. distasonis</i> , <i>B. merdae</i> , <i>B. forsythus</i> , <i>Prevotella tanneriae</i> , <i>P. bryantii</i> , <i>P. ruminicola</i> , <i>P. heparinolytica</i> , <i>P. zooglyphiformans</i> , <i>P. brevis</i> , <i>P. loeschelii</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. enoeca</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. veroralis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. albensis</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. corporis</i> , <i>P. distiens</i> , <i>P. bivia</i> , <i>P. pallens</i> , <i>P. denticola</i> , <i>Porphyromonas canoris</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. asaccharolytica</i> , <i>P. levii</i> , <i>P. cangingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. macacae</i> , <i>P. circumdentaria</i> , <i>P. catoniae</i>
Cluster XIVa (Grupo Coccoides)		<i>Clostridium clostridioforme</i> , <i>C. coccoides</i> , <i>C. nexile</i> , <i>C. oroticum</i> , <i>C. sphenoides</i> , <i>C. baratii</i> , <i>Ruminococcus gnavus</i> , <i>R. lactaris</i> , <i>R. productus</i> .
Cluster IV (Grupo <i>Clostridium leptum</i>)		<i>Clostridium cellulosi</i> , <i>C. leptum</i> , <i>C. orbiscindens</i> , <i>C. sporosphaeroides</i> , <i>C. viride</i> , <i>Eubacterium desmolans</i> , <i>E. siraeum</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. bromii</i> , <i>R. callidus</i> , <i>R. flavefaciens</i>
Cluster I (Grupo Clostridia)		<i>Clostridium favosporum</i> , <i>C. corinoformum</i> , <i>C. puniceum</i> , <i>C. caliptrosporum</i> , <i>C. beijerinckii</i> , <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. kainantoi</i> , <i>C. botulinum não proteolítico tipo B</i> , <i>tipo E e tipo F</i> , <i>C. aurantibutyricum</i> , <i>C. chartatabidum</i> , <i>C. longisporum</i> , <i>C. paraputrificum</i> , <i>C. carnis</i> , <i>C. quini</i> , <i>C. celatum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. baratii</i> , <i>C. absonum</i> , <i>C. cellulovorans</i> , <i>C. fallax</i> , <i>C. algidicarnis</i> , <i>C. cadaveris</i> , <i>C. intestinalis</i> , <i>C. collagenovorans</i> , <i>C. sardiniense</i> , <i>C. homopropionicum</i> , <i>C. thermopalmarium</i> , <i>C. thermobutyricum</i> , <i>C. botulinum tipo C</i> , <i>tipo D e tipo G</i> , <i>C. botulinum proteolítico tipo A e tipo F</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. estertheticum</i> , <i>C. subterminale</i> , <i>C. oceanicum</i> , <i>C. putrificum</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. tetanomorphum</i> , <i>C. malenominatum</i> , <i>C. cochlearium</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. pasterurianum</i> , <i>C. magnum</i> , <i>C. scatologenes</i> , <i>C. kluyveri</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. ljungdahlii</i> e <i>Sarcina ventriculi</i>

foi semeada com diferentes espécies bacterianas de interesse para o estudo e em quantidades conhecidas (10^8 a 10^2 UFC por grama de peso na matéria natural). Todas as cepas utilizadas nos padrões de calibração eram provenientes da coleção microbiológica do Instituto de Nutrição Animal da Universidade Livre de Berlim, Alemanha (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin). Cada uma destas cepas foram cultivadas em caldos seletivos seguindo suas necessidades específicas de crescimento, sendo posteriormente centrifugadas e seu número de células determinado microscopicamente em câmara de Neubauer. Número determinado de células foi inoculado em cinco gramas de fezes autoclavadas de cão (5×10^8 a 5×10^2 células por amostra), na sequência as amostras semeadas foram homogeneizadas em sacos plásticos em triplicadas e alíquotas de um grama foram utilizadas para a extração de DNA. Após a extração, as soluções de DNA purificadas foram combinadas, fazendo-se pools de cepas padrões utilizando-se cepas semelhantes às espécies alvos dos pares de primers utilizados no estudo. As curvas de calibração do PCR foram obtidas a partir destes pools padrões. Os resultados obtidos foram expressos em número de células por grama de peso na matéria natural e posteriormente convertido para base logarítmica em número de células por grama de matéria seca fecal.

4.4.2. Avaliação de produtos de fermentação nas fezes

Com o intuito de se verificar as possíveis alterações no padrão fermentativo da *eubiota* com o avançar da idade, foram determinados o pH e as concentrações fecais dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, ácido láctico, aminas, amônia, indol e fenol.

4.4.2.1. Concentração fecal dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada

Para a análise dos AGCC e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), foram colhidas 5 gramas de fezes frescas (coletadas no máximo 10 minutos após a defecação). Estas amostras foram imediatamente congeladas em gelo seco, seus

recipientes vedados com Parafilm M (Brand GmbH, Wertheim, Alemanha) e mantidas em freezer a -15°C para posterior análise. Estas análises foram conduzidas no Instituto de Nutrição Animal da Universidade Livre de Berlim, na Alemanha (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin).

Brevemente, após descongelamento, 300 miligramas das amostras foram pesadas e diluídas em um mililitro de solução de ácido hexanóico (0,5mmol por litro de ácido hexanóico, 10g de ácido oxálico por litro), homogeneizadas por uma hora e centrifugadas a 15.700G por 15 minutos (centrífuga Eppendorf, modelo 5415C, Hamburgo, Alemanha). O ácido hexanóico (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemanha) foi utilizado como padrão interno (0,5mmol/L). A amostra foi então injetada (um microlitro) em cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, Hewlett-Packard modelo 6890N, Santa Clara, EUA) equipado com coluna HP-Innowax (modelo 19095N-123, Agilent Technologies, 30m de comprimento, $530\mu\text{m}$ de diâmetro interno e $1,0\mu\text{m}$ de espessura). As temperaturas iniciais na coluna, injetor e detector de ionização de chama foram 70, 230 e 250°C , respectivamente. O gás hidrogênio produzido por um gerador de gás (Parker ChromGas, modelo 9090, Parker Hannifin Corporation, Cleveland, EUA) foi o gás de arraste com vazão de 30mL/minuto.

4.4.2.2. Concentração fecal de ácido láctico

Para a análise do lactato foram colhidas três gramas de fezes frescas (coletadas no máximo 10 minutos após a defecação). Estas foram analisadas segundo Pryce (1969). Para isto foram rapidamente homogeneizadas e misturadas à 9 mL de água destilada (1:3 p/v). Esta mistura foi mantida sob refrigeração por um dia, sendo, então, centrifugada por três vezes a 4.500G à 15°C , por 15 minutos, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Foi utilizado branco reagente para calibrar o espectrofotômetro (QUICK - Lab marca DRAKE, São José do Rio Preto, São Paulo) e as amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. A leitura pelo método espectrofotométrico ocorreu a 565nm.

4.4.2.3. Concentração fecal de amônia

Para medir a concentração de amônia (NH_3) nas fezes foi adaptada a metodologia de Vieira (1980). Cinco gramas de fezes frescas (coletadas no máximo 10 minutos após a defecação) foram homogeneizadas e misturadas com 30 mililitros de ácido fórmico 4,2N (1:3 p/v). Posteriormente a mistura foi centrifugada a 4.500 G durante 15 minutos a 15°C por três vezes, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Após a extração as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C). Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e em seguida alíquotas de 2mL diluídas em 13mL de água destilada (2:13 v/v) e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio (Tecnal TE - 036/1, Piracicaba, Brasil). A destilação foi realizada com 5mL de solução 0,2N de hidróxido de potássio e o nitrogênio recebido em um erlenmeyer com 10mL de solução receptora (ácido bórico a 0,97N). Ao atingir-se o volume de 50mL de solução receptora mais material destilado, a destilação foi interrompida. Em seguida foi realizada a titulação com ácido clorídrico 0,005N.

O volume utilizado para chegar ao ponto de viragem foi descontado do volume utilizado no branco e multiplicado pela normalidade do ácido clorídrico (0,005) e pelo fator de conversão do nitrogênio total da molécula de amônia (fator de conversão = 17) dividindo-se na sequencia este valor pelo peso do volume de extrato de amostra obtido para a destilação e multiplicando-o por 100, resultando na porcentagem de amônia da amostra destilada e titulada. Dividiu-se essa porcentagem obtida por 100 para obter a quantidade em miligramas de amônia por cem mililitros de amostra. Esse resultado foi posteriormente convertido a miligrama de amônia por grama de matéria seca fecal multiplicando-se os miligramas de amônia por cem mililitros de amostra pelo somatório entre peso da amostra úmida utilizada para obtenção do extrato e o volume de ácido fórmico utilizado na sua diluição e dividindo-se novamente pelo peso da amostra úmida utilizada para extração. Esse resultado foi dividido pela matéria seca da amostra e multiplicado por 100.

4.4.2.4. Concentração fecal de aminas

Para a avaliação da concentração de aminas nas fezes, cinco gramas de fezes frescas foram homogeneizadas e misturadas a sete mililitros (5:7 p/v) de ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%), agitadas por 3 minutos em vortex e centrifugadas a 10.000G, por 20 minutos a 4°C (Centrífuga Modelo RC 5C plus, Sorvall Products, Newtown, CT, EUA). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo e o resíduo extraído por mais duas vezes, empregando-se respectivamente volumes de sete e seis mililitros de TCA, sendo os sobrenadantes filtrados e combinados. O volume final obtido foi anotado e congelado. As amostras foram encaminhadas para análise no Laboratório de Bioquímica de Alimentos no Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG – Belo Horizonte, MG. O método utilizado foi o de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, Shimadzu modelo LC-10AD, Kyoto, Japão) por par iônico, derivação pós-coluna com o-ftalaldeído e detecção fluorimétrica, seguindo a metodologia descrita por Vale e Gloria (1997).

4.4.2.5. Concentração fecal de indol e fenol

A determinação da concentração de fenóis e indóis das fezes foi conduzida conforme descrito por Swanson et al. (2002) e foi realizada no Instituto de Nutrição Animal da Universidade Livre de Berlim, na Alemanha (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin). Foram pesadas 2,0g de fezes (matéria úmida) em duplicata, colocadas em tubos para ultracentrífuga de 16 mililitros, adicionado aos tubos 1mL de solução de 5-metilindol diluída em metanol (500µg/ml; padrão interno) e acrescidos 4mL de metanol. As misturas de fezes com metanol e padrão interno foram cobertas com parafilme, homogeneizadas por 1 minuto em vortex, e incubadas por 1 hora a 4°C, homogeneizando novamente a cada 15 minutos. Após, os tubos foram centrifugados a 29.000G por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante repassado para tubo falcon mantido sob refrigeração. O resíduo foi extraído novamente. As duas frações sobrenadantes obtidas foram combinadas e armazenadas em freezer a -15°C até o momento da análise.

Concentrações individuais de fenol, p-cresol, 4-etilfenol, indol, 2-metilindole, 3-metilindole, 7-metilindol e 2,3-dimetilindol foram determinadas usando-se cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, Hewlett-Packard modelo 6890N, Santa Clara, EUA) equipado com coluna HP-88 (modelo 112-8867, Agilent Technologies, 60m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,2µm de espessura). As temperaturas iniciais na coluna, injetor e detector de ionização de chama foram 130, 250 e 300°C, respectivamente. O gás hidrogênio produzido por um gerador de gás (Parker ChromGas, modelo 9090, Parker Hannifin Corporation, Cleveland, EUA) foi o gás de arraste com vazão de 40mL/minuto.

A concentração fecal de cada fenol e indol avaliado foi calculada conforme abaixo:

$$\mu\text{g fenol ou indol / g de amostra (MS)} = \frac{\text{área do pico}}{\text{área de pico do padrão interno}} \times \frac{500\mu\text{g padrão interno}}{\text{g de amostra (MS)}}$$

4.4.2.6. Determinação do pH das fezes

Para a determinação do pH das fezes cinco gramas de amostra fresca foi diluída (1:3 w/w) em água miliq e o pH medido com pH-metro de precisão 0,01 pH (modelo DM20, Digicrom Analítica Ltda, São Paulo, Brasil). Este procedimento foi repetido por três dias consecutivos, empregando-se a média das três aferições obtidas.

4.4.3. Parâmetros imunes

Foram quantificadas as concentrações de IgA das fezes, indicativa da imunidade de mucosa e a imunidade sistêmica avaliada por imunofenotipagem de linfócitos sanguíneos e pelo teste de hipersensibilidade cutânea tardia..

4.4.3.1. Concentração fecal de imunoglobulina A

Para a quantificação de imunoglobulina A amostras de fezes frescas (até 10 minutos após eliminação) foram coletadas por três dias consecutivos e armazenadas

a -20°C. Para a análise estas foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra por animal. A separação de IgA fecal foi realizada por extração salina de acordo com Peters et al. (2004). Para isto foi pesado um grama da amostra (peso úmido), adicionada solução composta por PBS (0,01M; pH 7,4), 0,5% tween 80 e 0,05% de azida sódica e homogeneizada. A suspensão foi centrifugada a 1.500G por 20 minutos à 5°C. Dois mililitros do sobrenadante foram transferidos para microtubo graduado contendo 20 microlitros de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), sendo, então, a amostra homogeneizada e depois centrifugada a 15.000G por 15 minutos à 5°C e o sobrenadante transferido para tubo estéril e armazenado à -20°C até a quantificação de IgA.

Para a determinação da concentração total de IgA no extrato de fezes utilizou-se kit de ELISA específico para IgA canina (Dog IgA Quantitative ELISA kit, Bethyl laboratories, Montgomery, EUA). A placa foi recoberta com a diluição recomendada do anticorpo de captura (100µL por poço) e incubada por uma hora. Após três lavagens com PBS + Tween 80, adicionou-se 200µL 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 foram colocados na placa os padrões (sete diluições) e as amostras de extrato fecal, em duplicata. Após incubação por uma hora e novo procedimento de lavagem, foi colocado 100µL por poço do anticorpo conjugado HRP na diluição 1:100.000. Realizou-se a última incubação de uma hora e lavagem. Adicionou-se a solução do substrato cromógeno constituído por H₂O₂ e TMB, aguardando-se entre cinco e 15 minutos e bloqueando-se a reação com a adição de 100µL de H₂SO₄ 2M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology, Chantilly, Virginia, EUA) usando filtro de 450nm. Todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente.

Dos resultados obtidos foram subtraídos os valores do branco. Obteve-se a curva padrão, utilizando-se a absorbância e a concentração já conhecida dos padrões (fornecidos no kit). Calculou-se então a equação da curva, gerando-se uma equação polinomial de segundo grau (as curvas tiveram R² 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 na matéria seca. Devido à alta concentração de IgA nas amostras, elas tiveram que ser diluídas em 1:600 para que ficassem entre os valores máximos e mínimos de leitura da amostra padrão.

4.4.3.2. Imunofenotipagem de linfócitos

A avaliação quantitativa de células CD5⁺ (linfócitos T), CD5⁺CD4⁺ (linfócitos T auxiliares), CD5⁺CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos), CD21⁺ (linfócitos B) no sangue periférico foi realizada por citometria de fluxo. Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a coleta do sangue. Para isso, alíquotas do sangue periférico foram encaminhadas ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. A cada tubo foram adicionados 100µL de sangue com EDTA. Então, se adicionaram dois microlitros dos respectivos anticorpos (AbD Serotec, Raileigh, EUA), conforme esquema:

- Tubo 1- Só células: não foi colocado anticorpo;
- Tubo 2- Isotipo controle: IgG1 PE + IgG2a FITC;
- Tubo 3- CD5⁺/CD4⁺: CD5 FITC + CD4 PE;
- Tubo 4- CD5⁺/CD8⁺: CD5 FITC + CD8 PE e
- Tubo 5- CD21⁺: CD21 PE.

Ato contínuo, os tubos foram incubados por 20 minutos à 4°C, protegidos da luz. Um mililitro de solução 1:10 do tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado a cada tubo, seguido da homogeneização e incubação por dez minutos à 4°C protegidos da luz. Posteriormente, realizou-se a lavagem do material com PBS por três vezes, que consistiu na centrifugação a 500G por três minutos, desprezando o sobrenadante e adicionando dois mililitros de PBS. Após a última lavagem, foram adicionados 500µL da solução 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. Às porcentagens de células foram aplicadas às

contagens de leucócitos do hemograma para se obterem os valores absolutos. A relação $CD4^+ : CD8^+$ também foi calculada, dividindo-se, individualmente, as contagens de $CD5^+CD4^+$ pelas de $CD5^+CD8^+$.

Como parte da avaliação citofluorométrica, fez-se necessário realizar avaliação dos parâmetros eritroleucométricos e plaquetários. Para realização de hemograma, um mililitro do sangue foi separado em tubo de ensaio de vidro contendo anticoagulante EDTA. As contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, taxa de hemoglobina, volume globular ou hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram obtidos com auxílio de um contador veterinário automático de células (ABC Vet, Horiba ABX Brasil, São Paulo, Brasil). A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida utilizando-se de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de Metanol – May Grunwald – Giemsa (MGG) e avaliados à microscopia óptica. A fórmula leucocitária absoluta foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias, por uma regra de três direta.

4.4.3.3. Teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH)

Os procedimentos para realização do teste de hipersensibilidade cutânea tardia foram adaptados dos descritos por Kim et al. (2000). Para este teste foram injetados por via intradérmica, na prega cutânea do membro pélvico direito na região da fossa paralombar dos animais, após a devida tricotomia e antissepsia da pele com álcool 70%, 100 μ L de cada uma das soluções que seguem: 1) salina (0,9%) empregada como controle negativo; 2) fitohemaglutinina (0,5g/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 com força de 2N no local da leitura. Esta foi realizada nos momentos zero, 24, 48 e 72h após as injeções intra-dérmicas. O procedimento está ilustrado na Figura 1.

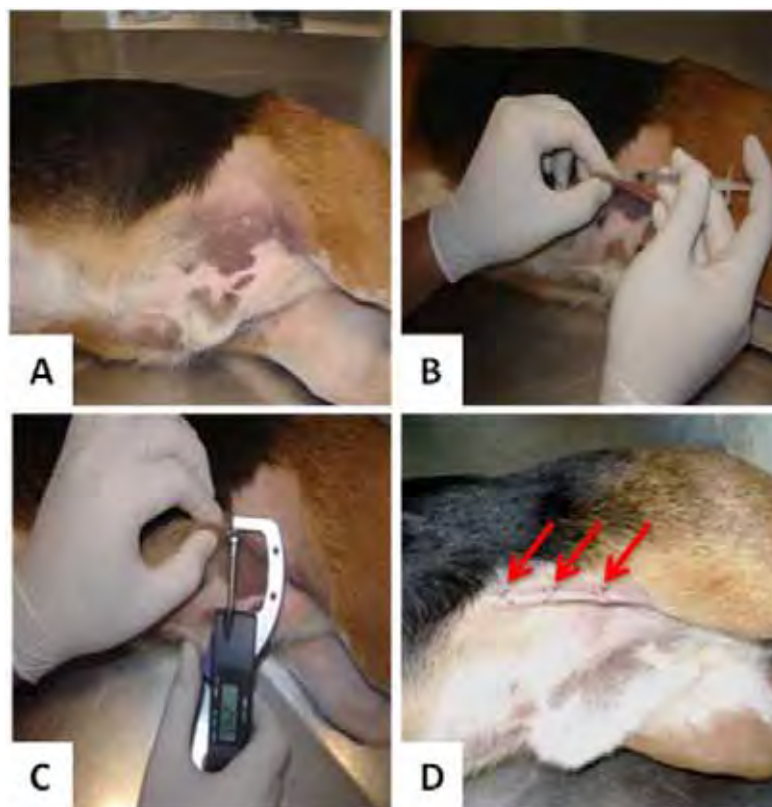


Figura 1. Ilustração da sequência de procedimentos para realização do Teste de Hipersensibilidade Cutânea Tardia (DTH) em cães beagle de diferentes idades. (A) Área de tricotomia no local da prega cutânea de membro pélvico direito, na região da fossa paralombar; (B) Foto ilustrativa do procedimento de aplicação; (C) Utilização do medidor de espessura da pele; (D) Prega cutânea com marcações para identificação dos locais de medição das pápulas após aplicação da solução salina (marcação da esquerda), fitohemaglutinina (marcação central) e dos antígenos vacinais (marcação direita).

4.4.4. Análise histológica do estômago e intestinos delgado e grosso

Após jejum de 12 horas, os cães foram anestesiados para procedimento endoscópico. Receberam clorpromazina (Sanofi-Aventis farmacêutica Ltda, Suzano, Brasil) na dose de 1,0mg/kg por via intramuscular, como pré-anestesia. Após a sedação foi realizada a indução anestésica com propofol (Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil) na dose 5,0mg/kg, administrados

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

Para o procedimento de biópsia por endoscopia digestiva alta e colonoscopia os animais permaneceram em decúbito lateral. Foi empregado endoscópio flexível (Karl Storz, 60914NKS, Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemanha) e pinça de biópsia tipo boca de jacaré de 2,2mm (Karl Storz, 60252LX, Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemanha). Foram retirados até 10 fragmentos da mucosa do estômago e duodeno e, após realização de enema, até 10 fragmentos da mucosa do íleo, junção íleo-ceco-cólica e do cólon de cada animal. Após o procedimento, os animais continuaram sendo assistidos até a recuperação total da anestesia. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e processados segundo técnica padrão com inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes seriados de 4 μ m e os fragmentos corados por hematoxilina e eosina (HE).

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

Os fragmentos foram analisados primeiramente quanto à adequação da biópsia, sendo para isto graduados de zero a dois quanto à qualidade, sendo zero para fragmentos inapropriados para análise e dois para fragmentos adequados. As variáveis avaliadas semiquantitativamente foram: relação vilo:cripta, morfologia dos vilos, características do epitélio superficial, presença e intensidade da hiperplasia da cripta, dilatação da cripta, grau de ocorrência das células caliciformes, frequência e grau de intensidade de diferentes tipos de células inflamatórias na lâmina própria,

número de linfócitos intraepiteliais, e presença de erosão, ulceração, edema, fibrose e atrofia das criptas (SÁ, 2004). A intensidade destes processos foi avaliada em escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro do padrão de normalidade, 1 = discreta alteração, 2 = moderada alteração e 3 = marcante alteração. A intensidade da presença das células inflamatórias foram graduadas em 0 (ausência), 1 (discreto número), 2 (moderado infiltrado) e 3 (marcante infiltrado) (SÁ, 2004).

4.5. Análise estatística

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram avaliados quanto à pressuposição de normalidade dos erros, pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS (Versão 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Quando diferenças significativas foram detectadas pelo teste F da ANOVA, comparações múltiplas foram conduzidas pelo Teste de Tukey. Os resultados do teste de hipersensibilidade cutânea tardia foram comparados por análise de variância de medidas repetidas, sendo comparadas as idades, os períodos e a interação entre ambos. Quando necessário, transformação logarítmica das variáveis foi usada ($\log x + 1$). Os resultados das análises histológicas dos fragmentos de mucosa foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, quando diferenças significativas foram verificadas, os grupos foram comparados pelo teste de Dunn.

No GF, as avaliações de imunofenotipagem dos cinco momentos (aos 45, 66, 87, 120 e 300 dias de vida) foram comparadas por análise de variância de medidas repetidas no tempo. Quando diferenças significativas foram detectadas pelo teste F, as variáveis foram comparadas por contrastes polinomiais para se determinar possíveis efeitos lineares ou quadráticos da idade. Para a comparação da imunofenotipagem do GF com os GA e GV considerou-se a média das cinco avaliações dos filhotes, sendo os dados submetidos à análise estatística conforme descrito para os demais parâmetros. Considerou-se como significativos valores de $P \leq 0,05$ e como tendência valores de $P < 0,1$.

5. RESULTADOS

O consumo da dieta experimental foi adequado, não havendo episódios de diarreia, vômitos ou recusa em se alimentar durante todo o ensaio. Os escore fecal dos animais permaneceu entre 3 e 4, dentro da faixa ideal no sistema empregado. Os cães do GA e GV mantiveram peso corporal constante ao longo do teste, enquanto os animais do GF apresentaram crescimento adequado para a raça (dados não apresentados).

5.1. Avaliação microbiológica das fezes

Os resultados de composição microbiana das fezes estão apresentados na Tabela 7. O par de primers empregado para avaliação de enterobactérias (EntqPCR3417f/EntqPCR3852r) não obteve resultados de amplificação nas amostras deste estudo. Destaca-se que para o grupo *Escherichia coli* - *Hafnia* - *Shigella* a contagem refere-se quase exclusivamente a *E. coli*, uma vez que *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* são atualmente reconhecidos como um grupo de clones da *E. coli*. Foi observado que animais do GA e GV apresentaram menor número de *Bifidobacterium* spp. ($P=0,001$) e Cluster IV (Grupo *Clostridium leptum*; $P=0,002$) que o GF. Para os demais grupos não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$).

5.2. Concentração de produtos de fermentação nas fezes

As concentrações dos ácidos acético e propiônico e de ácidos graxos voláteis (AGV) totais foram significativamente menores nas fezes do GV ($P<0,05$) quando comparadas ao GF, tendo o GA demonstrado valores intermediários (Tabela 8). O GV apresentou, ainda, menor concentração de ácido butírico nas fezes ($P<0,05$) e o GF maior concentração de ácido valérico que os demais grupos ($P<0,05$). Quando a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) e ramificada (valérico, isovalérico, isobutírico) foi avaliada em proporção à concentração de AGV totais das fezes, observou-se que o GF apresentou menor

proporção de ácido isovalérico, enquanto o grupo de animais velhos maior proporção deste metabólito ($P=0,019$). O GV apresentou, ainda, tendência à maior proporção de ácido isobutírico ($P=0,06$).

Os animais do GV apresentaram maior pH das fezes que os animais do GF ($P=0,034$). Não se observou diferença significativa nas concentrações de amônia e lactato e matéria seca das fezes dos cães ($P>0,05$), como pode ser visto na Tabela 9.

A concentração de algumas aminas variou nas fezes dos cães em função do grupo etário. Foi observada menor concentração de putrescina ($P=0,02$), cadaverina ($P=0,04$) e triptamina ($P=0,02$) nas fezes de cães do GF, em comparação à de cães do GA. Estes resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 7. Composição da microbiota das fezes de cães de diferentes idades, determinada por qPCR.

Item	GF	GA	GV	EPM ¹	CV (%)	Valor P
	log ₁₀ céls/ g de fezes na MS					
<i>Lactobacillus</i>	6,90	6,62	6,63	0,77	6,15	0,241
<i>Escherichia coli</i> - <i>Hafnia</i> - <i>Shigella</i>	5,50	5,50	5,50	0,55	55,05	1,000
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,15 ^a	6,44 ^b	6,40 ^b	0,07	6,15	0,001
<i>Bacteroides</i> - <i>Prevotella</i> - <i>Porphyromonas</i>	4,30	4,37	4,49	0,11	14,15	0,823
Cluster XIVa (Grupo <i>Coccooides</i>)	7,16	6,85	7,11	0,09	7,23	0,389
Cluster IV (Grupo <i>Clostridium leptum</i>)	7,28 ^a	6,55 ^b	6,40 ^b	0,07	5,82	0,002
Cluster I (Grupo <i>Clostridia</i>)	5,67	5,65	5,61	0,11	10,45	0,983

¹ Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.

^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Tabela 8. Concentração média e proporção de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada nas fezes de cães de diferentes idades.

Item ¹	GF	GA	GV	EPM ²	CV (%)	Valor P
	µmol / g fezes na MS					
Ácido acético	215,0 ^a	205,6 ^{ab}	174,1 ^b	7,27	20,09	0,050
Ácido propionico	103,4 ^a	95,2 ^{ab}	80,5 ^b	2,98	17,59	0,011
Ácido isobutírico	8,4	8,4	8,1	0,22	14,84	0,868
Ácido butírico	45,0 ^a	47,1 ^a	36,2 ^b	7,30	78,91	0,005
Ácido isovalérico	11,2	11,9	11,8	0,36	16,93	0,721
Ácido valérico	2,1 ^a	0,8 ^b	0,7 ^b	0,32	144,22	0,013
AGV totais	406,6 ^a	369,0 ^{ab}	313,8 ^b	14,1	21,27	0,021
	% AGV totais					
Ácido acético	53,7	55,7	55,1	0,85	8,55	0,543
Ácido propionico	26,0	25,8	25,7	0,44	9,37	0,986
Ácido isobutírico	2,2	2,3	2,7	0,10	26,01	0,063
Ácido butírico	14,8	12,8	12,3	0,96	39,60	0,699
Ácido isovalérico	2,9 ^b	3,2 ^{ab}	3,9 ^a	0,14	23,49	0,019
Ácido valérico	0,5	0,2	0,2	0,08	143,66	0,125

¹ Valores transformados em Log para análise estatística.

² Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.

^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Tabela 9. Matéria seca, pH e concentração de amônia e lactato determinados nas fezes de cães de diferentes idades.

Item	GF	GA	GV	EPM¹	CV (%)	Valor P
Matéria seca, %	41,4	40,0	41,1	0,73	9,95	0,724
pH	6,2 ^b	6,3 ^{ab}	6,4 ^a	0,04	3,41	0,034
Amônia, mMol/kg fezes na MS	132,0	162,0	148,9	7,27	26,5	0,249
Lactato, mMol/kg fezes na MS	4,59	5,61	5,86	0,24	24,45	0,100

¹ Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.

^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 10. Concentração média de algumas aminas determinadas nas fezes cães de diferentes idades.

Item ^{1,2}	GF	GA	GV	EPM ³	CV (%)	Valor P
mg/100g de fezes na MS						
Putrescina	8,68 ^b	24,39 ^a	18,97 ^{ab}	2,37	66,85	0,028
Cadaverina	4,23 ^b	28,8 ^a	15,45 ^{ab}	4,23	133,9	0,037
Histamina	0,44	2,50	2,49	0,78	241,7	0,131
Tiramina	0,54	2,32	0,80	0,48	198,7	0,170
Triptamina	0,93 ^b	4,06 ^a	1,76 ^{ab}	0,53	120,1	0,019
Espermidina	8,85	10,25	10,36	0,60	34,07	0,615
Feniletilamina	0,53	1,60	0,61	0,26	147,8	0,180
Aminas totais	23,82 ^b	73,76 ^a	49,84 ^{ab}	7,98	17,33	0,017

¹ As concentrações de Agmatina, Espermina e Serotonina encontraram-se abaixo do limite de detecção, de 0,004mg/100g.

² Valores transformados em Log para análise estatística.

³ Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.

a, b Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Na Tabela 11 são apresentados os resultados das concentrações de fenois e indóis. Dentre os metilindóis avaliados, o GV apresentou maiores concentrações de 2-metilindol ($P=0,009$) que o GA e o GF e maiores de 2,3-metilindol ($P=0,013$) e 7-metilindol ($P=0,021$) que o GA.

5.3. Avaliações da imunidade dos animais

Foi observado efeito de grupo etário na concentração de IgA das fezes ($P=0,010$; Figura 2), expressa em mg/g de fezes na matéria seca, de $1,3 \pm 0,24$ para o GF, $3,06 \pm 0,45$ para o GA e $2,93 \pm 0,6$ para GV. Os parâmetros eritroleucométricos avaliados (Tabela 12) apresentaram-se dentro dos valores de referência referidos por Schultze (2010). Observou-se que o GF apresentou maior número de linfócitos ($P=0,003$), leucócitos ($P = 0,037$) e menor de eosinófilos ($P=0,012$) que GA e GV, além de tendência a maior número de monócitos ($P=0,051$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos para os demais parâmetros avaliados ($P>0,05$).

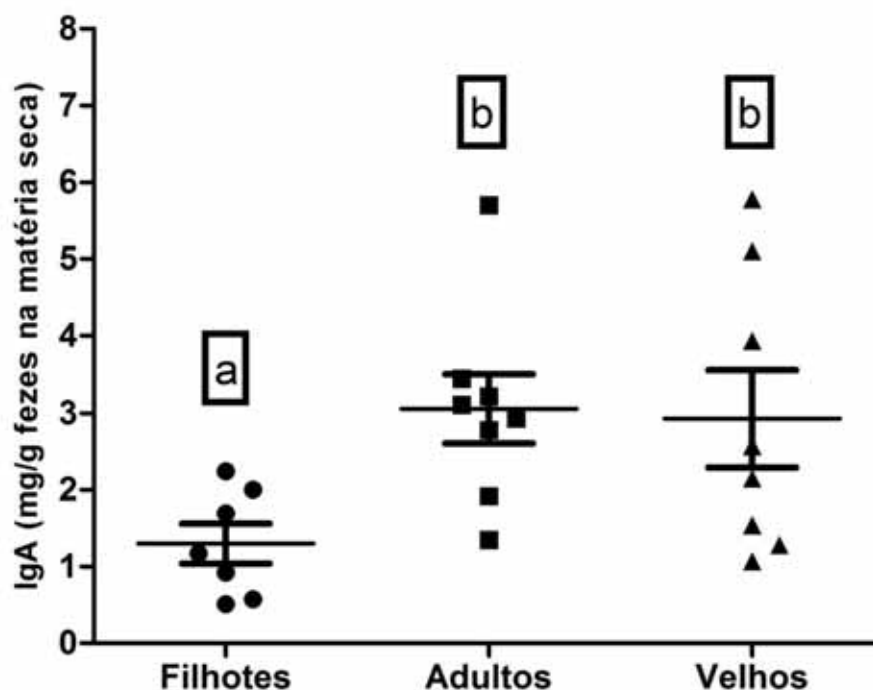


Figura 2. Concentrações de imunoglobulina A nas fezes de cães de diferentes idades. ^{a, b} Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 11. Concentração de fenol e indóis nas fezes de cães de diferentes idades.

Item	GF	GA	GV	EPM ¹	CV (%)	Valor P
	µg / g de fezes na MS					
Fenol ²	38,8	77,9	68,3	8,17	72,53	0,200
Indol	250,7	299,6	309,1	14,28	26,68	0,205
2-metilindol	10,2 ^b	10,2 ^b	16,3 ^a	0,85	38,11	0,009
3-metilindol	65,1	47,2	70,8	4,96	44,53	0,148
2.3-metilindol	13,5 ^{ab}	11,0 ^b	20,9 ^a	1,31	47,55	0,013
7-metilindol	12,1 ^{ab}	10,4 ^b	20,8 ^a	1,41	53,17	0,021

¹ Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.

² Valores transformados em Log para análise estatística.

a, b Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Tabela 12. Parâmetros eritroleucométricos e plaquetários de cães de diferentes idades. Valores absolutos médios.

Item	GF	GA	GV	EPM ¹	CV (%)	Valor P
Hemácias, céls x10 ⁶ /μL	6,5	7,1	6,6	0,13	10,62	0,128
Hemoglobina, g/dL	14,2	15,9	15,1	0,29	10,71	0,072
Hematócrito, %	43,2	45,6	44,0	0,83	10,29	0,481
Leucócitos ² , céls x10 ³ /μL	11,7 ^a	9,4 ^{ab}	8,4 ^b	0,02	14,00	0,037
Neutrófilos bastonetes ² , céls/μL	59,4	58,1	105,2	0,19	96,44	0,425
Neutrófilos segmentados ² , céls x 10 ³ /μL	6,5	7,0	5,6	0,03	4,69	0,390
Eosinófilos ² , céls/μL	105,1 ^b	322,9 ^a	222,7 ^a	207,30	55,84	0,012
Linfócitos, céls x10 ³ /μL	4,9 ^a	1,6 ^b	2,4 ^b	0,17	38,53	0,0001
Monócitos ² , céls/μL	141,1	49,5	82,0	0,18	90,40	0,051
Basófilos, céls/μL	0,0	7,9	0,0	2,63	547,72	0,381
Plaquetas, céls x 10 ³ /μL	379,9	310,0	348,9	17,20	27,21	0,268

¹ Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.² Valores transformados em Log para análise estatística^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Na Tabela 13 encontram-se os resultados da avaliação das populações linfocitárias, apresentados tanto em números absolutos (células x 10³ por microlitro de sangue) como em porcentagem conforme obtido a partir da classificação e contagem das populações no equipamento.

Os filhotes demonstraram aumento linear nas concentrações de CD5+, CD5⁺CD4⁺ e CD5⁺CD8⁺ (P<0,001) e redução linear na de CD21+ (P=0,01). Sua relação CD4:CD8 apresentou redução quadrática (P<0,001). Na contagem relativa o GF apresentou aumento quadrático de linfócitos CD5+ (P=0,006). Na comparação entre os três grupos etários, o GF apresentou maior contagem absoluta de CD5⁺ e CD21+ (P<0,001), enquanto o GA menor contagem de CD5⁺CD4⁺ (P=0,022). Na contagem relativa verificou-se menor proporção de CD5+ e maior de CD21+ para o GF (P<0,001) e maior proporção de CD4+ para o GV.

Durante a avaliação da resposta de hipersensibilidade cutânea tardia, observou-se tendência dos animais de GV apresentarem pele mais delgada (P=0,057). Nas aplicações de solução salina e fitohemaglutinina verificou-se apenas efeito de tempo, com redução progressiva das pápulas com o passar do tempo (P<0,05), sem efeito de idade ou interação entre idade e tempo. Na aplicação de vacina, observou-se interação entre grupos (idade) e período (P=0,009), tendo o GV apresentado menores pápulas de pele, ou menor reação de hipersensibilidade cutânea tardia às 48h e 72h em relação ao GF (P<0,05). Estes resultados encontram-se apresentados na Tabela 14.

Tabela 13. Populações linfocitárias médias no sangue de cães de diferentes idades. Dados apresentados em números absolutos e em contagem relativa.

Item	Filhotes, dias de vida					Contraste		Média						
	45	66	87	105	300	EPM ¹	Linear ²	Quadrático ³	GF ⁴	GA	GV	EPM ¹	CV (%)	Valor P
	céls x 10³/µL de sangue													
CD5 ⁺	2,06	3,37	3,45	2,22	2,59	0,29	<0,001	0,212		1,65 ^b	2,04 ^b	0,06	25,54	<0,001
CD5 ⁺ CD4 ⁺	0,80	1,13	1,46	0,81	0,98	0,12	0,001	0,099		0,68 ^b	1,02 ^a	0,04	32,61	0,022
CD5 ⁺ CD8 ⁺	0,18	0,90	0,58	0,44	0,45	0,12	<0,001	0,168		0,42	0,46	0,19	42,56	0,636
CD21 ⁺	1,45	1,74	1,72	1,27	1,19	0,11	0,010	0,809		0,44 ^b	0,49 ^b	0,03	28,85	<0,001
CD4 ⁺ :CD8 ⁺	4,45	1,51	2,66	2,00	2,20	0,51	0,375	<0,001		2,26	2,35	0,12	45,96	0,890
	Contagem relativa (%)													
CD5 ⁺	51,7	65,0	63,6	59,9	62,3	2,35	0,038	0,006		75,7 ^a	78,4 ^a	0,84	6,54	<0,001
CD5 ⁺ CD4 ⁺	38,1	32,3	41,2	46,0	38,5	2,23	0,449	0,2620		42,4 ^b	50,0 ^a	1,29	14,64	0,001
CD5 ⁺ CD8 ⁺	8,9	27,9	17,3	19,2	18,2	3,02	0,308	0,192		23,8	22,2	1,31	30,28	0,167
CD21 ⁺	37,9	33,8	32,2	35,1	26,6	1,88	0,842	0,839		20,3 ^b	19,1 ^b	0,88	20,06	<0,001

¹ Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.

² Efeito linear da idade;

³ Efeito quadrático da idade;

⁴ Média das cinco avaliações do grupo filhotes;

^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Tabela 14. Respostas médias de hipersensibilidade cutânea tardia de cães de diferentes idades

Item	GF	GA	GV	Média	EPM ¹	Valor P
Espessura da pele (mm)						
SOLUÇÃO SALINA						
0 hora	3,10	3,16	2,83	3,03 ^A	0,08	-
24 horas	2,36	2,54	2,52	2,48 ^B	0,09	-
48 horas	2,50	2,53	2,36	2,46 ^B	0,08	-
72 horas	2,54	2,46	2,39	2,46 ^B	0,08	-
Média	2,67	2,67	2,48	-	-	0,057
EPM ¹	0,07	0,09	0,08	-	-	-
Valor P	-	-	-	<0,01	-	-
FHG²						
0 hora	2,86	2,81	2,63	2,77 ^A	0,09	-
24 horas	2,65	2,70	2,46	2,60 ^B	0,09	-
48 horas	2,49	2,47	2,22	2,39 ^C	0,09	-
72 horas	2,41	2,26	2,05	2,24 ^D	0,09	-
Média	2,60	2,56	2,36	-	-	0,388
EPM ¹	0,05	0,08	0,10	-	-	-
Valor P	-	-	-	0,008	-	-
VACINA³						
0 hora	3,41	3,42	3,52	3,45	0,08	1,000
24 horas	3,37	3,63	3,50	3,50	0,09	0,967
48 horas	3,77 ^a	3,38 ^{ab}	3,33 ^b	3,49	0,10	0,034
72 horas	3,61 ^a	3,24 ^{ab}	3,12 ^b	3,34	0,10	0,031
Média	3,54	3,42	3,38	-	-	-
EPM ¹	0,08	0,06	0,09	-	-	-
Valor P	0,289	0,896	0,474	-	-	-

¹ Erro padrão da média, n=10 por grupo etário.

² Fito hemaglutinina 0,5 g/L - Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil

³ Duramune Max - 5CvK/4L - Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, Brasil.

^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

A, B, C, D Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). Comparação válida para uma mesma variável.

5.4. Análise histológica do estômago e intestinos delgado e grosso

O número de fragmentos coletados da mucosa do trato gastrointestinal e a avaliação de sua adequação ao exame histológico encontram-se na Tabela 15. De maneira geral, 95,1% das lâminas produzidas para a avaliação histológica do TGI do GV e 87,7% das do GF encontravam-se adequadas para análise. Entretanto, para o GA 56,2% apresentaram-se adequadas, porém com artefatos e o restante (43,8%) inadequado para análise histológica, devido a problemas durante o processamento e preparo dos fragmentos.

A avaliação histológica da mucosa fúndica gástrica do GF estava dentro do padrão de histologia e observaram-se folículos linfóides em (total alterado/total analisado) 3/10 (30%), hiperplasia do folículo linfóide em 1/10 (10%). Quanto à mucosa duodenal as vilosidades se caracterizaram por serem afiladas na extremidade e com relação vilo:cripta variando de 3:1 a 4:1. Em nenhum caso foi observado processo inflamatório. A mucosa do íleo também estava dentro do padrão de histologia com relação vilo:cripta de 3:1. Os segmentos da válvula íleo-cecal examinados estavam dentro do padrão de histologia e foram analisados em 5/8 a mucosa do cólon e em 3/8 a mucosa de intestino delgado. A mucosa do cólon estava dentro do padrão de histologia. A Figura 3 ilustra os aspectos histológicos da mucosa do TGI do GF.

A avaliação histológica da mucosa fúndica gástrica do GA estava dentro do padrão de histologia. Quanto à mucosa duodenal em dois cães foi diagnosticado enterite discreta linfoplasmocítica sem alteração da morfologia das vilosidades e criptas intestinais. A mucosa do íleo também estava dentro do padrão de histologia com relação vilo:cripta de 3:1. Os segmentos da válvula íleo-cecal examinados estavam dentro do padrão de histologia. A mucosa do cólon também estava dentro do padrão de histologia. Em relação ao GV, a avaliação histológica da mucosa fúndica gástrica revelou em 6/11 (54,5%) gastrite leve linfoplasmocitária e foram observadas estruturas espiraladas que correspondem a *Helicobacter* spp. em 2/11 (18,2%). Quanto à mucosa duodenal foi diagnosticado enterite discreta linfoplasmocítica sem alteração da morfologia das vilosidades e criptas em 8/11 (72,7%). No segmento do íleo foi diagnosticado enterite em 2/9 (22,2%) e colite discreta linfoplasmocítica em 3/10 (30%) dos segmentos da válvula íleo-cecal

examinados. Em cinco cães foi diagnosticado colite linfoplasmocítica, sendo esta em 4/11 (36,4%) considerada discreta e em 1/11 (9,1%) moderada. A Figura 4 ilustra os aspectos histológicos da mucosa do TGI do GV.

Em relação às análises semiquantitativas dos fragmentos (vilo:cripta, morfologia dos vilos, características do epitélio superficial, intensidade da hiperplasia da cripta, dilatação da cripta, grau de ocorrência das células caliciformes, frequência e grau de intensidade de diferentes tipos de células inflamatórias na lâmina própria, número de linfócitos intraepiteliais e presença de erosão, ulceração, edema, fibrose e atrofia das criptas), foram verificadas diferenças entre grupos para a presença de linfócitos intraepiteliais e infiltrado de linfócitos e plasmócitos. Estes dois parâmetros ocorreram de maneira discreta e às vezes moderada na mucosa do estômago e duodeno de boa parte dos cães do GV e não estiveram presentes no GA e GF, mas não foram verificados na mucosa do estômago e apenas em cães isolados na do duodeno de cães do GA e GF ($P < 0,05$). Linfócitos intraepiteliais ($P = 0,009$) e infiltrado de linfócitos e plasmócitos ($P = 0,029$) ocorreram também apenas na mucosa do duodeno, íleo e do cólon, respectivamente, de cães do GV. Não foi verificada diferença estatística em relação à mucosa da válvula íleo-cecal ($P > 0,05$).

Os resultados completos da análise histológica dos fragmentos de estômago, duodeno, íleo, cólon e válvula íleo-cecal encontram-se nos Apêndices C a H.

Tabela 15. Número de fragmentos coletados e adequação dos mesmos ao exame histológico da mucosa do trato gastrintestinal de cães de diferentes idades.

Item	Filhotes	Adultos	Velhos
Estômago	42	28	44
Duodeno	82	69	89
Íleo	25	16	17
Válvula íleo-cecal	8	6	12
Cólon	87	66	84
Total	244	185	246
Adequação dos fragmentos ¹			
Grau 0	0	43,8%	0
Grau 1	12,3%	56,2%	4,9%
Grau 2	87,7%	0	95,1%

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

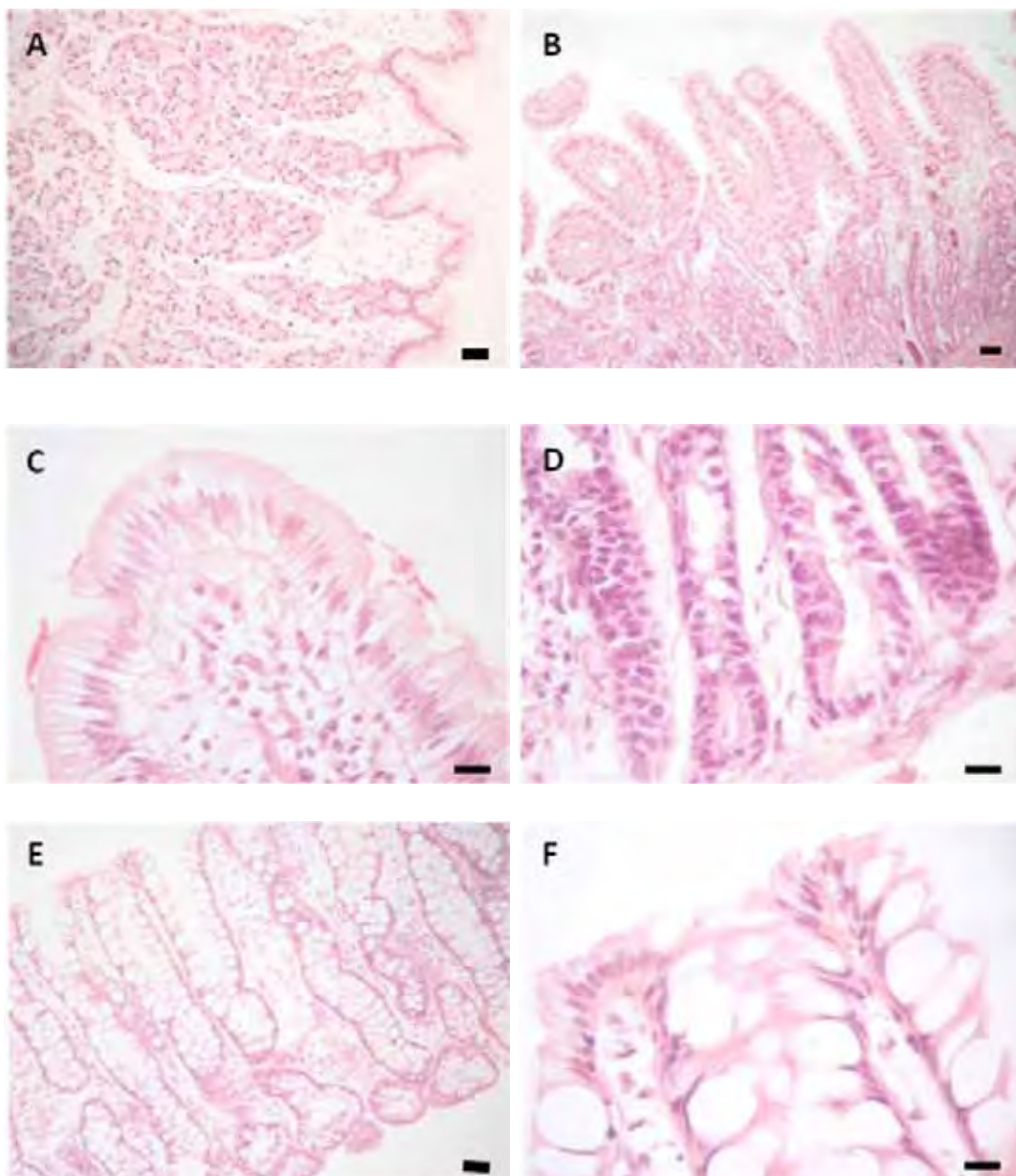


Figura 3. Fotomicrografias da mucosa do trato gastrintestinal do GF. (A) Estômago, mucosa fúndica. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra= 10µm; (B) Intestino delgado, mucosa duodenal. Observe a relação vilosidade: cripta de 3:1. Vilosidades afiladas na extremidade. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra= 50µm; (C) Intestino delgado, vilosidade. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra= 10µm; (D) Intestino delgado, criptas. Notar monocamada de células basofílicas. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 10µm; (E) Intestino grosso, cólon. Observe criptas paralelas e com células caliciformes. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 10µm; (F) Intestino grosso, cólon. Superfície epitelial das criptas com predomínio de células caliciformes. Dentro do padrão de normalidade. HE, barra = 10µm.

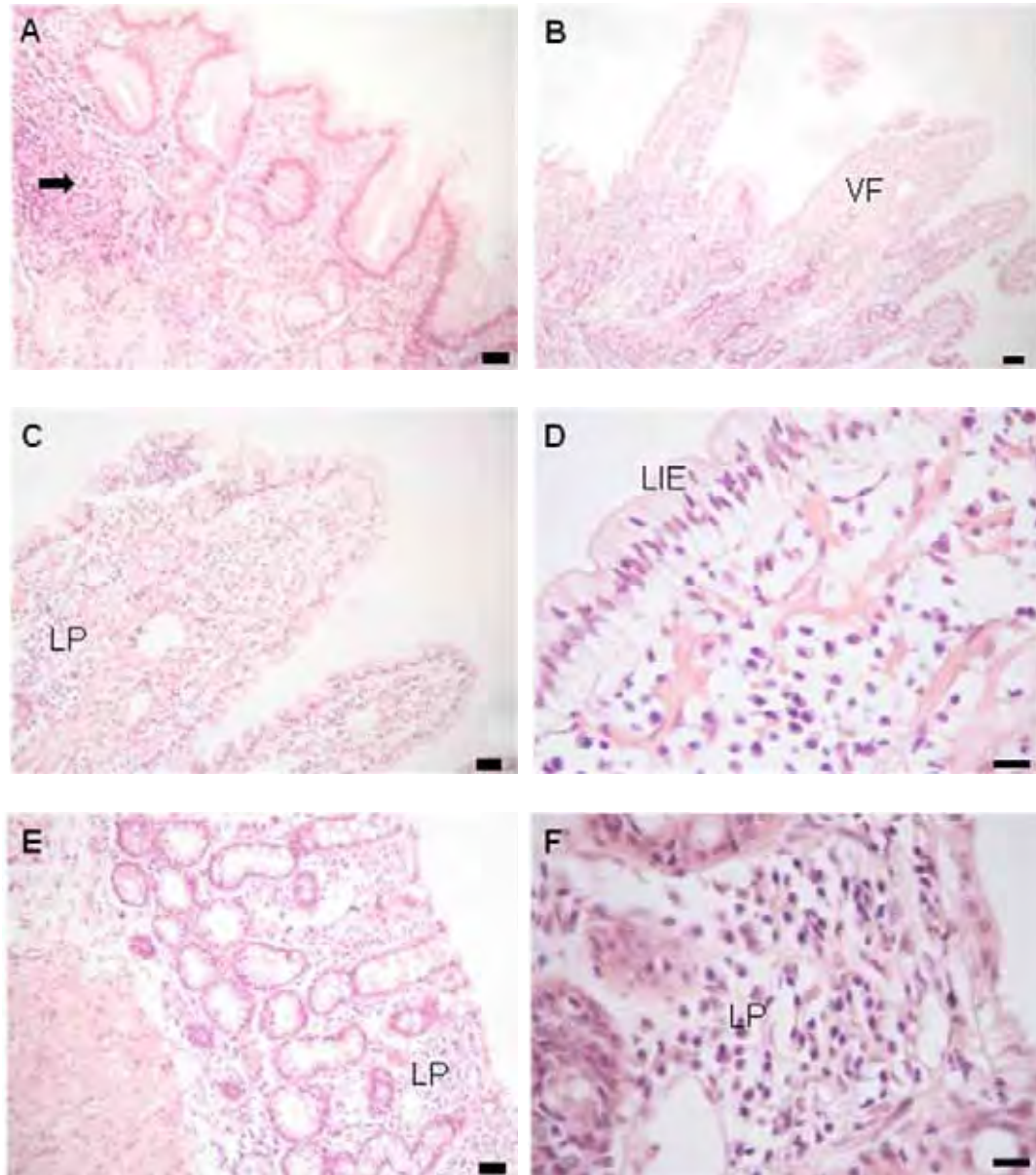


Figura 4. Fotomicrografias da mucosa do trato gastrointestinal do GV. (A) Estômago, mucosa fúndica. Gastrite linfoplasmocítica discreta (seta). HE, barra = 10 μ m; (B) Intestino delgado, mucosa duodenal. Enterite linfoplasmocítica discreta. Observe a fusão de vilosidades (VF). HE, barra = 50 μ m; (C) Intestino delgado, vilosidade. Observe infiltrado na lamina própria (LP), enterite linfoplasmocítica. HE, barra = 10 μ m; (D) Intestino delgado, vilosidade. Notar infiltrado na LP e linfócitos intraepiteliais (LIE). HE, barra = 10 μ m; (E) Intestino grosso, cólon. Observe infiltrado na LP e criptas tortuosas. Colite linfoplasmocítica moderada. HE, barra = 10 μ m; (F) Intestino grosso, cólon. Superfície epitelial das criptas com redução das células caliciformes e infiltrado na LP. Colite linfoplasmocítica moderada. HE, barra = 10 μ m.

6. DISCUSSÃO

Com o objetivo de levantar subsídios para o entendimento dos efeitos do envelhecimento no trato gastrointestinal, este estudo comparou cães saudáveis de três grupos etários quanto à população microbiana fecal, alguns dos produtos de fermentação bacteriana intestinal, alguns aspectos imunes e parâmetros histológicos do trato gastrointestinal.

A maior contagem de *Bifidobacterium* e bactérias do Cluster IV no GF indica maior ocorrência de bactérias benéficas, cujos produtos de fermentação contribuem para a saúde do trato gastrointestinal (SUCHODOLSKI, 2011). Para comparar estes achados, foram localizados somente outros dois estudos com cães filhotes. O primeiro estudo localizado (BENNO et al., 1992) empregou o método de cultivo em meio seletivo, obtendo resultados que corroboram parcialmente com os do presente estudo. Os autores observaram que cães com idade inferior a 12 meses apresentaram maior número de bacteroides, eubacteria, peptostreptococos, bifidobactéria, lactobacilos e estafilococos em relação a animais com idade superior a 11 anos. Na comparação com o presente estudo, lactobacilos e bacteroides não diferiram no GF e peptostreptococos não constou dos primers aqui empregados. Os animais com mais de 11 anos no estudo de Benno et al. (1992) apresentaram, ainda, maior número de clostridia lecitinase positivos e bacilos, o que também não foi verificado na presente pesquisa. O segundo estudo localizado (KEARNS; SUNVOLD, 1998) também comparou cães com idade inferior a 12 meses com animais de idade superior a 11 anos, obtendo resultados praticamente opostos aos de Benno et al. (1992) e do presente estudo. Os autores verificaram que os animais mais velhos apresentaram em geral maiores contagens de bactérias pelo método de cultivo em agar seletivo, obtendo 24% a mais de bactérias aeróbias, 41% a mais de anaeróbias, 341% a mais de bactérias do gênero *Clostridium*, 118% a mais de lactobacilos, 31% a mais bacteroides e 44% a mais de eubactérias, além de 18% menos de enterobactérias que o grupo de filhotes.

Verifica-se que os dados disponíveis na literatura referentes à composição da microbiota de cães são contraditórios, escassos e têm como foco mais frequente a determinação da composição da microbiota de cães adultos saudáveis e a avaliação

dos efeitos da dieta ou ingredientes específicos (STRICKLING et al., 2000; GREETHAM et al., 2002; SWANSON et al., 2002; FLICKINGER et al., 2003; VANHOUTTE et al., 2005; MIDDELBOSS et al., 2007; GRØNVOLD et al., 2009; MIDDELBOSS et al., 2010; KORE; PATIL; PHONBADA, 2010; SUCHODOLSKI, 2011; HOODA et al., 2012). Os métodos de estudo empregados são também muito variáveis, moleculares ou não moleculares, dificultando a comparação dos achados.

Ao se investigar as pesquisas disponíveis para outras espécies cujo foco tenha sido avaliar o impacto da idade sobre a microbiota do TGI, o maior número de estudos com dados relativamente mais consistentes relaciona-se à espécie humana. Hopkins, Sharp e Macfarlane (2002) estudaram a microbiota fecal de crianças (16 meses a sete anos), adultos (21 a 34 anos) e idosos (67 a 88 anos) e observaram, através da pesquisa do 16S rRNA, que crianças apresentaram em maior número os grupos de enterobactérias, bifidobactérias e bacteroides que adultos e idosos, indicando ainda menor complexidade (menor número de espécies dentro de cada gênero) de sua microbiota. Pelo método de cultivo em Agar seletivo observaram, ainda, que crianças apresentaram menor número de enterobactérias. Estes resultados são similares, em parte, aos do presente estudo. Em estudo mais recente, Mariat et al. (2009) verificaram que bebês (três semanas a 10 meses) apresentam menor quantidade total de microrganismos e que estes apresentaram maior proporção (embora com menor contagem absoluta) de *Bifidobacterium* spp. e Cluster IV e menor de *E. coli* que adultos (25 a 45 anos) e idosos (70 a 90 anos). A comparação destes dados com os do presente estudo, no entanto, requer ressalvas por tratarem de bebês lactentes. A comparação dos adultos com idosos revelou para os últimos menor contagem de Cluster IV, Cluster XIVa e *E. Coli*.

No presente estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos GA e GV. Estes achados corroboram os de Gomes et al. (2011) que pelo método de cultivo em agar seletivo também não verificaram diferenças na microbiota de cães idosos ($10 \pm 0,02$ anos) e adultos ($4 \pm 0,01$ anos) o que sugere estabilidade da microbiota em cães beagles após a fase de crescimento. Fato semelhante foi observado por Enck et al. (2008) ao avaliarem amostras de fezes de 15.619 pessoas adultas saudáveis (idade média 46,3 anos, mínima 18 anos e máxima 96 anos; homens:mulheres = 4197:11422). Por cultivo em meio seletivo, não observaram

efeito da idade ou gênero da contagem de bactérias das fezes. Em estudo com cães, Simpson et al. (2002), ao avaliarem o efeito da dieta, idade e raça em 18 cães igualmente distribuídos quanto a raça (pastor alemão, setter inglês e schnauzer miniatura); idade: animais adultos ($2,5 \pm 0,5$ anos) e velhos ($10,9 \pm 0,7$ anos); e alimentados com dieta controle ou dieta com alta fibra (adição de 5% de polpa de beterraba e 5% de casca de soja em substituição a 10% de amido milho da dieta controle) não observaram variações na diversidade bacteriana pelo método de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*). O DGGE é um método molecular que gera padrão de bandas que ilustram a diversidade bacteriana presente na amostra, sendo possível através dessa técnica somente capturar alterações nos grupos predominantes de bactérias dentro da comunidade intestinal. Estes autores observaram que os animais apresentaram tendência a se agruparem conforme idade ou raça (raças grandes ou pequenas), mas essas variações foram atribuídas principalmente a variações individuais. A principal conclusão referente a esta análise feita pelos autores é que cães apresentam padrão de banda individual, único e estável. Esta estabilidade e individualidade dos padrões indica que cada indivíduo abriga uma comunidade bacteriana própria e independente da dieta testada. Ao avaliarem a microbiota por cultivo em agar seletivo, Simpson et al. (2002) observaram que os animais mais velhos apresentaram menor número de *Bacteroides* spp. que os adultos, sem diferenças significativas para os demais grupos bacterianos estudados. Estes resultados divergem dos encontrados no presente estudo.

Revisão realizada por Woodmansey (2007) sobre os efeitos do envelhecimento sobre as bactérias intestinais aponta que as contagens de anaeróbios totais nas fezes permanecem relativamente estáveis na população senil e a principal alteração observada consiste na mudança das espécies dominantes. Descreve ainda que pessoas idosas saudáveis apresentam aumento no número de anaeróbios facultativos (como estafilococos, estreptococos e leveduras), fusobactérias, clostridia e eubactérias e diminuição tanto no número como na diversidade de bacteroides e bifidobactérias, além de diminuição na atividade amilolítica da microbiota.

Fica evidente que dados referentes às alterações na composição da microbiota são complexos e variáveis. Inclusive aspectos geográficos, como local de estudo e de vida da população estudada influem nos resultados encontrados (LAY et al., 2005; TIIHONEN; OUWEHAND; RAUTONEN, 2010). Para cães os estudos são ainda poucos e inconsistentes e, considerando-se os diversos fatores que podem afetar a composição da microbiota, a comparação feita com resultados de estudos em outras espécies, como a humana, pode não ser adequada. Sendo assim, são necessários mais estudos em cães para se identificar ou descartar possíveis influências geográficas, de métodos de estudo da microbiota, da dieta, de raça, dentre outros e buscar-se consenso a respeito das alterações da microbiota ao longo da vida.

No conjunto dos resultados, verificou-se menor concentração de AGCC, ácido valérico e maior pH nas fezes dos cães do GV, indicando menor atividade sacarolítica da microbiota intestinal. Em geral, estes parâmetros tenderam a ser mais elevados nas fezes dos cães do GF, que apresentou também menor pH, sugerindo aumento da atividade sacarolítica. Estes resultados são divergentes dos obtidos por Kuzmuk et al. (2005), que observaram aumento na concentração fecal de butirato ($P=0,02$), valerato ($P=0,05$) e isovalerato ($P<0,01$) em animais com idade superior a 11 anos, quando comparado a animais com idade inferior a 12 meses, mas concordam com os achados de Gomes et al. (2011) que encontraram maior pH e menor concentração de butirato nas fezes de cães idosos ($10\pm 0,02$ anos) em comparação a adultos ($4\pm 0,01$ anos). Não foram encontrados outros estudos em cães para a discussão dos resultados. Woodmansey et al. (2004) observaram que pessoas adultas e idosas saudáveis apresentaram, de maneira geral, concentrações fecais de ácidos de fermentação (AGCC e AGCR) semelhantes, com apenas pequenas reduções na concentração de acetato, butirato e valerato, bem como dos ácidos graxos voláteis totais nos indivíduos de mais idade.

Segundo Macfarlane e Macfarlane (2003), a maioria dos AGCC são derivados da degradação bacteriana de carboidratos complexos e sua formação ocorre principalmente no intestino proximal. À medida que os resíduos alimentares passam através do intestino, estes se reduzem em quantidade e inicia-se a degradação de proteínas e peptídeos, o que também contribui para aumentar a produção de AGCC.

Os principais gêneros descritos que se destacam na produção de AGCC são *Clostridium* cluster XIVa, *Prevotella* spp., *Faecalibacterium* spp. e *Bifidobacterium* spp (SUCHODOLSKI, 2011). Louis et al. (2007) fizeram detalhamento das bactérias envolvidas na produção de cada um dos principais AGCC. Atribuíram aos *Bacteroides* e ao Clostridial Cluster IX a maior produção de propionato e ao Cluster IV e XIVa a maior produção de butirato, enquanto o acetato é formado por diversos grupos de bactérias (Clostridial Clusters IV, XIVa, XIVb, XVI, *Bifidobacterium* spp. e o grupo *Bacteroides-Prevotella*). Estudos *in vitro* demonstram que bactérias do par de primers Cluster IV crescem melhor em pH próximo a 5,5 e nestas condições produzem predominantemente butirato. Quando o pH se eleva a 6,6 a população destas bactérias diminuem, com predomínio de *Bacteroides* spp e maior produção de propionato (WALKER et al., 2005). Assim, mudanças no pH são capazes de alterar e/ou são induzidas por alterações na composição ou atividade da microbiota no cólon, fato este observado no presente estudo, uma vez que o GV apresentou menores contagens de bactérias pertencentes ao grupo do *Clostridium leptum* (Cluster IV), menor concentração de todos os AGCC e maior pH fecal.

Em relação aos AGCR, a maior concentração de valerato nas fezes dos cães do GF indica maior catabolismo microbiano do aminoácido isoleucina, sugerindo atividade proteolítica. No GV, foi verificado aumento da proporção de isovalerato, resultante do catabolismo microbiano de leucina, mas este não foi acompanhado por elevação na quantidade deste AGCR. Assim, pode-se supor que este aumento proporcional seja decorrente da redução de AGV totais no GV, e não oriundo de aumento na sua formação. Nem todas as concentrações de derivados da ação de microrganismos sobre proteínas seguiram o mesmo sentido, pois as concentrações das aminas putrescina, cadaverina e triptamina e das aminas totais foram maiores nas fezes do GA e as de 2, 2.3 e 7-metilindol no GV, sendo menores no GF. Os compostos fenólicos são formados a partir da degradação bacteriana de aminoácidos aromáticos, sendo a tirosina e o triptofano os principais substratos dessa degradação, gerando fenóis e indóis, respectivamente. Assim, as concentrações aumentadas de alguns indóis nas fezes dos cães do GV indicam fermentação de proteína no intestino grosso. Em seres humanos, informações disponíveis na literatura científica indicam que indivíduos idosos apresentam maior

atividade proteolítica bacteriana (WOODMANSEY, 2007; TIIHONEN, OUWEHAN e RAUTONEN, 2010).

Levando-se em consideração que fenóis e indóis têm potencial para interagir com outros compostos putrefativos no intestino, potencializando suas ações carcinogênicas por atuarem como cocarcinógenos (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991) o aumento de sua concentração não é desejável. No entanto, apesar de estar associado no homem a estados mórbidos como a esquizofrenia, muito pouco se sabe sobre as ações destes compostos especialmente em cães (SMITH; MACFARLANE, 1996). A produção destes compostos parece ser inibida em pH 5,5, bem como em presença de carboidratos fermentáveis. Sua formação é energeticamente ineficiente e demorada e ocorre predominantemente nos segmentos distais do cólon (SMITH; MACFARLANE, 1996). Assim, seria importante a realização de novos estudos para se confirmar se cães idosos realmente apresentam aumento da formação intestinal destes compostos e quais poderiam ser suas reais implicações à saúde destes animais.

As concentrações de amônia e lactato das fezes não diferiram entre grupos. Sabe-se que a desaminação de aminoácidos de proteína endógena ou dietética consistem a principal fonte de amônia no cólon (MACFARLANE et al., 1992; WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001). Esta é encontrada apenas em pequenas quantidades no intestino grosso saudável (WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001). A amônia produzida no cólon passa através da parede do intestino e alcança outros tecidos do corpo. Em altas concentrações, ela pode ocasionar redução da altura dos vilos intestinais (WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001). Conforme descrito por Louis et al. (2007), diversas espécies bacterianas, incluindo *Eubacterium hallii* e *Anaerostipes caccae*, com capacidade de converter o lactato em acetato e butirato têm sido isoladas a partir de amostras fecais humanas. A presença destas bactérias pode ajudar a explicar o fato de que o lactato não se acumula no cólon de indivíduos saudáveis, ainda que uma proporção significativa de bactérias do cólon possa produzir este ácido. Bactérias produtoras de propionato, pertencentes ao Clostridial Cluster IX, também contribuem para a utilização do lactato no intestino grosso e, além disso, o lactato é um cosubstrato preferido para as bactérias redutoras de sulfato (GIBSON et al., 1990).

Recentemente, foi também demonstrado *in vitro* que o lactato pode ser convertido em butirato e propionato (BOURRIAUD et al., 2005).

Os achados referentes às concentrações fecais de aminas são difíceis de serem interpretados no momento, devido ao reduzido número de trabalhos que as estudaram em cães (GOMES et al., 2011). A principal via pela qual as bactérias produzem aminas é pela descarboxilação de aminoácidos. A cadaverina é formada a partir da descarboxilação da lisina, a putrescina a partir da ornitina e a triptamina tem origem na fermentação do triptofano. Espécies pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides* são as que produzem aminas em maiores quantidades (ALLISON; MACFARLANE, 1989). As alterações encontradas nas concentrações de bactérias no presente estudo não explicam as diferenças entre os grupos etários nas concentrações de aminas das fezes, uma vez que estas bactérias foram mais predominantes no GF, enquanto a concentração de amina maior no GA.

Diferenças na capacidade de digestão e absorção de proteínas no intestino delgado, o que permitiria maior aporte deste substrato ao cólon para ser degradado pela microbiota, poderia ser outro fator implicado nas diferentes concentrações de aminas nas fezes. Apesar dos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes não terem sido avaliados no presente estudo, diversos autores demonstram que após a fase de crescimento não há efeito da idade sobre estes parâmetros (SHEFFY et al., 1985; GOMES et al., 2011). Filhotes de cães, no entanto têm digestibilidade mais baixa de proteína do que os cães adultos, devido a reduzida secreção de pepsina no estômago (FAHEY; BARRY; SWANSON, 2008). Dessa forma, a alteração esperada para o GF, se relacionadas à menor digestibilidade da proteína e aminoácidos, seria o aumento da concentração fecal de aminas, ou mesmo de amônia, indóis e fenóis, o que não ocorreu.

As implicações da presença de aminas no intestino são, também, ainda pouco conhecidas, o que é complicado pelo fato das diferentes aminas apresentarem ações distintas. As aminas biogênicas (putrescina, serotonina, cadaverina, histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e agmatina) são componentes endógenos e indispensáveis às células vivas, fundamentais para a proliferação e diferenciação celular, regulação das funções do núcleo, síntese de proteínas, desenvolvimento cerebral, regulação e crescimento do sistema nervoso (SANTOS,

1996; SAAID et al., 2009). Putrescina, espermidina e espermina são compostos indispensáveis ao metabolismo celular, sendo solicitadas em grandes quantidades pelos tecidos em crescimento acelerado, como a mucosa do TGI, uma vez que estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e proteínas (HUGHES; MAGEE; BINGHAM, 2000; BARRY et al., 2009). Aminas como a cadaverina indicam putrefação e podem ser prejudiciais a saúde intestinal (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991), mas sua concentração é importante para sua ação, pois em baixas concentrações esta amina é essencial para o crescimento normal e diferenciação de células, mas em maiores quantidades a cadaverina é prejudicial a seres humanos e animais (FUSI et al., 2004). Espermina e espermidina, assim como putrescina e cadaverina, são também eficientes sequestradoras de radicais livres em numerosos sistemas enzimáticos, químicos e *in vitro* podem inibir peroxidação de lipídeos e prevenir a senescência (BARDÓCZ et al., 1995).

Os mamíferos possuem sistema de desintoxicação relativamente eficiente, capaz de metabolizar a ingestão diária normal de aminas biogênicas presentes em alimentos. Nos seres humanos, em condições normais de saúde, as aminas absorvidas dos alimentos ou formadas pelas bactérias intestinais são rapidamente convertidas em produtos de degradação fisiologicamente inativos pela ação das amino oxidases ou por conjugação. Entretanto, as aminas cadaverina, putrescina e triptamina são inibidoras da diamino-oxidase (GOUVEIA, 2009) o que pode potencializar o efeito tóxico da histamina (SABAINI, 2009) e permitir a ação deletéria que advém da presença de altas concentrações destes compostos.

Dentro deste contexto, fica difícil se especular sobre as implicações do aumento ou diminuição das concentrações de aminas nas fezes dos cães. Concentração aumentada, como no GA, pode estar dentro do fisiológico, enquanto a diminuição destes compostos pode restringir certas funções celulares, da mesma forma que o contrário pode vir a ser considerado. Estudo anterior (GOMES et al., 2011) verificou em animais idosos ($10 \pm 0,02$ anos) menores concentrações de agmatina, espermina e histamina em comparação a cães adultos ($4 \pm 0,01$ anos). Apesar das aminas serem diferentes, no presente estudo, o GV tendeu a apresentar também menores quantidades de aminas totais, o que pode vir a ter algum significado fisiológico que mereceria ser estudado.

Dentre os parâmetros imunes avaliados, observou-se diferença significativa entre os grupos na concentração fecal de IgA. O único estudo encontrado que avaliou o efeito da idade na concentração fecal de IgA em cães foi realizado por nosso grupo de pesquisa (ZAINÉ et al., 2011), tendo sido verificado que cães com cinco meses apresentaram menores concentrações desta imunoglobulina nas fezes ($0,32 \pm 0,05$ mg IgA/g fezes na MS) do que cães adultos ($2,34 \pm 0,44$ mg IgA/g fezes na MS). Na presente pesquisa, os mesmos filhotes do estudo anterior apresentavam 10 meses, sua concentração de IgA foi de $1,3 \pm 0,24$ mg/g fezes na MS e ainda diferente ao dos animais adultos e idosos. Estes dois estudos, quando observados conjuntamente, corroboram a descrição de HogenEsch et al. (2004), Blount, Pritchard e Heaton (2005) e Ogra (2010), para as IgA salivar e sérica. Estes autores verificaram que com o amadurecimento dos cães ocorre aumento da secreção de IgA. Entretanto, comparações feitas com a IgA sérica devem ser avaliadas com ressalvas uma vez que esta não é um bom indicativo do conteúdo de IgA secretora (ZAINÉ et al., 2011). Estudo em seres humanos apontou que crianças têm poucas células IgA+ no intestino e à medida que envelhecem há aumento no número destas células (ROGNUN et al., 1992).

Em relação aos resultados de hematometria, Jain (1993) já havia verificado que os índices da série vermelha de cães atingem os valores normais de animais adultos por volta dos 2 a 3 meses de vida, justificando a ausência de diferenças entre o GF e os demais grupos etários no presente estudo. Lowseth et al. (1990) também não encontraram alterações significativas nos parâmetros hematológicos de cães beagle entre 3 e 14 anos, corroborando a ausência de diferenças no GV. Os teores de hemoglobina tenderam a ser menores no GF ($P=0,072$), o que encontra respaldo nos estudos de Vajdovich et al. (1997), que observaram menor concentração de hemoglobina em cães beagle com idade inferior a um ano, comparado a cães com idade superior a nove e de Strasser et al. (1993), que relataram que cães jovens apresentaram diminuição da hemoglobina e hematócrito comparado com cães seniors. Swanson et al. (2004) acompanharam durante 12 meses um grupo de 24 animais, sendo 12 filhotes com oito semanas e 12 seniores com 11 anos. Observaram que na avaliação basal havia marcado efeito da idade nos parâmetros hematológicos avaliados, mas com o avanço cronológico, os valores

do grupo de animais desmamados foi se aproximando aos do grupo de cães velhos e aos valores de referência para a espécie. A avaliação hematológica dos cães idosos permaneceu relativamente estável e dentro da faixa de referência durante todo o experimento. Conforme discutido por estes autores, menores concentrações de hemácias e hemoglobina são comuns em cães jovens porque a hemácia tem vida mais curta em cães jovens e hemácias jovens contêm menos hemoglobina que hemácias velhas.

O maior número de linfócitos e menor de eosinófilos no GF já havia sido demonstrado por Jain (1993), que também descreveu que cães filhotes têm maior contagem de linfócitos e que estes decrescem com o avançar da idade, ocorrendo o oposto com os eosinófilos. Esta maior contagem de linfócitos no GF incluiu maiores quantidades das subpopulações CD5⁺, CD4⁺ e CD21⁺. Blount, Pritchard e Heaton (2005), comparando cães de dois anos, quatro anos, seis anos e 10 anos, já haviam observado que os animais mais jovens apresentam maior número de células, considerando todas as subpopulações avaliadas, em comparação aos demais grupos. No presente estudo, no entanto, linfócitos CD8⁺ foram semelhantes entre grupos etários e apenas o GA apresentou menos linfócitos CD4⁺ que o GF. Aqueles autores também observaram, à semelhança do presente estudo, que a proporção relativa de linfócitos CD5⁺ foi menor nos animais mais jovens. O GF, no presente estudo também apresentou menor proporção de linfócitos CD21⁺, apesar de sua concentração absoluta ter diminuído linearmente do dia 45 ao dia 300.

Em estudo longitudinal recentemente publicado por Villaescusa et al. (2012), foram avaliadas as populações linfocitárias de filhotes de cães beagle entre sete e 15 meses de idade, tendo como grupo controle cães adultos com idade inicial de 4,7 anos. Estes pesquisadores observaram durante este período de vida dos filhotes diminuição na contagem absoluta de linfócitos totais, linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD21⁺ e redução significativa da porcentagem de células CD4⁺ e na relação CD4⁺:CD8⁺ e aumento na porcentagem de células CD8⁺. Verificaram que embora estas populações linfocitárias tenham sido diferentes entre os cães com sete meses e 4,7 anos, ou seja, no início do estudo, diferenças não foram observadas quando os cães alcançaram os 15 meses de idade. No presente estudo, dos 45 dias aos 300 dias de vida, verificou-se também redução em linfócitos CD21⁺ e na relação

CD4+:CD8+, mas, de maneira contrária, aumentos nas contagens de linfócitos CD5+, CD4+ e CD8+. Estas diferenças de resultados podem ser decorrentes do fato dos cães no presente estudo serem mais novos que os comparados por Villaescusa et al. (2012) – e animais mais novos apresentarem maior número de linfócitos (JAIN, 1993; SCHULTZE, 2010) – e pelos animais terem recebido estímulo antigênico por meio de vacina nos dias 45, 66, 87 e 105. Sabe-se que após a diferenciação primária no timo e medula óssea, os linfócitos passam por maturação funcional em sangue periférico. Esta maturação é influenciada diretamente pelos encontros com diferentes antígenos ambientais, ocorrendo desde o nascimento e pode se refletir em mudanças na distribuição das populações linfocitárias no início da vida (deVries et al., 2000). Neste sentido, com a vacinação é esperada indução da memória imunológica pelo desenvolvimento de células B ou T de memória para se obter imunização contra antígenos específicos por período prolongado (TIZZARD, 2004).

Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (Gomes et al., 2011) verificou redução nas contagens de linfócitos CD5+, CD8+, CD21+ e manutenção nas de CD4+ em cães idosos ($10 \pm 0,02$) em relação a adultos ($4 \pm 0,01$), divergindo do verificado na presente pesquisa. Outros estudos também demonstram baixas contagens de linfócitos em cães idosos (STRASSER et al., 2000; GREELEY et al., 2001; REIS et al., 2005), apontando este declínio como característica do envelhecimento do sistema imune. O decréscimo observado nos linfócitos é atribuído à diminuição nas células CD5+ que, por sua vez, se deve principalmente a perda de células CD4+, embora linfócitos B e CD8+ também se reduzam, porém em ritmo mais lento (BLOUNT; PRITCHARD; HEATON, 2005). No entanto, dados conflitantes estão disponíveis na literatura, como Heaton et al., (2002) que ao avaliarem população de 122 labradores (idades entre seis meses e 14 anos) observaram aumento no número de células CD3+ e CD8+, apesar de também terem verificado redução no de células CD4+ e na relação CD4+:CD8+. Assim, tanto a manutenção das contagens de CD5+ como o aumento tanto absoluto como proporcional de CD4+ verificados no presente estudo no GV em relação ao GA não encontram semelhança à estudos anteriormente publicados. Fica difícil se estabelecerem hipóteses ou explicações para estas diferenças, que podem inclusive

ser decorrentes de características do grupo de cães velhos aqui empregados. Na avaliação da resposta de hipersensibilidade cutânea tardia, após 48h de aplicação da vacina o GV passou a apresentar pápula de menor espessura em comparação ao GF. Esta diminuição da resposta de hipersensibilidade em cães velhos é também apontada na revisão feita por Day (2010). Este descreve que embora a proliferação *in vitro* de células T e a resposta *in vivo* ao teste de hipersensibilidade cutânea tardia diminuam com a idade no cão, é possível que a capacidade de produzir resposta imunitária humoral primária a um novo antígeno permaneça inalterada. Segundo Labres (2009), a reação cutânea de hipersensibilidade tardia é a resposta inflamatória caracterizada por infiltrado de células mononucleares, constituídos especialmente por linfócitos T de memória, que, em presença de antígenos específicos, liberam citocinas recrutadoras de macrófagos. A resposta medida consiste em resposta inflamatória local mediada por linfócitos CD4+ que penetram no sítio da injeção do antígeno, reconhecem os complexos de peptídeos e o Complexo de Histocompatibilidade Principal da classe-II (MGC-II) nas células apresentadoras de antígenos e liberam mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular local, propiciando a formação de edema, medido com o auxílio de cutímetro ou micrômetro.

Estudos em seres humanos e ratos apontam haver aumento em uma das classes de linfócitos CD4+, os chamados linfócitos T CD4+ reguladores (Treg, com marcação CD4+CD25+) em indivíduos velhos (GREGG et al., 2005; TRZONKOWSKI et al., 2006; SIMONE; ZICCA; SAVERINO, 2008; YAN et al., 2010). Linfócitos T CD4+ reguladores são reconhecidos como importantes mediadores na regulação da resposta imune periférica e por desempenhar papel no controle de respostas auto-ímmunes e de agentes patogênicos específicos (GREGG et al., 2005), desempenhando papel crucial na manutenção da tolerância periférica (PINHEIRO et al., 2011). Apesar de limitar os danos colaterais na resposta imune contra certos microrganismos, células Treg também têm sido implicadas na patogênese de várias doenças infecciosas - quer promovendo a persistência do patógeno através da inibição de resposta efetoras anti-microrganismos ou atuando como reservatório celular do patógeno. Estes mecanismos patológicos foram demonstrados em roedores e mamíferos superiores (PINHEIRO et al., 2010). Apesar desta subclasse

não ter sido investigada no presente estudo, o seu aumento pode ser uma hipótese que justificaria a menor resposta a antígeno vacinal observada no GV.

Em relação à análise histológica da mucosa do TGI os cães do GF e GA apresentaram-se dentro do padrão de histologia. No entanto, o GV apresentou ao exame histológico alterações compatíveis com gastrite, enterite e colite, além da presença de *Helicobacter* spp. na mucosa do estômago. É importante se ressaltar que todos os cães empregados eram clinicamente saudáveis e não apresentavam nenhuma alteração ao exame físico do sistema digestório, consumo de alimentos e produção e qualidade das fezes e em seus históricos de saúde não constava nenhuma doença anterior no TGI.

Dentre os parâmetros avaliados no presente estudo, o GV não apresentou alteração na microbiota fecal em relação ao GA que pudesse explicar este aumento de inflamação no TGI. No entanto, o GV apresentou menores concentrações de ácido butírico e tendência à redução de acetato, propionato, AGV totais e aumento nas concentrações de alguns derivados da fermentação de proteínas como o isovalerato e alguns indóis. Algumas aminas biogênicas, como putrescina, cadaverina e triptamina também apresentaram tendência à redução no GV. Dentre estes compostos, o ácido butírico tem sido estudado pelo seu importante papel na nutrição da mucosa do cólon e na prevenção do câncer de cólon, por promover a diferenciação celular, controlar o ciclo celular e apoptose de colonócitos alterados; inibir a enzima histona desacetilase e diminuir a transformação de ácidos biliares primários a secundários, como resultado da acidificação do cólon. Os ácidos biliares secundários possuem atividade potencial no desenvolvimento de tumores, sendo produzidos em pH em torno de 6,0 a 6,5 (WONG et al., 2006). Para os demais produtos de fermentação estudados, muito pouca informação existe publicada. Deste modo, é possível que as alterações no perfil de produtos de fermentação intestinal do GV estejam relacionadas às alterações histológicas verificadas, podendo estas alterações ser consequentes ou desencadeantes das alterações inflamatórias e estruturais verificadas ao exame histológico.

Infelizmente não foram verificados outros estudos que tenham comparado a histologia da mucosa do TGI de cães saudáveis de diferentes idades para se comparar os resultados da presente pesquisa. No contexto de imunosenescência e

inflammageing, estas alterações na mucosa intestinal dos cães do GV, especialmente relacionadas ao maior recrutamento de células inflamatórias e imunes, parecem ser relevantes. Suas implicações no contexto das alterações do sistema imune que ocorrem nesta faixa etária merecem investigação e, especialmente, como a dieta poderia interferir neste processo, seja alterando a composição da microbiota intestinal ou os produtos de fermentação formados de modo a favorecer tanto à melhor estrutura histológica da mucosa do TGI como da resposta imune e inflamatória dos animais.

7. CONCLUSÕES

- Na presente pesquisa foi possível se verificar importantes diferenças na composição da microbiota fecal, produtos de fermentação nas fezes, parâmetros imunológicos e características histológicas da mucosa intestinal de cães de diferentes grupos etários.

- As diferenças imunes verificadas entre os grupos etários estiveram, em sua maior parte, de acordo com o descrito na literatura científica. No entanto, apesar de algumas alterações do GV estarem de acordo com outros autores, como redução da resposta de hipersensibilidade cutânea tardia, outras como a manutenção do número de células CD5+, CD8+, CD21+ e o aumento de linfócitos CD4+ estão em contradição ao descrito na maioria dos artigos, o que não pôde ser explicado e pode ser particular aos cães empregados neste estudo.

- Os cães do GV apresentam importantes alterações à histologia da mucosa do TGI, compatíveis com gastrite, enterite e colite. As alterações verificadas nas concentrações de produtos de fermentação, com redução da atividade sacarolítica e aumento da proteolítica, acompanhada por tendência à redução de algumas aminas biogênicas nas fezes do GV podem estar relacionadas a este aumento da inflamação na mucosa do TGI.

- As alterações observadas para o animais considerados geriátricos são importantes de serem levadas em conta no momento da formulação de alimentos, de forma a selecionar ingrediente ou composições nutricionais que possam minimizar ou prevenir a ocorrência ou ainda aliviar os sintomas decorrentes de tais alterações.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, C. A. Carbohydrates Nutricines: Non-digestible oligosaccharides. In: _____ **Nutricines - Food Components in Health and Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. cap. 4, p. 57-74.

ALLISON, C.; MACFARLANE, G. T. Influence of pH, nutrient availability, and growth rate on amine production by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2894-2898, 1989.

AMBROZINI, S. R. Formulação comercial de alimentos para cães e gatos: uma visão a partir da construção do rótulo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 6., 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2007. p. 65-70.

ANFALPET - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Setor de Pet Food (alimentos para animais de companhia) deve faturar US\$ 3,22 bilhões em 2008**. Disponível em: http://anfalpet.org.br/Site/principal.php?id_menu=6. Acesso em 30 de novembro de 2008.

ANFALPET, 2011. Ver Apêndice A.

AVELAR, E. C.; FRANCA, A. S.; FERRAZ, V. P. Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6°, 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2005.

BARDÓCZ, S.; DUGUID, T. J.; BROWN, D. S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; WHITE, A.; RALPH, A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 819–828, 1995.

BARRY, K. A.; HERNOT, D. C.; MIDDELBOS, I. S.; FRANCIS, C.; DUNSFORD, B. K. S. SWANSON, FAHEY JUNIOR, G. C. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3244-3252, 2009.

BARRY, K. A.; WOJCICKI, B. J.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER, B. M.; SWANSON, K. S.; FAHEY, G. C. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 2978–2987, 2010.

BELENGUER, A.; DUNCAN, S. H.; CALDER, A. G.; HOLTROP, G.; LOUIS, P.; LOBLEY G. E.; FLINT, H. J. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3593-3599, 2006.

BENNO, Y.; NAKAO, H.; UCHIDA, K.; MITSUOKA, T. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of Beagle dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 54, p. 703-706, 1992.

BERNASCONI, M.; ALCÂNTARA, R. L. C. Gestão dos canais de distribuição na indústria de alimentos para cães e gatos. In: INTERNATIONAL PENSA CONFERENCE "SUSTAINABLE AGRI-FOOD AND BIOENERGY CHAINS/NETWORKS ECONOMICS AND MANAGEMENT, 6º, 2007, Ribeirão Preto. **Proceedings...**, 2007.

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

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

BUDDINGTON, R. K.; PAULSEN, D. B. Development of the canine and feline gastrointestinal tract. In: REINHART, G. A.; CAREY, D. P. (Eds.) **Recent Advances in Canine and Feline Nutrition**, Vol. II. Wilmington, OH: Orange Frazer Press. 1998, p. 195–215.

BUDDINGTON, R. K.; SANGILD, P. T. COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1506-1519, 2011.

BURKHOLDER, W. J. Age related changes to nutritional requirements and digestive function in adult dog and cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 625-629, 1999.

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

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

CARCIOFI, A. C.; GOMES, M. O. S. Dietary Effects on Gastrointestinal Microbiota of Aging Dogs: Potential Tools to Health Improvement. In: PROCEEDINGS OF THE COMPANION ANIMAL NUTRITION SUMMIT - FOCUS ON GERONTOLOGY, 2010, Clearwater. **Proceedings...** Clearwater, p. 62-67.

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

CORAZZA, G. R.; FRAZZONI, M.; GATTO, M. R.; GASBARRINI, G. Ageing and small-bowel mucosa: a morphometric study. **Gerontology**, v. 32, p. 60-65, 1986.

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

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

CUPP, C. J.; JEAN-PHILIPPE, C.; KERR, W. W.; PATIL, A. R.; PEREZ-CAMARGO, G. Effect of Nutritional Interventions on Longevity of Senior Cats. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, p. 34-50, 2006.

DAY, M. J. Ageing, immunosenescence and inflammageing in the dog and cat. **Journal of comparative pathology**, v. 142, p. S60-S69, 2010.

DAY, M. J.; BILZER, T.; MANSELL, J.; WILCOCK, B.; HALL, E. J.; JERGENS, A.; MINAMI, T.; WILLARD, M.; WASHABAU R. Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, p. S1- S43, 2008.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M. L.; RELMAN, D. A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biology**, v. 6, n. 11, e280, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>>.

DEVRIES, E.; DE BRUIN-VERSTEEG, S.; COMANS-BITTER, W. M.; DE GROOT, R.; HOP, W. C. J.; BOERMA, G. J. M.; LOTGERING, F. K.; VAN DONGEN, J. J. M. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. **Pediatric Research**, v. 47, p. 528–537, 2000.

DIMMITT, R. A.; STALEY, E. M.; CHUANG, G.; TANNER, S. M.; SOLTAU, T. D.; LORENZ, R. G. Role of postnatal acquisition of the intestinal microbiome in the early development of immune function. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, p. 262–273, 2010.

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

DUMAS, M. E.; BARTON, R. H.; TOYE, A.; CLOAREC, O.; BLANCHER, C.; ROTHWELL, A.; FEARNSIDE, J.; TATOUD, R.; BLANC, V.; LINDON, J. C.; MITCHELL, S. C.; HOLMES, E.; MCCARTHY, M. I.; SCOTT, J.; GAUGUIER, D.; NICHOLSON, J. K. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin resistant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 12511–12516, 2006.

ENCK, P.; ZIMMERMANN, K.; RUSCH, K.; SCHWIERTZ, A.; KLOSTERHALFEN, S.; FRICK, J. S. The Effects of Ageing on the Colonic Bacterial Microflora in Adults. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 47, p. 653–658, 2009.

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

FAHEY, G. C. Research needs companion animal nutrition. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. **Pet food technology**. Illinois: Mt. Morris, 2003, p. 135-140.

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

FERGUSON, A. Immunological functions of the gut in relation to nutritional state and mode of delivery of nutrients. **Gut**, v. 35, p. S10-S12, 1994.

FLICKINGER, E. A.; SCHREIJEN, E. M. W. C.; PATIL, A. R.; HOUSSEIN, H. S.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JUNIOR, G. C. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2008-2018, 2003.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GIUNTA, S.; OLIVIERIE, F.; SEVINI, F.; PANOURGIA, M. P.; INVIDIA, L.; CELANI, L.; SCURTI, M.; CEVENINI, E.; CASTELLANI, G. C.; SALVIOLI, S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 92–105, 2007.

FUSI, E.; ROSSI, L.; REBUCCI, R.; CHELI, F.; DI GIANCAMILLO, A.; DOMENEGHINI, C.; PINOTTI, L.; DELL'ORTO, V.; BALDI, A. Administration of biogenic amines to Saanen kids: effects on growth performance, meat quality and gut histology. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 1–7, 2004.

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

GIBSON, G. R.; CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ALLISON, C.; SEGAL, I.; VORSTER, H. H.; WALKER, A. R. P. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. **Gut**, v. 31, p. 679–683, 1990.

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

GOUVEIA, N. N. F. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de aminas biogênicas em tunídeos**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) - Universidade da Madeira, Funchal, 2009.

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

GREELEY, E. H.; SPITZNAGEL, E.; LAWLER, D. F.; KEALY, R. D.; SEGRE, M. Modulation of canine immunosenescence by life-long caloric restriction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 287–299, 2006.

GREENBERG, R. E.; HOLT, P. R. Influence of aging upon pancreatic digestive enzymes. **Digestive Diseases and Science**, v. 31, p. 970-977, 1986.

GREETHAM, H. L.; GIFFARD, C.; HUTSON, R. A.; COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Bacteriology of the labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 640–646, 2002.

GREGG, R.; SMITH, C. M.; CLARK, F. J.; DUNNION, D.; KHAN, N.; CHAKRAVERTY, R.; NAYAK, L.; MOSS, P. A. The number of human peripheral blood CD 4 + CD 25 high regulatory T cells increases with age **Clinical and Experimental Immunology**, v. 140, p. 540–546, 2005.

GRØNVOLD, A. M. R.; L'ABEE-LUND, T. M.; SORUM, H.; SKANCKE, E.; YANNARELL, A. C.; MACKIE, R.I. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, p. 313–326, 2010.

HÁFEZ, S. Mercado e tendências do pet food no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2º, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2002. p. 1-2.

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

HANDL, S.; DOWD, S. E.; GARCIA-MAZCORRO, J. F.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Massive parallel16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, p. 301-310, 2011.

HARPER, E. J. Changing perspectives on aging and energy requirements: aging, body weight and body composition in humans, dogs and cats. **The Journal of nutrition**, v. 128, p. 2627S-2631S, 1998b.

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

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

HOGENESCH, H.; THOMPSON, S.; DUNHAM, A.; CEDDIA, M.; HAYEK, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 77–85, 1997.

HOODA, S.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOLSKI, J. S.; SWANSON, K. S. Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, p. 78–88, 2012.

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

HUGHES, R.; MAGEE, E. A. M.; BINGHAM, S. Protein Degradation in the Large Intestine: Relevance to Colorectal Cancer. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 1, p. 51-58, 2000.

JAIN, C. N. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____ **Essential of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993, cap. 2, p. 19-53.

JOHNSTON, K. L.; LAMPORT, A.; BATT, R. M. An unexpected bacterial flora in the proximal small intestine of normal cats. **Veterinary Records**, v. 132, p. 362–363, 1993.

KEALY, R. D.; LAWLER, D. F.; BALLAM, J. M.; MANTZ, S. L.; BIERY, D. N. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 1315-1320, 2002.

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

KIL, D. L.; SWANSON, K. S. COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Role of microbes in canine and feline HEALTH **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1498-1505, 2011.

KIM, H. W.; CHEW, B. P.; WONG, T. S.; PARK, J. S.; WENG, B. B.; BYRNE, K. M.; HAYEK, M. G.; REINHART, G. A. Dietary lutein stimulates immune response in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 74, p. 315-327, 2000.

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

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

KORE, K. B.; PATIL, S. S.; PHONDABA, B. T. Gastrointestinal microbial ecology and its health benefits in Dogs. **Veterinary World**, v.3, p. 140-141, 2010.

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

LABRES, R. V. **Aplicabilidade da alga cianofícea *Spirulina máxima* como ingrediente em petfood: avaliação de ação antioxidante e estimulação da resposta imunológica em cães**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

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

LAY, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; HOLMSTROM, K.; RAJILIC, M.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M.; COLLINS, M. D.; THIEL, R.; NAMSOLLECK, P.; BLAUT, M.; DORE, J. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4153–4155. 2005.

LI, J.; KUDSK, K. A.; GOCINSKI, B.; DENT, D.; GLEZER, J.; LANGKAMP-HENKEN, B. Effects of parenteral and enteral nutrition on gut-associated lymphoid tissue. **Journal of Trauma**, v. 39, p. 44-52, 1995.

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

LOWSETH, L. A.; GILLETT, N. A.; GERLACH, R. F. N.; MUGGENBURG, B. A. The effect of ageing on haematology and serum chemistry values in the Beagle dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 19, p. 13-19, 1990.

MACFARLANE, G. T.; GIBSON, G. R.; BEATTY, E.; CUMMINGS, J. H. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101, p. 81–88, 1992.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proceedings of The Nutrition Society**, v. 62, p. 67–72, 2003.

MALINEN, E. KASSINEN, A. RINTTILÄ, T.; PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, v. 149, p. 269-277, 2003.

MARIAT, D.; FIRMESSE, O.; LEVENEZ, F.; GUIMARÃES, V. D.; SOKOL, H.; DORÉ, J.; CORTIER, G.; FURET, J. P. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>>.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; TAKADA, T.; TANAKA, R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 7220-7728, 2004.

MENTSCHER, J.; CLAUS, R. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. **Metabolism**, v. 52, p. 1400-5, 2003.

MENTULA, S.; HARMOINEN, J.; HEIKKILA, M.; WESTERMARCK, E.; RAUTIO, M.; HUOVINEN, P.; KONONEN, E. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in Beagle dogs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4169–4175, 2005.

MIDDELBOS, I. S.; BOLER, B. M. V.; QU, A.; WHITE, B. A.; SWANSON, K. S.; FAHEY, G. C. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, e9768, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>>.

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

MIDDELBOS, I. S.; GODOY, M. R.; FASTINGER, N. D.; FAHEY JUNIOR, G. C. 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.

MORAES, E. M. **Princípios básicos de geriatria e gerontologia**. Belo Horizonte: Coopemed; 2008. 700 p.

MSHVILDADZE, M.; NEU, J. The infant intestinal microbiome: Friend or foe? **Early Human Development**, v. 86 (Suppl. 1), p. 67–71, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) Ad Hoc Committee on Dog and Cat Nutrition: **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**, Rev. National Academies Press, Washington, DC. 2006.

OGRA, P. L. Ageing and its possible impact on mucosal immune responses. **Ageing Research Reviews**, v. 9, p. 101–106, 2010.

PEACHEY, S. E.; DAWSON, J. M.; HARPER, E. J. Gastrointestinal transit times in young and old cats. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 126, p. 85-90, 2000.

PEACHEY, S. E.; HARPER, E. J. Aging does not influence feeding behavior in cats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1735S-1739S, 2002.

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

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

PINHEIRO, D.; SINGH, Y.; GRANT, C. R.; APPLETON, R. C.; SACCHINI, F.; WALKER, K. R. L.; CHADBOURNE, A. H.; PALMER, C. A.; ARMITAGE-CHAN, E.; THOMPSON, I.; WILLIAMSON, L.; CUNNINGHAM, F.; GARDEN, O. A. Phenotypic and functional characterization of a CD4⁺CD25^{high}FOXP3^{high} regulatory T-cell population in the dog. **Immunology**, v. 132, p. 111–122, 2011.

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

REIS, A. B.; CARNEIRO, C. M.; CARVALHO, M. D. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 173–185, 2005

RINTTILÄ, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1166-1177, 2004.

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

ROGNUM, T. O.; THRANE, S.; STOLTENBERG, L.; VEGE, A.; BRANDTZAEG, P. Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. **Pediatric Research**, v. 32, p. 145–149, 1992.

RUSSO, A. **Pet food cresce mas não anima a indústria**. Disponível em: <<http://www.petbr.com.br/repor31.asp>>. Acesso em: 02 nov. 2008.

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

SAAID, M.; SAAD, B.; HASHIM, N. H.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1356-1362, 2009.

SABAINI, P. S. **Métodos de análise e determinação de aminas livres e conjugadas em uvas e vinhos**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. **Food Microbiology**, v. 29, p. 213-231, 1996.

SCHOOR, S. R.; REEDS, P. J.; STOOL, B. **The high metabolic cost of functional gut**. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1931-1940, 2002.

SCHULTZE, A. E. Interpretation of Canine Leukocyte Responses. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6a ed. IOWA: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 48, p. 321-334.

SCHWIERTZ, A.; LEHMANN, U.; JACOBASCH, G.; BLAUT, M. Influence of resistant starch on the SCFA production and cell counts of butyrate-producing Eubacterium spp. in the human intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 157-62, 2002.

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

SIMONE, R.; ZICCA, A.; SAVERINO, D. The frequency of regulatory CD3⁺CD8⁺CD28⁻CD25⁺ T lymphocytes in human peripheral blood increases with age. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 1454-1461, 2008.

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

SMITH, A.; MACFARLANE, G. T. Studies on Amine Production in the Human Colon: Enumeration of Amine forming Bacteria and Physiological Effects of Carbohydrate and pH E. **Anaerobe**, v. 2, p. 285-297, 1996.

SONG, Y.; LIU, C.; FINEGOLD, S. M. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6459-65, 2004.

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

STRASSER, A.; NIEDERMÜLLER, H.; HOFHECKER, G.; LABER, G. The Effect of Aging on Laboratory Values in Dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 40, p. 720-730, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0442.1993.tb00689.x>>.

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

STRICKLING, J. A.; HARMON, D. L.; DAWSON, K. A.; GROSS, K. L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influence on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, p. 205-219, 2000.

SUCHODOLSKI, J. S. COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1520-1530, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 41, p. 261-272, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S.; DOWD, S. E.; WESTERMARCK, E.; STEINER, J. M.; WOLCOTT, R. D.; SPILLMAN, T.; HARMOINEN, J. A. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16s rRNA gene sequencing. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 210, 2009.

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

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

TANNOCK, G. W. Influences of the normal microbiota on the animal host. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A.; ISAACSON, R. E. **Gastrointestinal Microbiology**. Vol. 2, New York: Chapman and Hall, 1997. cap. 12, p. 466-497.

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

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

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

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

TIZZARD, I. R. Vaccines and their production. In: _____ **Veterinary Immunology: An Introduction**. 7.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004. cap. 21, p. 247-258.

TRZONKOWSKI, P.; SZMIT, E.; MYSLIWSKA, J.; MYSLIWSKI, A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. **Clinical Immunology**, v. 119, p. 307-316, 2006.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R.; GORDON, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027–1031, 2006.

TZORTZIS, G.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Canine functional foods. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 1, p. 1-11, 2003.

VAHJEN, W., TARAS, D., SIMON, O. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 8, p. 1-8, 2007.

VAHJEN, W.; PIEPER, R.; ZENTEK, J. Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2430-2439, 2011

VAJDOVICH, P.; GAÁL, T.; SZILÁGYI, A.; HARNOS, A. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old beagle dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 21, p. 463-470, 1997.

VALE, S. R.; GLORIA, M. B. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 1006-1012, 1997.

VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; BRANDT, E.; FAHEY JUNIOR, G. C.; SWINGS, J. Molecular monitoring and characterization of the fecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 65-71, 2005.

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

VILLAESCUSA, A.; GARCÍA-SANCHO, M.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Early-life longitudinal survey of peripheral blood lymphocyte subsets in Beagle dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 149, p. 126– 131, 2012.

WALKER, A. W.; DUNCAN, S. H.; HARMSSEN, H. J. M.; HOLTROP, G.; WELLING, G. W.; FLINT, H. J. The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 3275–3283, 2008.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition Research Reviews**, v. 14, p. 207–227, 2001.

WONG, J. M.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C. W.; EMAM, A.; JENKINS, D. J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, p. 235–243, 2006.

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

WOODMANSEY, E. J.; MCMURDO, M. E.; MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in non-antibiotic-treated elderly subjects. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6113–6122, 2004.

YAN, J.; GREER, J. M.; HULL, R.; O'SULLIVAN, J. D.; HENDERSON, R. D.; READ, S. J.; MCCOMBE, P. A. The effect of ageing on human lymphocyte subsets: comparison of males and females. **Immunity & Ageing**, v. 7, p. 1-10, 2010. Disponível em: < <http://www.immunityageing.com/content/7/1/4>>. Acesso em: 01 nov. 2012.

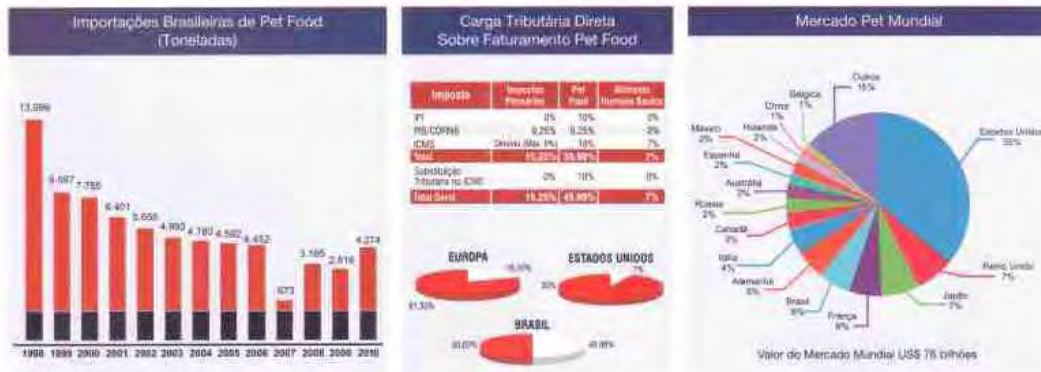
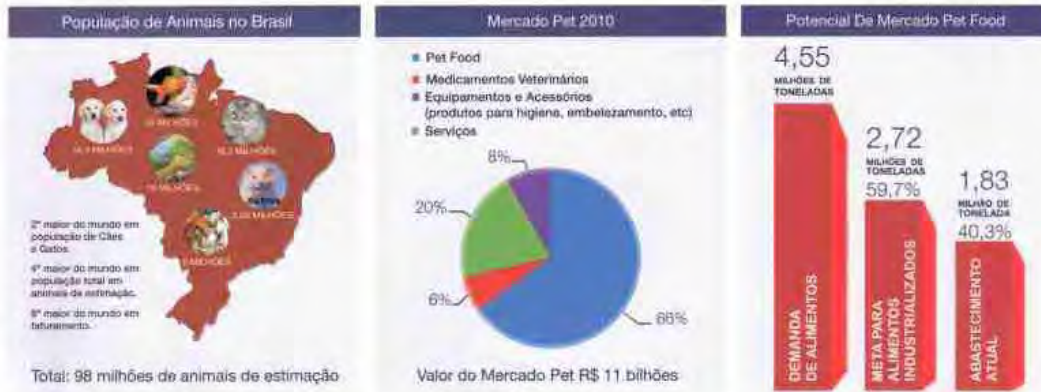
ZAINE, L.; FERREIRA, C.; GOMES, M. O. S.; MONTI, M.; TORTOLA, L.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. C. Faecal IgA concentration is influenced by age in dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S183-S186, 2011.

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

9. APÊNDICES

Apêndice A. Perfil Pet 2011.

Perfil Pet 2011



Av. Paulista, nº 1159 - 5º Andar - Sala 513 - Cep: 01311-200
 São Paulo - SP - Tel: (55) 11 3373-8200 - Fax: (55) 11 3373-8211
 www.anfalpet.org.br - e-mail: anfalpet@anfalpet.org.br

Apêndice B. Referências apresentadas na Tabela 3 e citadas por Day (2010).

BAUM, B.; MENESES, F.; KLEINSCHMIDT, S.; NOLTE, I.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: a histologic and immunohistologic study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 152-157, 2007.

BILLEN, F.; PEETERS, D.; DEHARD, S.; DAY, M. J.; CLERCX, C. Distribution of leucocyte subsets in the canine pharyngeal tonsil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 63-73, 2006.

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

FALDYNA, M.; LEVA, L.; KNOTIGOVA, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs e a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, p. 23-37, 2001.

GREELEY, E. H.; KEALY, R. D.; BALLAM, J. M.; LAWLER, D. F.; SEGRE, M. The influence of age on the canine immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 01-10, 1996.

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

GREELEY, E. H.; SPITZNAGEL, E.; LAWLER, D. F.; KEALY, R. D.; SEGRE, M. Modulation of canine immunosenescence by lifelong caloric restriction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 287-299, 2006.

HOGENESCH, H.; THOMPSON, S.; DUNHAM, A.; CEDDIA, M.; HAYEK, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 77-85, 2004.

HORIUCHI, Y.; NAKAJIMA, Y.; NARIAI, Y.; ASANUMA, H.; KUWABARA, M.; YUKAWA, M. Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 179-185, 2007.

KEARNS, R. J.; HAYEK, M. G.; TUREK, J. J.; MEYDANI, M.; BURR, J. R.; GREENE, R. J.; MARSHALL, C. A.; ADAMS, S. M.; BORGERT, R. C.; REINHART, G. A. Effect of age, breed and dietary omega-6 (n-6):omega-3 (n-3) fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid peroxidation in young and aged dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, p. 165-183, 1999.

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

HALL, J. A.; TOOLEY, K. A.; GRADIN, J. L.; JEWELL, D. E.; WANDER, R. C. Effects of dietary n-6 and n-3 fatty acids and vitamin E on the immune response of healthy geriatric dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 762-772, 2003.

LAWLER, D. F.; LARSON, B. T.; BALLAM, J. M.; SMITH, G. K.; BIERY, D. N.; EVANS, R. H.; GREELY, E. H.; SEGRE, M.; STOWE, H. D.; KEARLY, R. D. Diet restriction and ageing in the dog: major observations over two decades. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 793-805, 2008.

MASSIMINO, S.; KEARNS, R. J.; LOOS, K. M.; BURR, J.; PARK, J. S.; CHEW, B.; ADAMS, S.; HAYEK, M. G. Effects of age and dietary beta-carotene on immunological variables in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 835-842, 2003.

MEYDANI, S. N.; HAYEK, M. G.; WU, D.; MEYDANI, M. Vitamin E and immune response in aged dogs. In: REINHART, G. A.; CAREY, D. P.; Eds. **Recent Advances in Canine and Feline Nutrition**, Vol. 3, Wilmington, OH: Orange Frazer Press, 2000. pp. 295-303, 2000.

MOUZIN, D. E.; LORENZEN, M. J.; HAWORTH, J. D.; KING, V. L. Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 55-60, 2004.

PEETERS, D.; DAY, M. J.; FARNIR, F.; MOORE, P.; CLERCX, C. Distribution of leucocyte subsets in the canine respiratory tract. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, p. 261-272, 2005.

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

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

Apêndice C. Número de fragmentos coletados por região do trato gastrointestinal e adequação dos mesmos ao exame histológico da mucosa de cães de diferentes idades.

Item	Filhotes	Adultos	Velhos
ESTÔMAGO			
Nº. de fragmentos	42	28	44
Qualidade dos fragmentos ¹			
Grau 0	0%	22%	0%
Grau 1	0%	78%	7%
Grau 2	100%	0%	93%
DUODENO			
Nº. de fragmentos	82	69	89
Qualidade dos fragmentos ¹			
Grau 0	0%	100%	0%
Grau 1	17%	0%	0%
Grau 2	83%	0%	100%
ÍLEO			
Nº. de fragmentos	25	16	17
Qualidade dos fragmentos ¹			
Grau 0	0%	31%	0%
Grau 1	52%	69%	35%
Grau 2	48%	0%	65%
CÓLON			
Nº. de fragmentos	87	66	84
Qualidade dos fragmentos ¹			
Grau 0	0%	0%	0%
Grau 1	0%	100%	0%
Grau 2	100%	0%	100%
VÁLVULA ÍLEO-CECAL			
Nº. de fragmentos	8	6	12
Qualidade dos fragmentos ¹			
Grau 0	0%	17%	0%
Grau 1	38%	83%	25%
Grau 2	62%	0%	75%
TGI			
Nº. de fragmentos	244	185	246
Qualidade dos fragmentos ¹			
Grau 0	0	43,8%	0
Grau 1	12,3%	56,2%	4,9%
Grau 2	87,7%	0	95,1%

¹ Grau de qualidade dos fragmentos expresso em porcentagem do total de fragmentos coletados, sendo: 0 = inapropriado para análise; 1 = adequado com artefatos; 2 = adequado para análise.

Apêndice D. Análise histológica da mucosa de estômago de cães de diferentes idades. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Filhotes	Adultos	Velhos	P
Superfície epitelial	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Glândulas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Fibrose	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Atrofia de mucosa	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Linfócitos intraepiteliais	0 (0 - 0) ^b	0 (0 - 0) ^b	0 (0 - 1) ^a	0,018
Linfócitos e plasmócitos	0 (0 - 0) ^b	0 (0 - 0) ^b	1 (0 - 1) ^a	0,001
Eosinófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Neutrófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Hiperplasia linfociliar	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0 (0 - 2)	>0,05
Outro	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05

^{a, b} medianas na linha sem uma letra em comum diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Apêndice E. Análise histológica da mucosa de duodeno de cães de diferentes idades. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Filhotes	Adultos	Velhos	P
Relação vilo:cripta	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Atrofia de mucosa	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Superfície epitelial	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Distensão de criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Hiperplasia de criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Dilatação de linfáticos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Fibrose	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Linfócitos intraepiteliais	0 (0 - 1) ^b	0 (0 - 1) ^b	1 (0 - 1) ^a	0,012
Linfócitos e plasmócitos	0 (0 - 1) ^b	0 (0 - 1) ^b	1 (0 - 1) ^a	0,01
Eosinófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Neutrófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Outro	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 2)	>0,05

^{a, b} medianas na linha sem uma letra em comum diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Apêndice F. Análise histológica da mucosa de íleo de cães de diferentes idades.
Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Filhotes	Adultos	Velhos	P
Relação vilo:cripta	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Atrofia de mucosa	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Alteração superfície epitelial	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Distensão de criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Hiperplasia de criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Dilatação linfócito	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Fibrose	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Linfócitos intraepiteliais	0 (0 - 0) ^b	0 (0 - 0) ^b	1 (0 - 1) ^a	0,009
Linfócitos e plasmócitos	0 (0 - 1) ^b	0 (0 - 1) ^b	1 (0 - 1) ^a	0,01
Eosinófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Neutrófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Outro	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 2)	>0,05

^{a, b} medianas na linha sem uma letra em comum diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Apêndice G. Análise histológica da mucosa de cólon de cães de diferentes idades.
Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Filhotes	Adultos	Velhos	P
Superfície epitelial	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Hiperplasia de criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Dilatação/distorção criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Redução caliciforme	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Fibrose / atrofia	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Linfócitos intraepiteliais	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Linfócitos e plasmócitos	0 (0 - 1) ^b	0 (0 - 0) ^b	0 (0 - 2) ^a	0,029
Eosinófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Neutrófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Outro	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05

^{a, b} medianas na linha sem uma letra em comum diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Apêndice H. Análise histológica da mucosa da válvula íleo-cecal de cães de diferentes idades. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Filhotes	Adultos	Velhos	P
Superfície epitelial	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Hiperplasia de criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Dilatação/distorção criptas	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Redução caliciforme	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Fibrose / atrofia	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Linfócitos intraepiteliais	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1 (0 - 0)	>0,05
Linfócitos e plasmócitos	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0 (0 - 2)	>0,05
Eosinófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	>0,05
Neutrófilos	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05
Outro	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,05