

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

**USO DE AMIDO RESISTENTE NA PROMOÇÃO DA SAÚDE
INTESTINAL DE CÃES IDOSOS: FORMAÇÃO DE
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E CARACTERÍSTICAS
HISTOLÓGICAS DA MUCOSA INTESTINAL**

Mayara Corrêa Peixoto

Médica Veterinária

2015

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

**USO DE AMIDO RESISTENTE NA PROMOÇÃO DA SAÚDE
INTESTINAL DE CÃES IDOSOS: FORMAÇÃO DE
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E CARACTERÍSTICAS
HISTOLÓGICAS DA MUCOSA INTESTINAL**

Mayara Corrêa Peixoto

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

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

2015

Peixoto, Mayara Corrêa
P379u Uso de amido resistente na promoção da saúde intestinal de cães idosos: formação de produtos de fermentação e características histológicas da mucosa intestinal / Mayara Corrêa Peixoto. – – Jaboticabal, 2015
 ix, 58 p. : il. ; 29 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
 Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
 Banca examinadora: Lilian Rose Marques de Sá, Márcia de Oliveira Sampaio Gomes
 Bibliografia

 1. Butirato. 2. Colonócito. 3. Inflamação. 4. Inflammageing. I. Título.
 II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 619:636.04:636.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: USO DE AMIDO RESISTENTE NA PROMOÇÃO DA SAÚDE INTESTINAL DE CÃES IDOSOS: FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA MUCOSA INTESTINAL

AUTORA: MAYARA CORRÊA PEIXOTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

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

Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

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

Prof. Dra. LILIAN ROSE MARQUES DE SA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

Prof. Dra. MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

Data da realização: 17 de dezembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAYARA CORRÊA PEIXOTO, nascida em 22 de setembro de 1984, em Passos, estado de Minas Gerais, filha de Sebastião Peixoto Reis e Magda Corrêa Peixoto, tornou-se graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em dezembro de 2009. Durante o curso de graduação, fez iniciação científica na área de Nutrição e Nutrição Clínica em 2008, sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Realizou treinamento técnico em medicina veterinária pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP em 2010. Cursou o Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária, na área de Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, nos anos de 2011 e 2012. Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária - Clínica Médica na mesma instituição em agosto de 2013, onde atuou na área de Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos, sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi.

Dedico

À minha irmã e parceira, *Vanessa Peixoto*, pelo exemplo de perseverança e otimismo e por acreditar sempre em mim, me apoiando em minhas decisões.

Ofereço

A meus amigos... os poucos e bons, aqueles que eu
chamo de família...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter colocado tantos anjos em minha vida e por sempre me mostrar que tudo tem sua razão de ser...

A minha irmã Vanessa, meu grande exemplo de pessoa a ser seguido e que nunca me deixou desistir diante dos obstáculos que surgiram.

A minha grande amiga, cúmplice e família, Marcinha... sem você e seu apoio incondicional eu não estaria finalizando mais uma etapa importante da minha vida pessoal e profissional. Agradeço a Deus por ter você em minha vida, sempre me incentivando a buscar o meu melhor.

Ao meu amigo de hoje e sempre Luiz Victor, pela sua presença sempre constante mesmo estando longe.

A minha amiga Annita, pela amizade e por sempre estar do meu lado, em todos os momentos e em todas as recordações que levarei de Jaboticabal.

A minha parceira de imprevistos e grande amiga, que chegou de repente e já passou a fazer parte da família, Ludmilla Di Santo. Muito obrigada por ter feito meus dias serem mais leves!

Ao meu braço direito nas madrugadas de endoscopias, Amanda Festa, sem você, os meus momentos mais tensos neste trabalho teriam sido muito mais difíceis!

Ao meu orientador, Professor Aulus, que me concedeu oportunidades e a possibilidade de evoluir como pessoa e como profissional. Muito obrigada pela compreensão, generosidade, paciência, disponibilidade e principalmente pela amizade. Você é um exemplo de sabedoria e caráter a ser seguido.

A Professora Lilian Sá, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela sua contribuição imprescindível neste trabalho e por toda paciência, disponibilidade, atenção e dedicação.

Ao médico veterinário endoscopista Franz Naoki Yoshitoshi, agradeço pela sua brilhante participação e ajuda neste estudo. Muito obrigada pela generosidade e disponibilidade. Sua participação foi de extrema importância.

A Professora Paola, pela ajuda em todos os momentos que precisei; muito obrigada pela disponibilidade, atenção e pelas palavras que me trouxeram calma nos momentos aflitos do experimento.

Aos queridos anestesistas, Ricardo Ramirez, Diego Yamada (Tofu), Fabiana e Giulia, por cuidarem tão bem dos cães e pela enorme ajuda!

Ao pessoal da cardiologia pelo cuidado com os nossos animais e atenção, sempre dispostos a ajudar, principalmente a Edna, Jorge e Evandro, o meu mais sincero agradecimento!

A toda família Labnutri, por todos esses anos de companheirismo e amizade. Agradeço pela tolerância, paciência, cumplicidade e ajuda em todos os momentos que precisei, seja para os turnos das endoscopias, análises ou simplesmente desabafar... Vou levar vocês para sempre comigo! Muito obrigada Ana Paula, Bruna Agy, Bruna Ponciano, Fernanda Mendonça, Mariana Monti, Érico, Peterson, Katiane, Michele, Raquel, Camila Goloni, Vivian, Stephanie e à pessoa mais doce e querida que sempre tem um sorriso, uma palavra de otimismo e um convite para tomar sorvete... Thailinha! Muito obrigada por todos os momentos que vocês deixaram que eu participasse da vida de vocês.

A pessoa mais que especial que desde meu primeiro dia de Labnutri já conquistou seu cantinho cativo no meu coração: Elaine! Muito obrigada por seu exemplo de amor aos animais, pelo seu caráter e dedicação. Obrigada pelo carinho e por toda ajuda incondicional. Agradeço a você por cuidar tão bem dos animais e por nunca desistir do que acredita.

Ao Diego, sempre levando sua alegria aos dias de trabalho mais difíceis. Obrigada por toda ajuda e pela amizade.

Aos estagiários do Labnutri, muito obrigada pela disposição em ajudar e pelo incentivo em querer ensinar.

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”.

Aos animais, que são exemplo de companheirismo, amor e fidelidade. Principalmente aos que já fizeram ou fazem parte da minha vida, Hanna, Lillú, Pinga, Nina, Kuki, Poli, Cuca, Donna, Pep e aqueles que, sem eles, este estudo não teria acontecido: Peri, Luisinho, Chico, Rímel, Napo Jr., Stephanie, Zezinho e Léo Jr. E a todos os cães e gatos do Laboratório de Nutrição de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, pelas doses diárias gratuitas de felicidade que eles dão.

SUMÁRIO

	Página
Certificado de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura.....	5
2.1. O envelhecimento.....	5
2.2. Imunossenescência e “inflammageing” em cães e gatos.....	8
2.3. O intestino e a nutrição.....	10
2.4. Amido resistente e produtos de fermentação.....	12
2.5. Processamento de rações para cães.....	17
3. Objetivos	18
4. Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 2 – USO DE AMIDO RESISTENTE NA PROMOÇÃO DA SAÚDE INTESTINAL DE CÃES IDOSOS: FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA MUCOSA.....	25
Resumo	26

Abstract	27
Introdução	28
Material e Métodos	29
Local	29
Animais e delineamento experimental.....	29
Dietas experimentais e parâmetros de extrusão.....	30
Determinação da digestibilidade dos nutrientes e análises químicas dos alimentos e fezes.....	31
Avaliação do pH e produtos de fermentação das fezes.....	32
Quantificação da imunoglobulina A nas fezes	33
Análise histológica do estômago, intestino delgado e grosso.....	33
Análise estatística	34
Resultados	35
Ingestão e digestibilidade dos nutrientes e da energia.....	35
Produção e qualidade de fezes, pH, concentração dos produtos de fermentação e IgA das fezes.....	35
Análise histológica do estômago, intestino delgado e intestino grosso.....	36
Análise morfométrica do cólon.....	36
Discussão.....	36
Conclusão.....	41
Referências.....	42

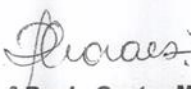
Tabelas.....	48
Legenda de figuras.....	53
Figuras.....	55

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 01742/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Uso de amido resistente na produção da saúde intestinal de cães idosos: formação de produtos de fermentação e características histológicas da mucosa intestinal"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavaliere Carciofi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de fevereiro de 2014.

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

Uso de amido resistente na promoção da saúde intestinal de cães idosos: formação de produtos de fermentação e características histológicas da mucosa intestinal.

RESUMO - O aumento da expectativa de vida dos animais de companhia tem estimulado as pesquisas em nutrição para cães e gatos seguir a tendência da nutrição humana, que visa estudar intervenções que proporcionem melhor qualidade de vida e favoreçam a saúde como um todo, retardando ou até mesmo minimizando o aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento. Cães idosos apresentam inflamação de baixo grau na mucosa do trato gastrointestinal, evidenciada por enterites e colites discretas a moderadas. O consumo de dieta contendo carboidratos fermentáveis, como o amido resistente (AR) pode amenizar essas alterações provocadas pela idade. O fornecimento de substrato fermentável para a microbiota intestinal, com correspondente produção de ácidos graxos de cadeia curta, em especial o butirato favorece melhor suporte nutricional à mucosa, influenciando sua estrutura e função, com potenciais benefícios à saúde e diminuição de inflamação. Este estudo avaliou os efeitos do consumo de amido resistente (AR) em cães idosos sobre a digestibilidade dos nutrientes, produtos de fermentação, IgA fecal e as características histológicas da mucosa intestinal. Uma mesma formulação foi processada de dois modos diferentes, originando ração com baixo (0,21%) e elevado (1,46%) teor de AR. Os resultados de consumo, digestibilidade, produtos de fermentação e IgA foram avaliados pela função GLM do SAS, considerando esquema fatorial 2x2, com dois tempos e dois tratamentos. Os dados de morfometria das criptas do intestino grosso foram analisados pelo teste T-pareado. Os resultados histológicos das biopsias intestinais foram avaliados por estatística não paramétrica, utilizando-se o teste de Wilcoxon para dados pareados ($P < 0,05$). A digestibilidade da proteína ($P = 0,002$) e do extrato etéreo ($< 0,001$) foi maior na dieta com menos AR. Quando alimentados com a ração com mais AR, as fezes dos cães apresentaram menor pH, maiores teores de propionato, butirato, ácidos graxos voláteis totais e lactato ($P < 0,05$). À análise histológica, não foi verificada diferença significativa em nenhum parâmetro analisado quando comparado os valores obtidos no período final de consumo da ração baixo AR e elevado AR. À análise morfométrica, foi observada tendência ao aumento do tamanho das criptas do cólon descendente dos cães que consumiram a ração com elevado AR ($P = 0,083$). No presente estudo, mesmo apresentando efeitos sobre os produtos de fermentação bacterianos e pH fecal, não houve alterações benéficas significativas na mucosa gastrointestinal, que demonstram ser necessários mais estudos sobre o assunto em cães.

Palavras-chave: butirato, colonócito, inflamação, inflammaging.

**Use of resistant starch to promote intestinal health in elderly dogs:
formation of fermentation products and histological characteristics of
intestinal mucosa.**

ABSTRACT - The increase in life expectancy of pets has stimulated researches in dogs and cats nutrition that follow the tendency of human nutrition ones, aim and to study interventions that can improve quality of life and promote health, slowing or even minimizing the onset of diseases related to the aging process. Elderly dogs present low degree of inflammation in the mucosa of the gastrointestinal tract, evidenced by discrete to moderate enteritis and colitis. The consumption of diet containing fermentable carbohydrates such as resistant starch (RS) can reduce these changes caused by age. The supply of fermentable substrate for the intestinal microbiota, stimulates short chain fatty acids production, specially butyrate, that favors a better nutritional support to the mucosa influencing its structure and function with potential health benefits and reduction of inflammation. This study evaluated the effects of resistant starch (RS) consumption on nutrient digestibility, fecal concentration of fermentation products, histologic and morphometric characteristics of the intestinal mucosa of elderly dogs. A basal diet was processed in two different extrusion conditions to obtain two treatments: diet with low (0.21%) and high (1.46%) RS content. Feed intake, nutrient digestibility, fermentation products and fecal IgA were performed by GLM procedure of SAS considering a 2x2 factorial arrangement of treatments, two times and two treatments. Morphometric characteristics from large intestine were evaluated by T-paired test. Histological evaluation of intestinal biopsy were assessed by non-parametric statistic using Wilcoxon test for paired data ($P < 0.05$). Protein ($P = 0.002$) and fat ($P < 0.001$) digestibility were higher for diet with low RS. Dogs receiving high-RS diet had lower fecal pH and higher concentration of values for propionate, butyrate, total volatile fatty acid and lactate ($P < 0.05$). There was no significant differences in either parameter analyzed the histological analysis compared the values obtained in the final period feed consumption of low and high AR. According to the morphometric evaluation there was increase in the crypt size in descending colon of dogs receiving high-RS diet ($P = 0.083$). Even with effects on bacteria fermentation products and fecal pH, there were no significant beneficial changes on gastrointestinal mucosa, that suggests that more studies on this issue are required.

Key-words: butyrate, colonocytes, inflammation, inflammaging

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição química analisada e parâmetros de qualidade dos kibbles das dietas experimentais para cães processadas para se obter diferentes graus de cozimento e teores de amido resistente.....	48
Tabela 2. Peso corporal dos cães, ingestão e digestibilidade dos nutrientes e da energia das dietas experimentais com baixo e elevado teor de amido resistente.....	49
Tabela 3. Produção, qualidade das fezes e concentração dos produtos de fermentação de cães alimentados com diferentes teores de amido resistente na dieta.....	50
Tabela 4. Análise histológica da mucosa do estômago, intestino delgado e intestino grosso de cães alimentados com diferentes teores de amido resistente na dieta. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).....	51
Tabela 5. Análise morfométrica das criptas do intestino grosso de cães idosos alimentados com dietas experimentais processadas para se obter diferentes graus de cozimento e teores de amido resistente.....	52

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Figura 1.	Fotomicrografias da mucosa intestinal de cães	2
-----------	---	---

CAPÍTULO 2

Figura 1.	Fotomicrografias da mucosa gástrica de cães	55
Figura 2.	Fotomicrografias da mucosa do intestino delgado de cães	56
Figura 3.	Fotomicrografias da mucosa do intestino grosso de cães	57
Figura 4.	Fotomicrografias das criptas do intestino grosso de cães.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AAFCO	Association of American Feed Control Officials
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCR	Ácidos graxos de cadeia ramificada
AGV	Ácidos graxos voláteis
AOAC	Association of the Official Analytical Chemists
AR	Amido resistente
ATP	Trifosfato de adenosina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DGM	Diâmetro geométrico médio
EB	Energia bruta
EEHA	Extrato etéreo em hidrólise ácida
EPM	Erro padrão da média
FEDIAF	Federação Europeia das Indústrias de Pet Food (The European Pet Food Industry Federation)
g	Gramas
GALT	Gut associated lymphoid tissues
GLM	General linear models
h	Hora
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina

kcal	Kilocalorias
kW	Kilowatt
L	Litro
LC	Linfócito em cripta
LIE	Linfócitos intraepiteliais
LP	Lâmina própria
mg	Miligramas
mm	Milímetro
MM	Matéria mineral
MS	Matéria seca
NRC	Nacional Research Council
PB	Proteína bruta
SAS	Statistical Analysis System
TGI	Trato gastrointestinal
ton	Tonelada
UI	Unidade internacional
UFC	Unidades formadoras de colônia

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

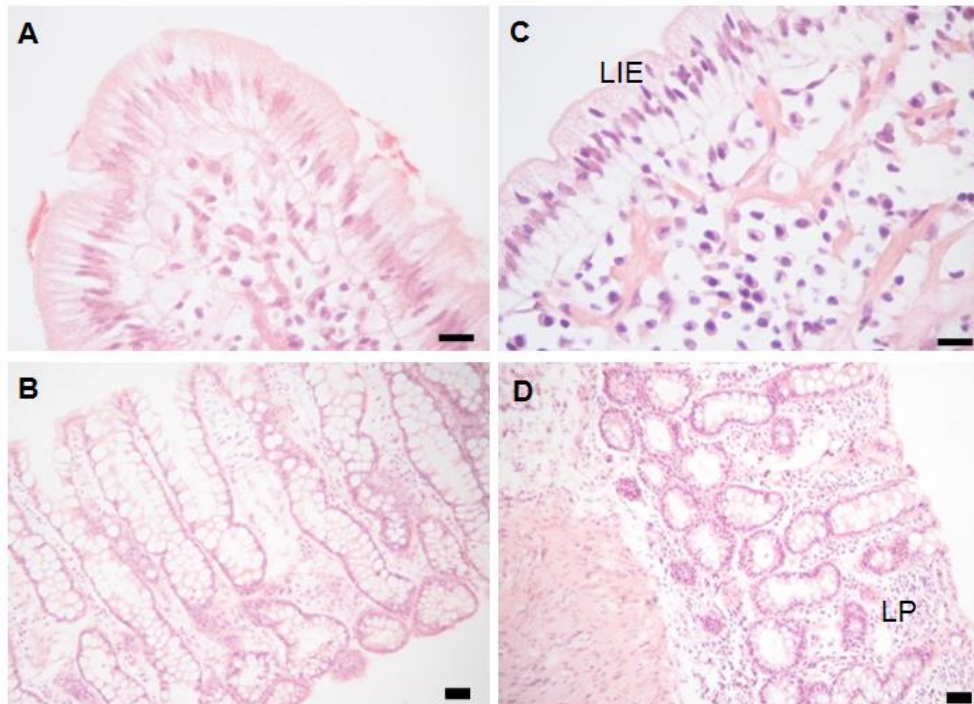
1. Introdução

Os avanços na nutrição de animais de companhia frequentemente seguem aqueles verificados na nutrição humana. Os conceitos de nutrição de cães se expandiram para além da fronteira da sobrevivência e satisfação da fome, enfatizando a utilização de alimentos que promovam bem estar e melhorem a saúde, além de reduzir o risco de doenças (FAHEY, 2003). De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2014) a população de *pets* no Brasil tornou-se a quarta maior do mundo, com 106,2 milhões de animais. Destes, 37,1 milhões são cães e 21,3 milhões gatos domésticos. Estima-se que cerca de 30% desta população de cães e gatos esteja dentro da faixa etária de animais considerados idosos.

O aumento da expectativa de vida dos animais de companhia, resultante principalmente de cuidados veterinários mais sofisticados, nutrição melhorada e aumento da conscientização dos proprietários, tem tornado necessário o estudo das mudanças associadas ao envelhecimento e o papel que a nutrição pode desempenhar em amenizar ou retardar essas mudanças. Mudanças metabólicas relatadas em seres humanos e que parecem ser características também do envelhecimento de cães e gatos incluem alterações metabólicas no funcionamento dos órgãos principais, isto é, rins, pulmões, coração e trato gastrointestinal (TAYLOR; ADAMS; NEVILLE, 1995).

A fisiologia e morfologia da mucosa intestinal mudam de acordo com a dieta, estresse, doença e envelhecimento. Estas mudanças podem afetar a função do intestino, influenciando a absorção e metabolização de nutrientes, bem como sua capacidade de proteger o organismo (CARCIOFI; GOMES, 2010). No entanto, muito pouco já foi investigado sobre os efeitos do envelhecimento nestes parâmetros. É sabido que em gatos o envelhecimento resulta em redução da capacidade de digestão e absorção de nutrientes e energia (TESHIMA et al., 2010). Em cães acredita-se que a função digestiva não se altere (GOMES et al., 2011), mas o assunto não foi convenientemente explorado. Foi demonstrado em Tese de

Doutorado recente de nosso grupo de pesquisa (GOMES, 2013) que animais idosos apresentam inflamação moderada a discreta da mucosa do intestino delgado (até 70% dos animais avaliados) e grosso (até 36% dos cães avaliados), como pode ser observado na Figura 1. Esta inflamação não resulta em sinais clínicos detectáveis ou alterações à digestão e formação de fezes.



Fonte: Gomes (2013)

Figura 1. Foto micrografias da mucosa intestinal de cães. a) Intestino delgado de cão jovem, vilosidade. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra= 10 μ m; b) Intestino grosso de cão jovem, cólon. Criptas paralelas e com células caliciformes. Padrão de histologia normal. HE, barra = 10 μ m; c) Intestino delgado de cão idoso, vilosidade. Infiltrado na lâmina própria (LP) e linfócitos intraepiteliais (LIE). HE, barra = 10 μ m; d) Intestino grosso, cólon de cão idoso. Infiltrado na LP e criptas tortuosas. Colite linfoplasmocítica moderada. HE, barra = 10 μ m.

Esta inflamação intestinal crônica verificada nos idosos faz parte do contexto de “inflammageing”, já descrito para seres humanos idosos. 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. Grande parte do fenótipo (característica observáveis) do envelhecimento, incluindo a imunosenescência, é explicada pelo desequilíbrio entre as redes inflamatórias e anti-inflamatórias que resultam em estado pró-inflamatório crônico de baixo grau no idoso. 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) (GOMES, 2013).

Estudos mostram, também, que as populações bacterianas intestinais e as concentrações de seus produtos de fermentação são alteradas com a idade. Foi verificado que o cólon de cães idosos apresentou concentrações mais baixas de *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. e concentrações mais elevadas de uma variedade de *Clostridium* spp., bem como redução do butirato e aumento do pH fecal (KUZMUK et al., 2005; LARSEN; FARCAS, 2014).

O termo amido resistente (AR) se refere à soma do amido e de seus produtos de degradação que não são digeridos e absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis, sendo fermentados por bactérias no intestino grosso (LOBO; LEMOS SILVA, 2003). Por não ser digerido no intestino delgado torna-se substrato para fermentação pelas bactérias sacarolíticas do cólon, razão pela qual o AR é considerado uma substância com potencial prebiótico. Essa fração do amido apresenta comportamento similar ao da fibra alimentar, e tem sido relacionada a efeitos benéficos locais e sistêmicos (KOVATCHEVA-DATCHARY et al., 2009). Os produtos da fermentação do AR são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; acético, propiônico e butírico), além de gases em proporção menor como hidrogênio, dióxido de carbono e metano (POLESI, 2011). O ácido butírico é produzido em concentrações particularmente elevadas pela fermentação de AR, comparado à uma dieta controle, livre de AR. Além de ser a principal fonte de energia dos colonócitos (SCHWIERTZ et al., 2002), o ácido butírico tem sido apontado como responsável por outras importantes mudanças fisiológicas, tais como a capacidade de reverter

alterações neoplásicas *in vitro* (FERGUSON et al., 2000), efeitos nutritivos exercidos no epitélio do cólon e indução de apoptose em células danificadas (MENTSCHEL; CLAUS, 2003). Além disso, o butirato está envolvido na regulação da expressão de genes e de eventos celulares específicos, lançando nova luz sobre o envolvimento dos AGCC na adipogênese, desenvolvimento de resistência insulínica, status inflamatório e sobre a manutenção da integridade da barreira intestinal em estudos com seres humanos e ratos (BELOBRAJDIC et al., 2012).

Em cães, poucos estudos avaliaram o uso de prebióticos e seus impactos sobre o metabolismo corporal (RESPONDECK et al., 2008). Em estudo recente de nosso grupo de pesquisa (ROBERTI-FILHO, 2013) foi observado que o consumo de AR, obtido a partir do processamento por extrusão do milho, foi capaz de melhorar o perfil da microbiota intestinal, com aumento linear de bifidobactéria e lactobacilos, aumentar a produção de AGCC, incluindo a de butirato e melhorar as respostas pós-prandiais de glicose e insulina de cães adultos não obesos.

Considerando que a inter-relação entre nutrição e saúde intestinal é dinâmica, é possível que a modulação, através da dieta, dos produtos de fermentação gerados no intestino a partir da ingestão de certo teor de amido resistente possa melhorar a saúde intestinal, pela alteração do padrão inflamatório e a estrutura da mucosa do intestino de cães idosos. Dessa forma, o fornecimento de AR para cães idosos, pode vir a promover aumento das concentrações intestinais de AGCC, em especial de butirato. Esta mudança na atividade fermentativa poderá implicar em melhoria do aporte nutricional e metabolismo da mucosa do trato gastrointestinal destes cães, sendo estas alterações capazes de minimizar o estado crônico de inflamação em baixo grau verificado na mucosa intestinal de cães idosos. Estes resultados teriam importantes implicações, tanto científicas, como linha de pesquisa de senescência e função gastrointestinal de cães, como práticas, propondo-se melhores formas de se processar os alimentos visando a promoção de saúde, sem necessidade de se empregar ingredientes especiais, como prebióticos, que encarecem as formulações.

2. Revisão de Literatura

2.1. O envelhecimento

O envelhecimento é a soma dos efeitos deletérios do tempo sobre a função celular, micro anatomia e a fisiologia de cada sistema do corpo. Não é uma doença, mas um processo complexo influenciado pela genética, meio ambiente, estresse e nutrição. Estes fatores afetam a ocorrência de alterações degenerativas irreversíveis e progressivas em todos os tecidos corporais. O resultado a longo prazo é o declínio fisiológico dos principais órgãos dos sistemas, levando a uma resposta alterada ao estresse, infecções e diversas drogas. Em algum momento deste declínio progressivo ocorrerá o aparecimento de sintomas clínicos de doenças relacionadas à idade (FORTNEY, 2010).

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 grande 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 (CARCIOFI; GOMES, 2010).

Atenção especial deve ser dirigida às alterações fisiológicas que podem estar associadas ao envelhecimento e às doenças que são mais prevalentes em animais idosos, como a doença renal, câncer, doença articular degenerativa, doença cardíaca, desordens endócrinas, doença periodontal, disfunção cognitiva e alterações da composição corporal, com emagrecimento ou obesidade (DEBRAEKELEER; GROSS; ZICKER, 2010). Algumas mudanças são óbvias, como embranquecer dos pêlos, declínio geral nas condições corporais e de pelagem e diminuição dos sentidos da visão e audição. Outras mudanças são menos aparentes

e incluem alterações na fisiologia do trato digestório, sistema imune, rins, coração e outros órgãos.

Dentre estas alterações de envelhecimento, as relacionadas ao trato digestório são particularmente pouco estudadas em cães e gatos. Quando o animal se torna mais velho, a fisiologia digestiva, assim como a microbiota intestinal, hormônios digestivos, morfologia e imunidade intestinal são modificados. O peso e o comprimento intestinal, assim como o peso da mucosa, aumentam com a idade em cães (FAHEY JR.; BARRY; SWANSON, 2008). Cães mais velhos apresentam menor área de superfície das vilosidades do duodeno, menor altura das vilosidades do jejuno e profundidade maior das criptas do cólon (LARSEN; FARCAS, 2014). Atribui-se a esta faixa etária maior incidência de disbioses, diarreias, constipação e neoplasias (GOMES, 2013), além de redução da secreção salivar e de ácido gástrico e da renovação celular (TAYLOR; ADAMS; NEVILLE, 1995). Estas mudanças associadas com o envelhecimento podem afetar a digestão e absorção dos nutrientes.

A altura das vilosidades e profundidade das criptas são representações diretas do ambiente intestinal e podem ser utilizadas como indicadores de saúde intestinal. Um ambiente hostil, incluindo baixo pH e a presença de determinados produtos finais bacterianos, pode levar a alterações deletérias nesses índices morfométricos. Diminuição na altura das vilosidades ou na profundidade das criptas pode levar a redução na absorção de nutrientes. A razão vilosidade:cripta é indicador da provável capacidade digestiva do intestino delgado. Aumento desta razão corresponde a provável aumento da digestão e absorção (KUZMUK et al., 2005). Segundo estudo realizado por Kuzmuk et al. (2005), cães jovens (1 a 2 anos) apresentaram tendência a maior área de vilosidades duodenal ($P=0,09$), maior altura das vilosidades no jejuno ($P=0,04$) e relação vilosidade: cripta no jejuno ($P=0,03$) em comparação a cães idosos (11 a 12 anos). Estes últimos, por sua vez, apresentaram profundidade aumentada ($P=0,01$) das criptas do cólon. Já em estudo com seres humanos, Corazza et al. (1986) não encontraram alterações relacionadas à idade na anatomia do intestino delgado.

Embora hajam efeitos fisiológicos potencialmente importantes do envelhecimento sobre o processo digestivo, a maioria dos estudos não relata

diferenças na absorção de nutrientes ao comparar cães adultos jovens com cães geriátricos (LARSEN; FARCAS, 2014). Em estudo realizado por Sheffy et al. (1985), não se verificou alterações na digestibilidade aparente e absorção de macronutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras), minerais (Ca, P, Mg, Zn, Cu, Fe, K, e Na) e vitaminas (vitaminas C e E) devido à idade avançada. Gomes et al. (2011) também não encontraram diferenças entre grupos de cães jovem e velho na digestibilidade de nutrientes e energia metabolizável das dietas. Já em gatos idosos alterações na função do trato gastrointestinal (TGI) relacionam-se principalmente à diminuição na digestibilidade da proteína, gordura, amido e energia (PÉREZ-CAMARGO, 2004; TESHIMA et al., 2010).

A microbiota que habita o trato gastrointestinal é caracterizada por elevada densidade e diversidade, assim como pela complexidade de interações. Grande população e diversidade de microrganismos habita o intestino e formam estreita unidade ecológica integrada com o hospedeiro (SIMPSON et al., 2002). Os microrganismos intestinais desempenham papel essencial na digestão e na saúde do intestino. Vários produtos de origem microbiana vindos da fermentação da matéria orgânica, como aminas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), têm importantes funções específicas nos enterócitos e colonócitos (CARCIOFI; GOMES, 2010). Os AGCC, especialmente o butirato, desempenham papéis metabólicos centrais na manutenção da barreira da mucosa intestinal. As principais fontes de AGCC são a fibra e outros carboidratos alimentares fermentáveis, tais como oligossacarídeos e amido resistente. Em seres humanos e roedores a falta de produção ou absorção de butirato pode ser causa de colite ulcerosa e outras condições inflamatórias, por causa da falta de energia para os enterócitos do intestino (KUZMUK et al., 2005; WÄCHTERSHÄUSER, A.; STEIN, J., 2000). Para cães, não existem dados à este respeito.

Estudos mostraram que as populações bacterianas do intestino delgado e gástricas são similares entre cães velhos e jovens, mas que o cólon de cães velhos tem concentrações mais baixas de *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* spp e concentrações mais elevadas de uma variedade de *Clostridium* spp., em comparação com os cães jovens alimentados com a mesma dieta (BENNO et al.,

1992). Gomes et al. (2011) verificaram maior pH e concentrações reduzidas de butirato e das aminas biogênicas agmatina, histamina e espermina nas fezes de cães idosos. Estas alterações demonstram menor atividade fermentativa no colón destes animais, com menor formação de compostos potencialmente importantes ao suporte nutricional da mucosa intestinal, o que poderia influenciar negativamente sua estrutura ou função. Em sua tese de doutorado, Gomes (2013) confirmou esta menor concentração de AGCC, ácido valérico e maior pH nas fezes de cães idosos, reforçando esta menor atividade sacarolítica da microbiota intestinal. Estes mesmos cães idosos apresentaram alterações histológicas na mucosa, com processos inflamatórios tanto no intestino delgado como grosso.

2.2. “Inflammageing” e imunossenescência em cães e gatos

O aumento da expectativa de vida tanto, da população humana quanto dos animais de estimação trouxe à tona dois conceitos que estão sendo amplamente discutidos na comunidade científica a respeito do envelhecimento, que são o “inflammageing” e a imunossenescência.

A maioria das doenças relacionadas com a idade está associada, em sua maior parte, a um baixo grau de inflamação crônica (CANIZZO et al., 2011). Segundo Franceschi et al. (2007), “inflammageing” é um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau causado pelo desequilíbrio entre as redes inflamatória e anti-inflamatória. No “inflammageing” verifica-se aumento sérico de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-15, IL-8) e outros marcadores de inflamação, tais como os fatores de coagulação, o que predispõem ao aumento da morbidade e mortalidade em idosos (FRANCESCHI et al., 2007; BAYLIS et al., 2013). Tal desequilíbrio é considerado importante força motriz para a fragilidade e doenças relacionadas à idade. Desta forma, o envelhecimento saudável e a longevidade são provavelmente o resultado não só de menor propensão para desenvolver respostas inflamatórias, mas também de processos anti-inflamatórios eficientes.

A identificação dos caminhos que controlam a inflamação relacionada com o envelhecimento nos múltiplos sistemas orgânicos como por exemplo, a redução dos

marcadores pró-inflamatórios, é importante, permitindo se compreender e propor intervenções que possam modular o “inflammageing”, beneficiando, dessa forma a qualidade de vida do idoso (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014; PANICKAR; JEWELL, 2015).

O sistema imunológico de idosos diminui em confiabilidade e eficiência, resultando em maior susceptibilidade a doenças, bem como em aumento da vulnerabilidade a doenças infecciosas. Essas alterações do sistema imune, relacionadas à idade são denominadas imunossenescência e possuem etiologia multifatorial, sofrendo influência de múltiplos componentes genéticos e ambientais (BAYLIS et al., 2013).

Pouco se tem investigado sobre o fenômeno do “inflammageing” em animais de companhia, porém está claro que a gama de alterações que ocorre no sistema imune de cães idosos é praticamente idêntica a que caracteriza a imunossenescência em seres humanos, gatos e cavalos (DAY, 2010).

Pesquisas indicam comprometimento das funções imunes mediadas por células com o avançar da idade em cães e gatos. Ocorre redução sanguínea de células T CD4+, elevação no subconjunto CD8+ e redução da proporção CD4:CD8. A capacidade dos linfócitos do sangue em responder ao estímulo de mitógenos diminui, assim como a resposta de hipersensibilidade cutânea tardia. Porém, há relativa preservação da capacidade da resposta imune humoral. A imunoglobulina (Ig) A do soro e saliva tem aumento de produção e a concentração de IgG permanece inalterada com a idade em cães (DAY, 2010). Este panorama geral não foi totalmente corroborado, no entanto, por Gomes et al. (2011) que verificaram em cães beagles idosos menor quantidade de linfócitos T e B e de leucócitos, quantidade semelhante de linfócitos T CD4+ e menor de linfócitos T CD8+, em comparação com beagles adultos.

Essas mudanças de linfócitos no sangue periférico parecem refletir a redução das células T dentro da lâmina própria intestinal de cães idosos, com menor atividade proliferativa das populações de células intestinais (DAY, 2010). O TGI é o maior órgão linfóide do corpo, desempenhando papel importante na imunidade local e sistêmica, incluindo: bloqueio de patógenos; modulação da resposta imune; tolerância oral aos antígenos (KLEINSCHMIDT et al., 2008). Como resultado, é

provável que estas consequências imunológicas do envelhecimento tenham impacto na saúde intestinal destes animais (GOMES, 2013).

Acredita-se, também, que estas mudanças imunológicas associadas ao intestino possam estar relacionadas com alterações na microbiota intestinal de cães idosos. Amostras fecais de cães mais velhos (idade média 11,4 anos) apresentaram mais bactérias aeróbias e anaeróbias em comparação com animais jovens (idade média de 10,8 meses). Os aumentos mais significativos foram no número de lactobacilos e clostrídios, representando espécies probióticas benéficas e potenciais agentes patogênicos, respectivamente (KEARNS et al., 2000).

Todos estes aspectos vêm sendo considerados por fabricantes de alimentos para animais de estimação, que têm investigado a imunossenescência e “inflammageing” no cão e gato, visando a formulação de dietas que poderiam reduzir esses processos (DAY, 2010).

2.3. O intestino e a nutrição

O intestino desempenha duas funções principais: 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, incluindo linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos (FERGUSON, 1994; CUNNINGHAM-RUNDLES; LIN, 1998; KLEINSCHMIDT et al., 2008).

A camada de muco é um componente estrutural do intestino, atuando na proteção, na lubrificação e no transporte entre o conteúdo luminal e o epitélio. As propriedades viscoelásticas do muco são derivadas de glicoproteínas denominadas mucinas, que consistem de domínios glicosilados e não-glicosilados. As mucinas são secretadas na superfície apical de células colunares altamente especializadas, as chamadas células caliciformes (LOBO et al., 2007).

Acredita-se existir população bacteriana complexa e diversificada no cólon (34 gêneros, incluindo 129 espécies), entre 10^{10} a 10^{11} unidades formadoras de colônias por mL de conteúdo, predominantemente integrada por anaeróbios, enquanto o

intestino delgado abriga população aeróbia de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônia por mL (SIMPSON, 1998; HUSSEIN; FLICKINGER; FAHEY-JR., 1999). Entre os gêneros bacterianos predominantes se destacam *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. (PATRA, 2011). Essas espécies bacterianas do cólon não só contribuem para a função fisiológica normal, mas também participam de forma significativa na etiologia ou na prevenção de várias doenças, biotransformando grande variedade de compostos ingeridos ou endógenos, desempenhando importante papel na saúde do hospedeiro (HUSSEIN; FLICKINGER; FAHEY-JR., 1999).

O conceito de “saúde intestinal” é complexo e definido de forma imprecisa. Os três principais componentes da saúde intestinal são a dieta, a mucosa e a microbiota intestinal. Fatores alimentares podem afetar a função metabólica do intestino, como por exemplo, cães que consomem dieta composta em sua maioria por produtos derivados de origem animal, com teores elevados de proteína, apresentam concentrações intestinais mais elevadas de compostos putrefativos, como aminas biogênicas, amônia, indol e fenol. Por outro lado, cães que consomem dietas com ingredientes que levam à fermentação láctica pelas bactérias intestinais, podem apresentar concentrações elevadas de acetado, propionato e butirato. Tem se interpretado que estes últimos levam à melhor nutrição e saúde do intestino (KUZMUK et al., 2005; BELOSHAPKA et al., 2014), mas em realidade não se sabe ao certo para cães a resposta da mucosa intestinal aos AGCC.

Pesquisas têm confirmado que a glutamina adquirida a partir do lúmen intestinal ou da corrente sanguínea é o principal substrato que sustenta as células epiteliais do intestino delgado (enterócitos). Quando a nutrição luminal falha, o fornecimento endógeno de glutamina a partir do catabolismo muscular ou da cetogênese hepática satisfazem as necessidades dos enterócitos. Já as células epiteliais do cólon (colonócitos) são alimentadas de forma diferente: os AGCC derivados da fermentação bacteriana de amido e proteínas são suas principais fontes de combustível, suprimindo cerca de 70% de suas necessidades. Estes não pode ser facilmente substituídos, exceto pelos corpos cetônicos proveniente da corrente sanguínea, mas estes compostos são menos eficientes no fornecimento de energia e menos abundantes (ROEDIGER, 1990). Diante disso, aumentar a

produção de AGCC, pela manipulação dietética da composição ou atividade metabólica da população bacteriana intestinal, tem sido assunto de bastante interesse. Busca-se nesta abordagem melhorar a saúde gastrointestinal, podendo ser também interessante de explorar para se tentar minimizar algumas das consequências do envelhecimento sobre o TGI.

2.4. Amido resistente

Encontrado em diversos alimentos, o amido é a mais importante fonte de carboidratos da dieta. Potencialmente digestível pelas enzimas do trato gastrointestinal, é absorvido na forma de glicose no intestino delgado (WALTER, 2005). Segundo Englyst; Kingman; Cummings (1992), o amido divide-se em três classificações de acordo com a velocidade com a qual o alimento é digerido *in vitro*: rapidamente digerível, quando, ao ser submetido à incubação com amilase pancreática e amiloglicosidase em uma temperatura de 37°C, converte-se em glicose em 20 minutos; lentamente digerível, se, nas condições anteriores, é convertido em glicose em 120 minutos; amido resistente (AR), que resiste à ação das enzimas digestivas.

O AR tem sido definido, em termos fisiológicos, como a soma do amido e dos produtos da sua degradação que não são digeridos e absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis. Deste modo, esta fração do amido apresenta comportamento similar ao da fibra alimentar, e tem sido relacionada a efeitos benéficos locais, no intestino grosso, e sistêmicos, através de uma série de mecanismos (LOBO; LEMOS SILVA, 2003). Pode-se dizer, então, que o AR é a fração do amido que não fornecerá glicose ao organismo, mas que será fermentada no intestino grosso para produzir, principalmente, gases, como o dióxido de carbono, metano e hidrogênio, ácidos orgânicos, como por exemplo, o ácido lático e AGCC, como o butirato, acetato e propionato (NUGENT, 2005; WALTER, 2005).

O amido resistente é dividido em quatro classes distintas: AR 1 a AR 4. O AR 1 representa o amido fisicamente inacessível à digestão, devido à presença de paredes celulares intactas em grãos, sementes ou tubérculos. O AR 2 são grânulos de amido não cozidos e nativos, tais como batata crua ou a banana, cuja

cristalinidade torna-os pouco susceptível a hidrólise. O AR 3 se refere ao amido retrogradado, resultante de aplicações de processamento de alimentos. Este é de particular interesse, devido à sua estabilidade térmica. Os processamentos dos alimentos que envolvem calor e umidade, na maioria dos casos destrói o AR 1 e o AR 2, mas pode formar o AR 3. O AR 4 representa amidos que são quimicamente modificados para se obter resistência à digestão enzimática (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010).

Os grãos, que possuem em sua composição de 50 a 90% de amido, são os ingredientes, quantitativamente, mais empregados na indústria de alimentos para cães e gatos, dentre estes o milho e o arroz são os mais utilizados no Brasil. Estruturalmente, o amido se encontra como partículas semi-esféricas altamente ordenadas denominadas grânulos, formadas por cadeias de amilose e amilopectina. A estrutura altamente ordenada do grânulo de amido confere a estes a característica de birrefringência, típica de substâncias cristalinas. De forma geral, os grânulos de amido são compostos majoritariamente por amilopectina, sendo esta fração mais susceptível à ação enzimática que a amilose.

Grânulos de amido são insolúveis em água à temperatura ambiente, possivelmente devido às várias pontes de hidrogênio presentes em sua estrutura. Isto limita o uso de grânulos crus na alimentação, tanto humana como animal (ROBERTI-FILHO, 2013). Durante o aquecimento em meio aquoso, os grânulos de amido sofrem mudanças em sua estrutura, envolvendo a ruptura das pontes de hidrogênio que estabilizam sua estrutura cristalina interna. Se o aquecimento prossegue com quantidade suficiente de água, rompe-se a região cristalina e a água entra, fazendo o grânulo romper-se e perder a birrefringência, processo este conhecido como gelatinização. Com a gelatinização, o amido torna-se mais facilmente acessível à ação das enzimas digestivas (LOBO; LEMOS SILVA, 2003).

A retrogradação ocorre quando o amido é cozido em água, acima de sua temperatura de gelatinização e em seguida resfriado, dessa forma, ocorre reestruturação do amido que se torna resistente à hidrólise por amilases, ou seja, resistente à digestão (KLEESSEN et al., 1997). Tecnicamente é possível aumentar o teor de AR 3 nos alimentos, modificando condições tais como pH, temperatura e

tempo de aquecimento, número de ciclos de aquecimento e resfriamento, congelamento e secagem (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010).

O AR possui inúmeros efeitos fisiológicos no cólon, como aumento do fluxo sanguíneo, redução do pH luminal e aumento da fermentação bacteriana; a maioria dos quais são provavelmente devido à ação dos AGCC produzidos (BIRKETT et al., 1996; DRONAMRAJU et al., 2008). Os AGCC são produtos de degradação bacteriana no cólon, principalmente no cólon proximal, onde a fermentação é maior. Acetato, propionato e butirato são importantes ânions no lúmen do intestino grosso: afetam a forma e função do colonócito; estimulam a absorção de sódio e fluidos; exercem efeitos proliferativos no colonócito (SCHEPPACH, 1994; NUGENT, 2005). As células epiteliais da mucosa do cólon chegam a obter de 60% a 70% de sua energia a partir de produtos de fermentação bacteriana gerados no lúmen do órgão (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991), pois o epitélio que reveste o TGI conta mais com o fornecimento de energia luminal que vascular (SCHEPPACH, 1994).

As bactérias anaeróbias estritas bacteróides, eubactérias, bifidobactérias e clostrídios são as maiores responsáveis pela fermentação do AR (SALGADO et al., 2005). Os AGCC e o lactato produzidos no processo reduzem o pH intestinal, produzindo ambiente mais favorável para lactobacilos e bifidobactérias, o que inibe a proliferação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli* ou *Clostridium difficile* (KLEESSEN et al., 1997). O AR apresenta potencial para ser considerado um prebiótico para várias espécies animais. Prebióticos são definidos como substratos de crescimento especificamente direcionados para bactérias benéficas, já residentes no cólon. São ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam o crescimento e a atividade metabólica de bactérias no cólon, melhorando assim a saúde do hospedeiro (NUGENT, 2005; MACFARLANE; MACFARLANE; CUMMINGS, 2006).

Dentre os AGCC, o butirato é conhecido por representar a principal fonte de combustível para o colonócito, sendo essencial para a saúde da mucosa. Foi mostrado que a ausência de butirato possui efeitos deletérios na mucosa do cólon (MOREAU et al., 2003), resultando em sua atrofia (JACOBASCH et al., 1999). O desenvolvimento de diversas colites em animais e seres humanos está associado à ausência de AGCC (ROEDIGER, 1990; JACOBASCH et al., 1999; MOREAU et al., 2003). A maior parte do butirato serve de substrato para a produção aeróbia de

trifosfato de adenosina (ATP) e como metabólito sinalizador, estimulando especificamente a migração e proliferação de células das criptas. Protege, também, a mucosa contra o estresse oxidativo e possui propriedades anti-inflamatórias. Aumento da diferenciação celular está ligado à redução na membrana basal da proteína ligada à laminina. Tanto na colite ulcerativa quanto no câncer de cólon, existe perda de laminina. Além disso, as colites são caracterizadas por aumento na taxa de apoptose e a proliferação celular mediada pelo butirato pode normalizar o padrão de diferenciação do epitélio nas células da cripta (JACOBASCH et al, 1999; HAENEN et al., 2013). Já os ácidos acéticos e propiônico são absorvidos e metabolizados, proporcionando substratos para a lipogênese e cetogênese (SALGADO et al., 2005). O acetato promove aumento do fluxo sanguíneo no cólon e a motilidade do íleo (SCHEPPACH, 1994).

O muco também desempenha importante papel protetor e imunológico, enquanto fornece ambiente para a microbiota do cólon, sendo influenciado pela concentração luminal de butirato. As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, responsáveis pelas propriedades físicas do muco intestinal. Tem sido mostrado que o butirato afeta a expressão *in vitro* dos genes MUC, codificando o núcleo proteico das mucinas, bem como a produção de mucina e sua composição *in vivo*. A composição do muco é alterada pela quantidade de fibra dietética, pela microbiota e por suas mútuas interações. O aumento nas mucinas ácidas pode ser, em parte, consequência do efeito prebiótico do AR, alterando a população microbiana do cólon em favor das espécies produtoras de butirato (BAUER – MARINOVIC et al., 2006).

Em um estudo realizado por Hedemamm e Knudsen (2007), 24 porcos recém desmamados foram divididos em três grupos, que receberam 0, 8% ou 1,6% de amido resistente de batata por quilograma de ração, por 12 dias. Os porcos que comeram a dieta com mais AR apresentaram vilos maiores que os porcos que comeram o teor intermediário, que apresentaram por sua vez criptas mais profundas. O peso do cólon aumentou em suínos alimentados com AR, o que coincidiu com o aumento da profundidade das criptas no cólon. A concentração de AGCC no intestino grosso aumentou com o aumento da quantidade de AR. A proporção de ácido acético diminuiu e a proporção de ácido butírico aumentou em porcos

alimentados com 80 e 160 g de AR. O aumento da produção de AGCC, especialmente de butirato, pode explicar o maior desenvolvimento do cólon.

Em estudo conduzido por Jacobasch et al., (1999), foi induzida colite ulcerativa em ratos pela administração de ácido sulfônico trinitrobenzeno. Estes animais foram separados em dois grupos, que se diferenciavam pela dieta com presença de AR proveniente da ervilha ou dieta livre de AR. Foi verificado mais precocemente melhora da inflamação do cólon nos ratos alimentados com AR. Este benefício coincidiu com a ativação da proliferação das células epiteliais do cólon e a subsequente restauração da apoptose.

Outros efeitos do amido resistente, mediado pela sua fermentação incluem prevenção do câncer de cólon, alteração do metabolismo de lipídeos, glicose e insulina, aumento da absorção de minerais, recuperação de diarreias e influência na função imune (NUGENT, 2005). O butirato favorece a reversão de alterações neoplásicas, podendo afetar a expressão gênica, induzir parada do ciclo celular e mesmo da apoptose (morte celular programada naturalmente, que remove DNA danificado, não desejado ou células velhas) de colonócitos. Acredita-se que ele regule a expressão de proteínas envolvidas na diferenciação de várias linhagens celulares de tumor, retardando as taxas de crescimento das mesmas (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991; BAUER-MARINOVIC et al., 2006).

Em relação ao metabolismo lipídico, estudos em ratos alimentados com dietas contendo AR (25% batata crua) demonstraram aumento marcado do tamanho do ceco, do conteúdo de AGCC no ceco e sua absorção sanguínea e redução da absorção de colesterol e de triglicerídeos. Além disso, houve menor concentração de colesterol em todas as frações de lipoproteínas, especialmente na HDL1(lipoproteína de alta densidade) e diminuição da concentração de triglicerídeos na fração de lipoproteínas rica em triglicerídeos (MUIR; YOUNG; O'DEA, 1994; SAGILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). O amido resistente ainda aumenta a sua absorção ileal de uma variedade de minerais, como ferro e cálcio em ratos e seres humanos (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010).

O pH ácido, formado a partir da fermentação do AR, favorece a vasodilatação e aumenta a absorção de água e eletrólitos, fornecendo poderosa força motriz para o movimento de água para fora do lúmen do cólon, melhorando o quadro clínico de

indivíduos com diarreias (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991; SALGADO et al., 2005). O AR também influencia a função imune, particularmente a redução da produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral alfa) e a expressão de um número de receptores nos linfócitos T e B e nos macrófagos, que são necessários para o início de respostas imunes, proporcionando benefícios reais para pacientes com doença inflamatória no intestino (NUGENT, 2005). Com isto verifica-se que o AR estimula o sistema imune local (GALT- gut associated lymphoid tissues), modula os parâmetros imunes sanguíneos, modula a síntese de DNA estimulada pelo butirato, estimula o crescimento normal e inibe o crescimento anormal de células, favorecendo a recuperação da inflamação epitelial (BROUNS; KETTLITZ; ARRIGONI, 2002).

2.5. Processamento de rações para cães

Até o presente momento existem poucos estudos a respeito do efeito de mudanças no processamento sobre o aproveitamento dos nutrientes para animais de companhia. A maior parte dos alimentos para cães e gatos é processada por extrusão. Durante a extrusão, as dietas sofrem mudanças físicas e químicas que alteram a qualidade física e nutricional de seu amido (KVAMME; PHILLIPS, 2003). O processamento do amido, incluindo sua moagem e cozimento na extrusora, é fundamental para aumentar sua digestibilidade para os carnívoros.

Em relação ao tamanho das partículas, tem-se como regra geral que quanto mais finamente moído, melhor a digestibilidade, mas isto não é sempre verdadeiro (CARCIOFI, 2008). Estudo feito por Bazolli (2015) avaliou o efeito da moagem de três cereais (arroz, milho e sorgo) em alimentos extrusados para cães. Foi verificado que o aumento da granulometria das dietas, de 277 μm para 521 μm para o arroz, de 360 a 619 μm para o milho e de 314 a 594 μm para o sorgo resultou em diminuição do índice de gelatinização do amido e redução do coeficiente de digestibilidade aparente de alguns nutrientes. Foi observado que este efeito variou segundo o ingrediente testado, sendo o tamanho de partículas determinante para o sorgo, mas menos importante para o arroz. Particularmente o milho e o sorgo

moídos mais grosseiramente induziram expressivo aumento do butirato nas fezes dos cães avaliados. Roberti-Filho (2013) verificou, em ração para cães tendo milho como fonte de amido, que o aumento do tamanho de partículas da matéria prima e a redução da transferência de energia mecânica específica resultaram em grânulos de amido mais intactos, nos quais a hidratação e transferência de calor são mais difíceis. Esta situação resultou em redução na porcentagem de gelatinização do amido e aumento de mais de 4 vezes na quantidade de AR das rações. Como resultado houve diminuição da digestibilidade dos nutrientes, aumento de butirato e AGCC totais nas fezes e redução das respostas pós-prandiais de glicose e insulina dos cães.

Por um período a qualidade de um alimento era estritamente associada com alta digestibilidade e produção de pequenas quantidades de fezes. Atualmente este conceito mudou, estando orientado para dietas que promovam outros benefícios à saúde (CARCIOFI; JEREMIAS, 2010). Dentro deste novo paradigma, processar adequadamente deixou de ser moer o mais finamente possível e gelatinizar o amido completamente. A obtenção de AR durante o processamento das rações pode ser maneira de se produzir alimentos mais saudáveis, com benefícios adicionais à saúde intestinal e saúde geral dos animais.

3. Objetivos

Considerando o exposto, foi avaliado neste estudo o consumo por cães idosos de amido resistente obtido durante o processo de extrusão de ração à base de milho, avaliando seus efeitos sobre o coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia, produtos de fermentação bacteriana e as características histológicas e morfométricas da mucosa intestinal.

4. Referências Bibliográficas

ABINPET - **Brasileiros gastaram 16,7 bilhões com bichos de estimação em 2014**. Editora Stilo, São Paulo. Disponível em: <<http://editorastilo.com.br/revista-pet-food/item/4257-brasileiros-gastaram-r-16-7-bilhoes-com-bichos-de-estimacao-em-2014>>. Acesso em 04 de julho de 2015.

BAUER-MARINOVIC, M.; FLORIAN, S.; MULLER-SCHMEHL, K.; GLATT, H.; JACOBASCH, G. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. **Carcinogenesis**, vol.27, no.9, pp.1849–1859, 2006.

BAYLIS, D.; BARTLETT, D. B.; PATEL, H. P; ROBERTS, H. C. Understanding how we age: insights into inflammaging. **Longevity & Healthspan**, 2:8, 2013.

BAZOLLI, R. S., VASCONCELLOS, R. S., DE-OLIVEIRA, L. D., SÁ, F. C., PEREIRA, G. T., CARCIOFI, A. C. Effect of the particle size of maize, rice, and sorghum in extruded diets for dogs on starch gelatinization, digestibility, and the fecal concentration of fermentation products. **American Society of Animal Science**; 93:1-11, 2015.

BELOBRAJDIC, D. P.; KING, R. A; CHRISTOPHERSEN, C. T.; BIRD, A. R. Dietary resistant starch dose-dependently reduces adiposity in obesity-prone and obesity-resistant male rats. **Nutr Metab (Lond)**, Oct 25;9(1):93, 2012.

BELOSHAPKA, A. N.; ALEXANDER, L. G.; BUFF, P. R.; SWANSON, K. S. The effects of feeding resistant starch on apparent total tract macronutrient digestibility, faecal characteristics and faecal fermentative end-products in healthy adult dogs. **Journal of Nutritional Science**, vol. 3, e38, page 1 of 5, 2014.

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.

BIRKETT, A., MUIR, J., PHILLIPS, J., JONES, G., O'DEA, K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. **Am J Clin Nutr**, 63:766-72, 1996.

BROUNS, F.; KETTLITZ, B.; ARRIGONI, E. Resistant starch and “the butyrate revolution”. **Food Science & Technology**, 13, 251–261, 2002.

CANIZZO, E. S.; CLEMENT, C. C.; SAHU, R.; FOLLO, C.; SANTAMBROGIO, L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence., **Journal of Proteomics**, 74, 2313 – 2323, 2011.

CARCIOFI, A. C. Fontes de Proteína e Carboidratos para Cães e Gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 28-41, 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, Clearwater. **Proceedings...** Clearwater, p. 62-67, 2010.

CARCIOFI, A. C.; JEREMIAS, J. T. Progresso Científico sobre nutrição de animais de companhia na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia (Online)**, v. 39, p. 35-41, 2010.

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.

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

DEBRAEKELEER, J.; GROSS, K. L.; ZICKER, S. C. Feeding Mature Adult Dogs: Middle Aged and Older. In: Hand, M.; Thatcher, C.; Remilard, R.; Roudebush, P.; Novotny, B. **Small Animal Clinical Nutrition**. Mark Morris Institute, p.273-280, 2010.

DRONAMRAJU, S. S.; COXHEAD, J. M.; KELLY, S. B.; BURN, J.; MATHERS, J. C. Cell kinetics and gene expression changes in colorectal cancer patients given resistant starch: a randomised controlled trial. **Gut**, 58:413-420, 2008.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **Eur. J. Clin. Nutr.** 46 (Suppl. 2):33, 1992.

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

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.

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.

FERGUSON, L. R.; TASMAN-JONES, C.; ENGLYST, H. HARRIS, P. J. Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. **Nutrition and Cancer**, v. 36, p. 230-7, 2000.

FORTNEY, W. Declining Physiological Reserves: Defining Aging. In: PROCEEDINGS OF THE COMPANION ANIMAL NUTRITION SUMMIT - FOCUS ON GERONTOLOGY, Clearwater. **Proceedings...** Clearwater, p. 01-05, 2010.

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.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. **Gerontol A Biol Sci Med Sci**, June;69(S1):S4–S9, 2014.

FUENTES-ZARAGOZA, E.; RIQUELME-NAVARRETE, M. J.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Resistant starch as functional ingredient: A review. **Food Research International**, 43, 931–942, 2010.

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

GOMES, M.O.S. **Microbiota fecal, produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa intestinal e imunidade de cães beagles de diferentes idades**. 2013. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

HAENEN, D.; ZHANG, J.; SILVA, C. S.; BOSCH, G.; VAN DER MEER, I.; VAN ARKEL, J.; VAN DEN BORNE, J. J. G. C.; GUTIERREZ, P. O.; KEMP, H. S. B.; MULLER, M.; HOOVELD, G. J. E. J. A Diet High in Resistant Starch Modulates Microbiota Composition, SCFA Concentrations, and Gene Expression in Pig Intestine. **The Journal of Nutrition**, 143: 274–283, 2013.

HEDEMANN, M. S.; KNUDSEN, K. E. B. Resistant starch for weaning pigs — Effect on concentration of short chain fatty acids in digesta and intestinal morphology. **Livestock Science**, 108, 175–177, 2007.

HUSSEIN, S. H.; FLICKINGER, E. A.; FAHEY-JR., G. C. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **The Journal of Nutrition**, 129: 1454S–1456S, 1999.

JACOBASCH, G.; SCHMIEDL, D.; KRUSCHEWSKI, M.; SCHMEHL, K. Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel disease. **Int J Colorectal Dis**, 14:201–211, 1999.

KEARNS, R. J.; HAYEK, M. G.; SUNVOLD, G. D. Microbial changes in aged dogs. In: **Recent Advances in Canine and Feline Nutrition**, Reinhart, G. A.; Carey, D. P., Eds., Iams Company, pp. 337-351, 2000.

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.

KLEESSEN, B.; STOOF, G.; PROOL, J.; SCHMIEDL, D.; NOACK, J.; BLAUT, M. Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. **J ANIM SCI**, 75:2453-2462, 1997.

KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; EGERT, M.; MAATHUIS, A.; RAJILIC-STOJANOVIC, M.; DE GRAAF, A. A.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; VENEMA, K. Linking phylogenetic identities of bacteria to starch fermentation in an in vitro model of the large intestine by RNA-based stable isotope probing. **Environ Microbiol.**, Apr;11(4):914-26, 2009.

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.

KVAMME, J. L., PHILLIPS, T. D. **Petfood Technology**. Mt. Morris: Watt, Illinois, 576p., 2003.

LARSEN, J. A.; FARCAS, A. Nutrition of Aging Dogs. **Vet Clin Small Anim.** n° 14, p. 741-759, 2014.

LOBO, A. R.; LEMOS SILVA, G. M. L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Rev. Nutr.**, v.16, n.2, p. 219-226, 2003.

LOBO, A. R., COLLI, C., ALVARES, E. P., FILISETTI, T. M. C. C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **British Journal of Nutrition**, 97, 776-785, 2007.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Aliment Pharmacol Ther**, 24, 701-714, 2006.

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 stem cell compartment. **Metabolism**, v. 52, p. 1400-5, 2003.

MOREAU, N. M.; MARTIN, L. J.; TOQUET, C. S.; LABOISSE, C. L.; NGUYEN, P. G.; SILIART, B. S.; DUMON, H. J.; CHAMP, M. M. J. Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in

dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **British Journal of Nutrition**, 90, 75–85, 2003.

MUIR, J. G.; YOUNG, G. P.; O'DEA, K. Resistant Starch – Implications for Health. **Proc. Nutr. Soc. Aust.**, 18, p. 23-32, 1994.

NUGENT, A. P. Health properties of resistant starch. **Nutrition Bulletin**, 30, 27–54, 2005.

PANICKAR, K. S.; JEWELL, D. E. The beneficial role of anti-inflammatory dietary ingredients in attenuating markers of chronic low-grade inflammation in aging. **Horm Mol Biol Clin Invest**, 23(2): 59–70, 2015.

PATRA, A. K. Responses of feeding prebiotics on nutrient digestibility, faecal microbiota composition and short-chain fatty acid concentrations in dogs: a meta-analysis. **Animal**, 5:11, pp 1743–1750, 2011.

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.

POLESI, L. F. Amido Resistente: Aplicações e Métodos de Produção. **B. Ceppa**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 211-222, 2011.

RESPONDEK, F.; SWANSON, K. S.; BELSITO, K. R.; VESTER, B. M.; WAGNER, A.; ISTASSE, L.; DIEZ, M. Short-chain fructooligosaccharides influence insulin sensitivity and gene expression of fat tissue in obese dogs. **J Nutr.** Sep;138(9):1712-8, 2008.

ROBERTI-FILHO, F. O. **Influência da granulometria da matéria prima e da configuração de extrusora no conteúdo de amido resistente, digestibilidade, fermentação intestinal e respostas metabólicas de cães.** 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

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

SAGILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant Starch-A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol 5, 2006.

SALGADO, S. M.; FARO, Z. P.; GUERRA, N .B.; LIVERA, A. V. S. Aspectos Físico-Químicos e Fisiológicos do Amido Resistente. **B. CEPPA**. Curitiba, vol 23, nº 1, p. 109-122, jan/jul, 2005.

SCHEPPACH, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**, supplement 1: S35-S38, 1994.

SCHWIERTZ, A.; LEHMANN, G.; 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.

SIMPSON, W. J. Diet and Large Intestinal Disease in Dogs and Cats. **The Journal of Nutrition**, 2717S-2722, 1998.

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.

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

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

WALTER, M. **Amido Resistente: Metodologias de Quantificação e Resposta Biológica em Ratos**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

WÄCHTERSCHÄUSER, A.; STEIN, J., 2010. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. **Eur J Nutr** 39 : 164–171, 2000.

CAPÍTULO 2 - Uso de amido resistente na promoção da saúde intestinal de cães idosos: formação de produtos de fermentação e características histológicas da mucosa intestinal¹

Mayara Corrêa Peixoto^a, Érico de Mello Ribeiro^b, Ana Paula Judice Maria^c Bruna Agy Loureiro^d, Ludmilla Geraldo Di Santo^e, Thaila Cristina Putarov^f, Franz Naoki Yoshitoshi^g, Lilian Rose Marques de Sá^h, Aulus Cavalieri Carciofiⁱ *

^{a, b, c, d, e, f, i} Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP 14.884-900, Brasil.

^g Vetco Diagnóstico Veterinário, Av. Indianópolis 2867, São Paulo, SP 04063-005, Brasil.

^h Universidade de São Paulo – USP, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05.508-270, Brasil.

* Correspondência: Tel.: +55 (16) 3209-7245

Email: aulus.carciofi@gmail.com (A. C. Carciofi)

¹ Escrito nas normas da revista The Veterinary Journal

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos do consumo de amido resistente (AR) em cães idosos sobre a digestibilidade dos nutrientes, produtos de fermentação, IgA fecal e as características histológicas da mucosa intestinal. Uma mesma formulação foi processada de dois modos diferentes, originando ração com baixo (0,21%) e elevado (1,46%) teor de AR. Os resultados de consumo, digestibilidade, produtos de fermentação e IgA foram avaliados pela função GLM do SAS, considerando esquema fatorial 2x2, com dois tempos e dois tratamentos. Os dados de morfometria das criptas do intestino grosso foram analisados pelo teste T-pareado. Os resultados histológicos das biopsias intestinais foram avaliados por estatística não paramétrica, utilizando-se o teste de Wilcoxon para dados pareados ($P < 0,05$). A digestibilidade da proteína ($P = 0,002$) e do extrato etéreo ($< 0,001$) foi maior na dieta com menos AR. Quando alimentados com a ração com mais AR, as fezes dos cães apresentaram menor pH, maiores teores de propionato, butirato, ácidos graxos voláteis totais e lactato ($P < 0,05$). À análise histológica, não houve diferença significativa em nenhum parâmetro quando comparado os dados obtidos no final do período de consumo da ração com baixo AR e da ração com elevado AR. À análise morfométrica, foi observada ao aumento das criptas do cólon descendente dos cães que consumiram a ração com elevado AR ($P = 0,083$). No presente estudo, mesmo apresentando efeitos sobre os produtos de fermentação bacterianos e pH fecal, não houve alterações benéficas significativas na mucosa gastrointestinal, que demonstram ser necessários mais estudos sobre o assunto em cães.

Palavras-chave: butirato, colonócito, inflamação, inflammaging.

Abstract

This study evaluated the effects of resistant starch (RS) consumption on nutrient digestibility, fermentation products, histologic and morphometric characteristics of the intestinal mucosa of elderly dogs. A basal diet was processed in two different extrusion conditions and two treatments were obtained: diet with low (0.21%) and high (1.46%) RS content. Feed intake, nutrient digestibility, fermentation products and fecal IgA were performed by GLM procedure of SAS considering a 2x2 factorial arrangement of treatments, two periods and two treatments. Morphometric characteristics from large intestine were evaluated by T-paired test. Histological evaluation of intestinal biopsy were assessed by non-parametric statistic using Wilcoxon test for paired data ($P < 0.05$). Protein ($P = 0.002$) and fat ($P < .001$) digestibility were higher for diet with low-RS. Dogs receiving high-RS diet had lower fecal pH and higher fecal concentration of propionate, butyrate, total volatile fatty acid and lactate ($P < 0.05$). In the histological analysis, no significant difference in any parameters compared the data obtained at the end of feed consumption period with low AR and feed with high AR. In the morphometric analysis showed the increase in descending colon crypts of dogs fed diet with high AR ($P = 0.083$). Even with effects on bacteria fermentation products and fecal pH, there were no significant beneficial changes on gastrointestinal mucosa, which implies that more studies on this issue are required.

Key-words: butyrate, colonocytes, inflammation, inflammaging

Introdução

O envelhecimento pode ser definido como mudanças progressivas que ocorrem após a maturidade em vários órgãos, conduzindo a uma diminuição na sua capacidade funcional (FAHEY JR. et al., 2008).

Algumas mudanças do TGI relacionadas à idade incluem alterações anatômicas, como a morfologia intestinal, em que os cães mais velhos apresentam menor área de superfície das vilosidades do duodeno, menor altura das vilosidades do jejuno e profundidade maior das criptas do cólon (LARSEN; FARCAS, 2014).

Em geral, a motilidade e as funções de absorção do intestino delgado permanecem intactos em idosos saudáveis e estudos mostram que não há mudanças relacionadas à idade na absorção e digestibilidade de nutrientes em cães (SHEFFY et al., 1985; GOMES et al., 2011). Entretanto, a microbiota e as concentrações dos produtos de fermentação são alteradas no trato gastrointestinal do idoso (KUZMUK et al., 2005).

O amido resistente (AR) se refere à porção do amido e de produtos do amido que resistem à digestão no trato gastrointestinal (NUGENT, 2005). A presença de amido não digerido ou resistente, que tem potencial para ser considerado um prebiótico, pode afetar o cólon através de seus efeitos sobre o volume fecal, fermentação bacteriana, redução do pH fecal e aumento da excreção fecal do butirato (BIRKETT, 1996; SIMPSON, 1998).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são produtos da fermentação bacteriana do AR e principais substratos para o metabolismo da energia no colonócito, especialmente o butirato, agem como fatores de crescimento para o epitélio saudável. Na mucosa inflamada, o butirato estimula a regeneração dos tecidos doentes do intestino e pode ter um papel na prevenção de algumas colites (BROUNS, 2002; SCHEPPACH, 1994).

Mediante o exposto, foi avaliada a digestibilidade dos nutrientes e da energia, a concentração de produtos de fermentação nas fezes e as características histológicas da mucosa gastrointestinal de cães idosos, alimentados com diferentes teores de AR.

Material e métodos

O protocolo experimental realizado está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP – Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 01742/14).

Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada” do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Animais e delineamento experimental

Foram utilizados oito cães beagle idosos, seis machos e duas fêmeas, com idade média de $11,5 \pm 0,38$ anos, peso corporal médio de $13,4 \pm 0,43$ kg, considerados hígidos após avaliação clínica, hematológica, bioquímica sérica e coproparasitológica. Todos os cães foram provenientes do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos, UNESP, Jaboticabal, Brasil.

O experimento seguiu delineamento simples com amostras pareadas, composto por dois tratamentos (rações), oito animais e dois períodos, de modo que todos receberam as duas rações, totalizando oito repetições por ração. Cada período teve duração de 61 dias, realizando-se: do dia 1 ao 51 adaptação à dieta; do dia 52 ao 57 coleta total de fezes para avaliação da digestibilidade dos nutrientes; do dia 58 a 60 coleta de fezes frescas (imediatamente após defecação) para avaliação de produtos de fermentação e determinação de IgA; no dia 61 realização de endoscopia e colonoscopia. Entre os dois períodos houve 30 dias de washout, quando os cães receberam a ração habitual empregada no canil (Sabor e Vida, Guabi Petcare, Campinas, Brasil. Composição: 12% de umidade, 21% de proteína, 10% de extrato etéreo, 3% de fibra

bruta e 8% de matéria mineral). Cada animal foi submetido a duas endoscopias, que ocorreram ao final de cada período experimental.

Do dia experimental 1 ao 51 os cães permaneceram em baias com solário, com 1,5m x 3,5m, sendo soltos diariamente em gramado com 200m² para prática voluntária de exercícios. Dos dias 52 ao 61 estes foram alojados em gaiolas metabólicas individuais em aço inoxidável, com dimensões de 90 x 90 x 90 cm, equipadas com aparato para coleta separada de fezes e urina. A quantidade de ração administrada aos animais foi inicialmente calculada de acordo com o valor energético da ração, estimado com base em sua composição química e a necessidade energética de cães de canil, de 130 kcal/kg^{0,75} (NRC, 2006). A quantidade total diária de ração foi dividida em duas refeições iguais, fornecidas às 9h e às 15h. Água foi oferecida à vontade.

Dietas experimentais e parâmetros de extrusão

O experimento incluiu duas rações experimentais, uma com baixo teor de AR e outra com maior teor. Foi formulada uma dieta para manutenção de cães, cuja composição química atendeu às recomendações nutricionais da FEDIAF (2011). A partir dessa única formulação, duas rações experimentais foram produzidas diferindo pelo grau de moagem dos ingredientes e os parâmetros de extrusão empregados. Estas foram produzidas na Fábrica de Rações Experimentais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Todos os ingredientes foram comprados e misturados, formando-se um lote único de produto. Este foi dividido em duas partes, a primeira foi moída em moinho de martelos (Tigre, São Paulo, SP) utilizando-se peneira com crivos de 0,5mm, e a segunda moída com peneira com crivos de 2mm. O procedimento gerou misturas de matérias primas com diferentes granulometrias. O tamanho geométrico médio das rações moídas foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Zanotto e Bellaver (1996).

Cada dieta, obtida a partir da moagem diferente, foi extrusada em extrusora de rosca simples com capacidade de processamento de 250 kg de ração/hora (MEX 250, Manzoni, Campinas, SP). A densidade dos extrusados (g/L) foi determinada

apenas quando o sistema atingiu a estabilidade, sendo a partir deste momento registrada a cada 10 minutos. Esta foi determinada medindo-se o peso em gramas correspondente à quantidade de kibbles que preenchia o volume de 1 litro. A temperatura do pré-condicionador da extrusora foi mantida à 63.8°C para a ração com baixo AR e 58.6°C para a ração com elevado AR por meio da injeção de vapor direto. Os alimentos foram extrusados com teor de umidade médio no canhão da extrusora de 25%. A transferência de energia mecânica específica foi determinada de acordo com Riaz (2003). Esta foi modulada ajustando-se a área de vazão de saída da matriz, que foi estabelecida para a ração com baixo AR em 230mm²/tonelada/hora e em 310mm²/tonelada/hora para a ração com elevado AR. Devido a interação entre tamanho de partículas da matéria prima e restrição de área aberta da matriz, a energia mecânica específica transferida à massa de ração durante a extrusão foi de 21.5±0.54 kW-h/ton para a ração baixo AR e de 11.6±0.39 kW-h/ton para a ração elevado AR. A temperatura de extrusão foi próxima de 112°C e de 108°C bem como a pressão de extrusão, de 39 e 41.6 bars, respectivamente para as rações com baixo e elevado AR.

Após a extrusão os extrusados foram secos em secador contínuo de ar forçado, aquecido a 105°C e posteriormente recobertos com óleos e palatilizantes. A composição química das rações e parâmetros de qualidade dos kibbles estão apresentados na Tabela 1.

Determinação da digestibilidade dos nutrientes e análises químicas dos alimentos e fezes

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia das dietas foram determinados pelo método de coleta total de fezes, segundo recomendações da AAFCO (2009).

Nas fezes e rações foram determinados, segundo metodologia descrita pela AOAC (1995), os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA) e matéria mineral (MM). O amido total foi avaliado pela técnica adaptada de KARKALAS, (1985); HOLM et al., (1986). A energia bruta (EB) das fezes e rações foi determinada em bomba calorimétrica adiabática (1281, PARR Instruments,

Moline, EUA). Adicionalmente, nas rações foi determinado o conteúdo de amido resistente e a porcentagem de gelatinização do amido. O teor de amido resistente foi determinado empregando-se as enzimas amilase e amiloglicosidase, segundo metodologia da AOAC (2002), com a utilização de kit comercial (kit K-RSTAR, Megazyme, Wicklow, Irlanda). A porcentagem de gelatinização do amido foi determinada pelo método da amiloglicosidade (SÁ et al., 2013). Todas as análises laboratoriais foram conduzidas em duplicata, sendo repetidas quando variaram mais de 5%.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados a energia metabolizável e os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, extrato etéreo em hidrólise ácida, amido e energia bruta. Além destas análises, a qualidade das fezes foi determinada pelo escore fecal. Este foi determinado ao longo do período de coleta de fezes, atribuindo-se notas de 0 a 5 (CARCIOFI et al., 2008).

Avaliação do pH e produtos de fermentação nas fezes

Amostras de fezes frescas (coletadas e processadas até no máximo 15 minutos após defecação) foram utilizadas para medir o pH e determinar alguns produtos de fermentação. O pH foi determinado utilizando-se dois gramas de material fecal diluídos em seis mililitros de água miliq (1:3 w/w) e o pH medido com pH-metro de precisão 0,01 pH (Digicrom Analítica Ltda, modelo DM20). O procedimento foi realizado em cada um dos três dias de coleta e a média destes valores empregada no estudo.

Para a análise dos AGCC e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), 10 gramas de fezes frescas foram homogeneizadas e misturadas com 30 mililitros de ácido fórmico 4,2 N (1:3 w/w). O procedimento foi repetido a cada um dos três dias de coleta. As concentrações dos AGCC e AGCR foram determinadas por cromatografia gasosa de acordo com ERWIN et al. (1961).

Para a determinação de ácido láctico foram utilizados cerca de três gramas de fezes frescas, imediatamente homogeneizadas e misturadas à nove mililitros de água destilada (w/v). O ácido láctico foi analisado de acordo com PRYCE (1969) pelo

método espectrofotométrico com leitura a 565nm (500 a 570nm). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%.

Para medir a concentração de amônia das fezes foi adaptada a metodologia de VIEIRA (1980). Foram utilizados os extratos preparados para dosagem de AGCC, compostas por alíquotas de dois mililitros, diluídas em 13 mililitros de água destilada (2:13 v/v) e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio (Tecnal TE - 036/1, Tecnal, Piracicaba, Brasil).

Quantificação da imunoglobulina A nas fezes

Para a quantificação de imunoglobulina A, foram utilizadas amostras de fezes frescas (coletadas e processadas até no máximo 15 minutos após defecação). A separação de IgA fecal foi realizada por extração salina de acordo com Peters et al. (2004). Para a determinação da concentração total de IgA no extrato de fezes foi utilizado kit de ELISA específico para IgA canina (Dog IgA Quantitative ELISA kit, Bethyl laboratories, Montgomery, EUA). A leitura foi realizada em leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology, Chantilly, Virginia, EUA) usando filtro de 450nm.

Análise histológica do estômago, intestino delgado e grosso

Para o procedimento de biópsia por endoscopia digestiva alta e colonoscopia, 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 de cada segmento: estômago, duodeno e jejuno e, após realização de enema, até 10 fragmentos da mucosa do íleo e até 10 fragmentos de cada segmento do cólon (ascendente, transverso e descendente) de cada animal.

Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e processados segundo técnica padrão com inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes seriados de 5µm e os fragmentos corados por hematoxilina e eosina (HE). Os

fragmentos de intestino grosso também foram corados pelo Ácido periódico de Schiff (PAS) e azul de alciano pH 2,5% (PAS-AB 2,5%) para avaliação qualitativa do muco ácido e neutro produzido pelas células caliciformes. O exame microscópico foi realizado por observador habilitado, sem acesso a qualquer informação sobre a identificação e as características de cada animal usado no experimento. As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz, utilizando microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse NiU, Japão) acoplado a câmara digital (DSU3, Nikon, Japão) e *software* Nis elements (Nikon, Japão) para captura de imagens.

Os fragmentos de mucosa de cada segmento do trato gastrointestinal foram analisados qualitativamente e semi quantitativamente segundo parâmetros de normalidade e gravidade descritos por Day et al. (2008).

A intensidade de presença das células inflamatórias foi graduada como: 0, ausência; 1, discreto número; 2, moderado infiltrado; 3, marcante infiltrado. A análise morfométrica quantitativa da profundidade das criptas foi conduzida nos segmentos de intestino grosso utilizando o sistema de análise de imagem Image Pro Plus (versão 4.5 para Windows, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Foram capturados cinco campos sequenciais dos fragmentos corados em HE e contado um número total de dez criptas no aumento de 20 vezes. A profundidade das criptas foi determinada a partir da média de três medidas, considerando apenas as criptas com orientação adequada, ou seja, perpendicular a muscular da mucosa.

Análise estatística

Após a obtenção das médias das variáveis quantitativas, foram verificadas as pressuposições de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros. Os dados obtidos durante o processamento de extrusão, consumo e digestibilidade dos nutrientes, parâmetros fecais, produtos de fermentação e IgA das fezes foram submetidos a análise de variância considerando esquema fatorial 2x2, com dois tempos e dois tratamentos (baixo AR e alto AR). Estes procedimentos foram realizados com auxílio do software Statistical Analysis System (Versão 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os dados de morfometria das criptas do intestino grosso foram analisados pelo teste T-pareado, comparando-se os resultados dentro

do tempo final (dia 61), o valor obtido mediante consumo da ração baixo AR versus consumo da ração elevado AR. Os resultados das análises histológicas dos fragmentos de mucosa e do tipo de mucina foram comparados pelo teste de Wilcoxon, dentro do tempo final (dia 61), o valor obtido mediante consumo da ração baixo AR versus consumo da ração elevado AR. Estas análises foram realizadas com auxílio do software estatístico Graphpad Prisma (Versão 5.04, Graphpad Software Inc). Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos e $P < 0.1$ como tendência.

Resultados

Ingestão e digestibilidade dos nutrientes e da energia

O peso corporal dos cães (Tabela 2) não variou entre tratamentos e manteve-se constante ao longo do experimento ($P > 0.05$). Durante o ensaio de digestibilidade, a ingestão de nutrientes não variou entre rações ($P > 0.05$). Os coeficientes de digestibilidade da proteína bruta ($P = 0.002$), do extrato etéreo ($P < 0.001$) e da energia ($P = 0.056$) foram maiores na ração com baixo teor de AR.

Produção e qualidade, pH, concentração dos produtos de fermentação e teores de IgA das fezes

A produção de fezes não foi influenciada pela dieta, assim como sua umidade ($P > 0.05$). O escore das fezes variou entre 3 e 4 para ambos os tratamentos, permanecendo dentro da faixa ideal no sistema empregado (Tabela 3). O valor de pH foi menor ($P < 0.001$) e as concentrações de ácido acético ($P = 0.082$), propiônico ($P < 0.001$), butírico ($P = 0.003$), AGCC ($P = 0.006$) e AGV totais ($P = 0.008$) foram maiores quando os cães receberam ração com elevado teor de AR. A concentração de AGCR totais não sofreu alteração com a dieta. A produção de amônia foi maior ($P = 0.051$) quando os animais receberam a dieta com baixo teor de AR, ao contrário do lactato, que se apresentou maior ($P = 0.043$) quando os cães consumiram a dieta

com elevado teor de AR. A concentração de IgA não diferiu estatisticamente nas fezes dos cães em relação ao tipo de alimento fornecido.

Análise histológica do estômago, intestino delgado e intestino grosso

A avaliação estatística da análise semi quantitativa do processo inflamatório não demonstrou diferença estatística para nenhum parâmetro comparando o final do período de consumo dos tratamentos com baixo e elevado teor de AR (Tabela 4) (Figuras 1, 2 e 3).

A análise qualitativa da mucosa do intestino grosso revelou ao final do consumo das rações experimentais, na mucosa do cólon ascendente, no grupo baixo AR que cinco animais apresentaram mucina neutra (5/8) e três mucina mista (3/8). Dentre os alimentados com elevado AR, cinco com predomínio de mucina neutra (5/8) e três com mucina mista (3/8). Na mucosa de cólon transversal, tanto no grupo baixo AR quanto no grupo elevado AR seis (6/8) cães apresentaram mucina neutra e dois animais (2/8), mista. No cólon descendente, dos cães alimentados com baixo AR, um animal (1/8) apresentou produção de mucina ácida, 6 animais (6/8) neutra e um animal (1/8), mista. Dentre os cães do grupo elevado AR cinco animais demonstraram mucina neutra (5/8) e três mucina mista (3/8).

Análise morfométrica do cólon

Comparando o período final de consumo das rações com baixo e elevado teor de AR, na análise morfométrica do cólon ascendente e transversal não demonstrou diferença estatística ($P>0.05$). No entanto, no cólon descendente, foi verificada tendência ao aumento do comprimento médio da cripta dos animais que foram alimentados com a ração com elevado AR ($P=0.08$) (Tabela 5) (Figura 4).

Discussão

No presente estudo, o amido resistente, escapando à digestão no trato gastrointestinal, foi fermentado por bactérias no cólon, produzindo concentrações consideráveis de AGCC e lactato e redução do pH e amônia fecais.

A ração finamente moída e extrusada com maior aplicação de energia mecânica específica apresentou elevado índice de gelatinização do amido e baixa quantidade de AR, enquanto a ração grosseiramente moída e que recebeu menos energia mecânica gerou menor porcentagem de gelatinização e maior teor de AR. Em seu estudo de mestrado, ROBERTI-FILHO (2013) já havia demonstrado a estreita correlação entre cozimento, moagem e teor de AR de rações para cães.

A influência da moagem na digestibilidade da proteína, gordura e energia pôde ser confirmada. Esta redução na digestibilidade dos nutrientes de alimentos produzidos com maiores granulometrias de ingredientes e menor tempo de cozimento é explicada pelo menor contato das enzimas digestivas com os nutrientes da dieta (AMERAH et al., 2007; BAZOLLI et al., 2015). O aumento na digestibilidade da proteína pode ser explicado pela desnaturação e realinhamento das cadeias de aminoácidos promovidas pela extrusão, que favoreceriam a hidrólise e absorção intestinal. No entanto, como não foi avaliada a digestibilidade ileal e apenas a digestibilidade total, é possível que parte dos resultados seja apenas aparente, resultado de maior crescimento de bactérias no cólon, a partir da maior oferta de nutrientes para estes microrganismos (amido que escapou à digestão no intestino delgado), e assim maior excreção de proteína microbiana pelas fezes dos cães alimentados com a ração elevado AR (ROBERTI-FILHO, 2013). A maior digestibilidade do extrato etéreo poderia, também, ser explicada pela maior exposição do conteúdo celular com a moagem e extrusão mais intensas, favorecendo a formação das micelas e absorção das gorduras.

No presente estudo, alteração de pH e produtos de fermentação foi verificada nas fezes dos cães após receberem a dieta com elevado AR, explicando porque o amido não foi recuperado nas fezes (BIRKETT et al., 1996; KLESSEN, 1997; FERGUSON et al., 2000; MOREAU et al., 2003; TODEN et al., 2006). A redução do pH se explica pela maior formação de AGCC e ácido láctico. Maior fermentação e redução do pH das fezes também foram encontradas para cães no estudo de

Roberti-Filho para as dietas com moagem mais grosseira e menor gelatinização do amido (2013).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos verificados para outras espécies, como maior produção de AGCC totais e especialmente butirato no intestino grosso de ratos (FERGUSON et al. 2000; HENNINGSSON et al. 2003), suínos (HEDEMANN & KNUDSEN, 1997; BIRD et al., 2007) e seres humanos (RAMAKRISHNA et al. 2000; RABBANI et al., 2001), o que foi considerado benéfico, pois a formação destes compostos é considerada indicativa de saúde intestinal (SWANSON et al., 2002; HAENEM et al., 2013; BELOSHAPKA et al., 2014).

A amônia é produto final da fermentação da proteína e em altas concentrações está relacionada coma formação de tumores. À semelhança do verificado no presente estudo, em estudo conduzido por Birkett et al. (1996), voluntários humanos que ingeriram dietas contendo diferentes quantidades de amido resistente apresentaram diminuição significativa nos metabólitos de proteínas, como reduções das concentrações de amônia fecal ($P < 0,01$). Isto é explicado pelo fato de que o carboidrato adicional fornecido como AR estimula a utilização da amônia para a síntese proteica bacteriana, diminuindo sua concentração luminal (SWANSON et al., 2002).

Existem poucas pesquisas relacionadas à administração de AR na dieta de cães. No presente estudo foi possível confirmar as hipóteses do estudo relativas à formação de amido resistente durante a extrusão. Mediante processamento direcionado à formação do composto, elevação de quase 7 vezes na quantidade de AR foi obtida. Esta abordagem de processamento industrial diferenciado se mostrou, assim, bastante eficaz, especialmente em se considerando que a formação de fezes pouco se alterou nos animais.

O objetivo principal do presente estudo, no entanto, era, além de verificar e quantificar a produção de AGCC e fermentação do AR no intestino grosso de cães, estudar o possível impacto de seu consumo na saúde intestinal e características histológicas da mucosa gastrointestinal, já que a hipótese deste trabalho se fundamentou em inúmeras publicações que demonstraram importantes benefícios à saúde intestinal advindos do consumo de AR.

A análise histológica da mucosa do trato gastrointestinal dos animais do estudo demonstrou em vários deles alterações de gastrite, enterite e colite. A gravidade da inflamação gastrointestinal tem sido frequentemente classificada em uma escala simples de quatro pontos: mucosa normal ou ausência de inflamação; inflamação leve; inflamação moderada; marcada inflamação (DAY et al., 2008). Os animais do presente estudo apresentaram inflamação variando de ausente a moderada, nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal.

Em colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrano em ratos (MOREAU et al., 2003), o consumo de dieta suplementada com AR resultou em menor ulceração e espessamento do cólon e maior síntese de mucina, em comparação à dieta não suplementada ou com adição de frutooligossacárides. Assim como no estudo de Jacobasch et al., (1999) em que houve melhora mais rápida na inflamação do cólon induzida em ratos que foram alimentados com dieta suplementada com AR em comparação com a dieta controle, livre de AR.

Ao contrário do esperado, frente à literatura disponível, não se encontrou evidências de melhora no aspecto histológico e inflamatório da mucosa gastrointestinal dos cães após consumo da dieta com elevado AR. Explicações para este fato inesperado podem não ser possíveis frente às variáveis estudadas e literatura disponível.

No estudo de Gomes (2013), os cães idosos apresentaram menos ácido butírico e tendência à redução de acetato, propionato e AGV totais nas fezes em comparações à cães filhotes ou adultos, alterações que foram sugeridas como possivelmente consequentes ou desencadeantes das alterações inflamatórias e estruturais verificadas ao exame histológico da mucosa gastrointestinal. Esta hipótese foi reforçada em outro estudo de nosso grupo de pesquisa, Maria (2013) verificou que cães idosos alimentados com dieta com fibra insolúvel não fermentável (fibra de cana) apresentarem mais inflamação em mucosa do que quando alimentados com ração que resultou em maiores produções de AGCC, lactato e menor pH de fezes (dieta com farelo de soja). Da mesma forma, estudos em outros modelos animais reforçam que o consumo de AR e subsequente formação de AGCC foi capaz de reduzir inflamação induzida experimentalmente (JACOBASCH et al., 1999; MOREAU et al., 2003; NOFRARÍAS et al., 2007).

Uma questão a se observar é que em muitos estudos houve indução experimental de inflamação e na presente pesquisa a inflamação da mucosa era crônica, possivelmente decorrente do processo de envelhecimento e possivelmente progressiva. Assim, é possível que as características da inflamação da mucosa gastrointestinal de cães idosos sejam particulares, ou diferentes das induzidas nos modelos experimentais, o que poderia explicar o não encontro de benefícios marcantes após a ingestão de AR.

O tempo de fornecimento do alimento e a quantidade de AR consumido são outras possíveis limitações. No presente estudo os cães foram alimentados com as dietas por 60 dias, o que poderia ser considerado suficiente em se considerando a elevada taxa de renovação e crescimento das células da mucosa gastrointestinal (BERLANGA-ACOSTA, 2001). No entanto, não se pode desconsiderar que um maior período de ingestão pudesse resultar em alterações diferentes. Fischer (2011) comparando diferentes fontes de fibra para gatos adultos, não encontrou diferença estatística em nenhum parâmetro morfométrico analisado; mesmo que a dieta com polpa de beterraba como fonte de fibra tenha produzido maiores concentrações de acetato, propionato, lactato e ácidos graxos totais. Uma provável explicação para o não encontro de alterações na mucosa do cólon dos gatos é que o tempo de consumo das dietas (18 dias) não tenha sido suficiente para tais modificações.

Quanto à concentração de AR, não há literatura disponível a esse respeito para cães. Em um dos poucos estudos relacionados com AR e sua administração para cães, Beloshapka et al., (2014) também questionaram qual seria a concentração necessária para afetar a saúde do intestino, já que não encontraram nenhum efeito significativo tanto na microbiota quanto na produção de AGCC administrando AR na forma de biscoitos com diferentes concentrações diárias para cada grupo (0, 2.5 e 5g de AR por dia) por 21 dias. Por fim, deve-se considerar que cães são carnívoros, e possivelmente as respostas de roedores, suínos ou seres humanos sejam diferentes das verificadas nestes animais. Talvez estudos *in vitro* com células da mucosa de cães possam esclarecer melhor como estes respondem às alterações nas concentrações lumbais de butirato e outros AGCC.

Pôde-se verificar, no entanto, que o aumento do butirato, redução de pH e aumento dos demais AGCC foi capaz de induzir alteração estrutural na mucosa do

cólon, com tendência ao aumento do comprimento das criptas no cólon descendente dos cães alimentados com a ração elevado AR. Dentro deste contexto, estudos com outras espécies corroboram com estes achados, demonstrando que a administração de carboidratos fermentáveis leva a um maior comprimento de vilosidades e criptas, podendo contribuir com maior absorção de nutrientes (KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2003; TSUKAHARA et al., 2003; WONG; GIBSON, 2003; HEDEMAN; KNUDSEN, 2007; LOBO et al., 2007; REBOLÉ et al., 2010).

O tipo de mucina produzida neste estudo não se alterou, apresentando, a maioria dos animais após o consumo de ambos os tratamentos, mucina neutra. Bauer-Marinovic et al. (2006), comparando os efeitos de três dietas para ratos, em que uma continha amido resistente tipo 3, encontrou um aumento significativo na mucinas ácidas e uma redução de mucinas neutras com AR 3 em comparação com a dieta controle no cólon distal. O que foi considerado benéfico, pois as mucinas ácidas formam uma melhor barreira contra a translocação bacteriana do que as mucinas neutras (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). Porém não há dados na literatura sobre o padrão de mucina normal para a espécie canina.

Em relação ao parâmetro imune avaliado, não foi observado alteração significativa, entre as dietas e a concentração de IgA fecal. O que diferiu do encontrado por Maria (2013), que comparou dietas com diferentes fontes de proteína para cães adultos e idosos e o consumo da dieta com farelo de soja resultou em maiores concentrações de IgA nas fezes tanto para o grupo adulto como idoso.

Swanson et. al. (2002) verificaram que cães alimentados com dieta suplementada com a combinação de mananoligossacarídeos mais fructooligossacarídeos apresentaram tendência ao aumento de IgA ileal ($P=0.052$) em relação ao grupo controle, o que sugere uma capacidade imunitária local melhorada e maior proteção contra a invasão patogênica.

Apesar da dieta com elevado teor de amido resistente ter provocado aumento significativo nas concentrações de AGCC, lactato e redução de amônia e pH fecal, estudos relatam que é necessário tempo para serem observadas subseqüentes alterações na mucosa (GEE et al., 1991; KLESSEN et al., 1997; HENNINGSSON et al., 2003), além disso é possível que o intestino do idoso seja menos capaz de se adaptar às mudanças (MANDIR et al., 2005).

Conclusão

Para os cães idosos deste trabalho, o amido resistente mesmo apresentando os efeitos sobre os produtos de fermentação bacterianos e pH fecal, não houve alterações benéficas significativas na mucosa gastrointestinal, o que pode ser explicado ou pelo tempo de administração da dieta não ter sido suficiente para provocar tais efeitos, ou pela sua concentração não ter sido alta o suficiente ou pelo fato de que a mucosa de cães idosos precisa de um tempo maior para se adaptar e sofrer as mudanças provocadas pela dieta.

Esses dados implicam na necessidade de mais estudos relacionados ao amido resistente e sua utilização para cães idosos.

Referências

Amerah, A. M., Ravindran, V., Lentle, R. G., Thomas, D. G., 2007. Feed particle size: implications on the digestion and performance of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.63, p. 439–55.

Association of American Feed Control Officials, 2009. AAFCO. **Official publication 2009**, Washington.

Association of the Official Chemists, 1995. Official and tentative methods of analysis. 16. ed. Arlington, **AOAC International**.

Association of the Official Chemists, 2002. Official and tentative methods of Analysis. 18. ed. Arlington, **AOAC International**.

Bauer-Marinovic, M., Florian, S., Muller-Schmehl, K., Glatt, H.; Jacobasch, G., 2006. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. **Carcinogenesis**, vol.27, no.9, pp.1849–1859.

Bazolli, R. S., Vasconcellos, R. S., de-Oliveira, L. D., Sá, F. C., Pereira, G. T., Carciofi, A. C., 2015. Effect of the particle size of maize, rice, and sorghum in extruded diets for dogs on starch gelatinization, digestibility, and the fecal concentration of fermentation products. **American Society of Animal Science**; 93:1-11.

Beloshapka, A. N., Alexander, L. G., Buff, P. R., Swanson, K. S., 2014. The effects of feeding resistant starch on apparent total tract macronutrient digestibility, faecal characteristics and faecal fermentative end-products in healthy adult dogs. **Journal of Nutritional Science**, vol. 3, e38, page 1 of 5.

Berlanga-Acosta, J., Playford, R. J., Mandir, N., Goodlad, R. A., 2001. Gastrointestinal cell proliferation and crypt fission are separate but complementary means of increasing tissue mass following infusion of epidermal growth factor in rats. **Gut**; **48**:803–807.

Bird, A. R., Vuaran, M., Brown, I., Topping, D. L., 2007. Two high-amylose maize starches with different amounts of resistant starch vary in their effects on fermentation, tissue and digesta mass accretion, and bacterial populations in the large bowel of pigs. **British Journal of Nutrition**, 97, 134–144.

Birkett, A., Muir, J., Phillips, J., Jones, G., O'Dea, K., 1996. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. **Am J Clin Nutr**; 63:766-72.

Brouns, F., Kettlitz, B., Arrigoni, E., 2002. Resistant starch and “the butyrate revolution”. **Food Science & Technology**, 13, 251–261.

Carciofi, A. C., 2008. Fontes de Proteína e Carboidratos para Cães e Gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 28-41.

Day, M. J., Bilzer, T., Mansell, J., Wilcock, B., Hall, E., Jergens, A., Minami, T., Willard, M., Washabau, R., 2008. 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.

DePlancke, B., Gaskins, H. R., 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 73 (suppl.), p. 1131S-41S.

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

Fahey Junior, G. C., Barry, K. A., Swanson, K. S., 2008. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. **The Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 425-445.

Fediaf - The European Pet Food Industry Federation, 2011. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. The European Pet Food Industry Federation, Bruxelles.

Ferguson, L. R., Tasman-Jones, C., Englyst, H. Harris, P. J., 2000. Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. **Nutrition and Cancer**, v. 36, p. 230-7.

Fischer, M. M., 2011. **Efeito de Diferentes Fontes de Fibra na Digestibilidade de Nutrientes, nas Respostas Metabólicas Pós Prandiais e na Saúde Intestinal de Gatos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Gee, J. M., Faulks, R. M., Johnson, I. T., 1991. Physiological effects of retrograded α -amylase-resistant cornstarch in rats. **J. Nutr.** 121:44.

Gomes, M. O. S., Beraldo, M. C., Putarov, T. C., Brunetto, M. A., Zaine, L., Glória, M. B. A., Carciofi, A. C., 2011. 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.

Gomes, M. O. S., 2013. **Microbiota fecal, produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa intestinal e imunidade de cães beagles de diferentes idades**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

Haenen, D., Zhang, J., Silva, C. S., Bosch, G., Van Der Meer, I., Van Arkel, J., Van Der Borne, J. J. G. C., Gutierrez, P. O, Kemp, H. S. B., Muller, M., Hooiveld, G. J. E. J., 2013. A Diet High in Resistant Starch Modulates Microbiota Composition, SCFA Concentrations, and Gene Expression in Pig Intestine. **The Journal of Nutrition**, 143: 274–283.

Hedemann, M. S., Knudsen, K. E. B., 2007. Resistant starch for weaning pigs — Effect on concentration of short chain fatty acids in digesta and intestinal morphology. **Livestock Science**, 108, 175–177.

Henningsson, A. M., Margareta, E., Nyman, G. L., Bjorck, I. M. E., 2003. Influences of dietary adaptation and source of resistant starch on short-chain fatty acids in the hindgut of rats. **British Journal of Nutrition**, 89, 319–327.

Holm, J. I., Bjorck, A., Drews, N. G, 1986. A rapid method for the analysis of starch. **Starch/Starke**, v.38, p.224-226.

Jacobasch, G., Schmiedl, D., Kruschewski, M., Schmehl, K., 1999. Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel disease. **Int J Colorectal Dis**, 14:201–211.

Karkalas, J. J., 1985. An improved enzymatic method for determination of native and modified starch. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.36, p.1019-1027.

Kleessen, B., Stoof, G., Prool, J., Schmiedl, D., Noack, J., Blaut, M., 1997. Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. **J ANIM SCI**, 75:2453-2462.

Kleessen, B., Hartmann, L., Blaut, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats., 2003. **British Journal of Nutrition**, 89, 597–606.

Kuzmuk, K. N., Swanson, K. S., Tappenden, K. A., Schook, L. B., Fahey Jr., G. C., 2005. 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.

Larsen, J. A., Farcas, A., 2014. Nutrition of Aging Dogs. **Vet Clin Small Anim.** n° 14, p. 741–759.

Lobo, A. R., Colli, C., Alvares, E. P., Filisetti, T. M. C. C., 2007. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **British Journal of Nutrition**, 97, 776–785.

Mandir, N., FitzGerald, A. J., Goodlad, R. A., 2005. Differences in the effects of age on intestinal proliferation, crypt fission and apoptosis on the small intestine and the colon of the rat. **Int. J. Exp. Path.**, 86, 125–130.

Maria, A. P. J., 2013. **Intervenção Nutricional no Estudo do Envelhecimento do Trato Gastrointestinal em Cães**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

Moreau, N. M., Martin, L. J., Toquet, C. S., Labois, C. L., Nguyen, P. G., Siliart, B. S., Dumon, H. J., Champ, M. M. J., 2003. Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **British Journal of Nutrition**, 90, 75–85.

Nofrarías, M., Martínez-Puig, D., Pujols, J., Majó, N., Pérez., J. F., 2007. Long-term intake of resistant starch improves colonic mucosal integrity and reduces gut apoptosis and blood immune cells. **Nutrition** 23, 861–870.

Nugent, A. P., 2005. Health properties of resistant starch. **Nutrition Bulletin**, 30, 27–54.

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

Peters, I. R., Calvert, E. L., Hall, E. J., Day, M. J., 2004. Measurement of Immunoglobulin Concentrations in the Feces of Healthy Dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 841-848.

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

Rabbani, G. H., Teka, T., Zaman, B., Majid, N., Khatun, M., Fuchs, G. J., 2001. Clinical Studies in Persistent Diarrhea: Dietary Management With Green Banana or Pectin in Bangladeshi Children. **Gastroenterology**;121:554–560.

Ramakrishna, B.S., Venkataraman, S., Srinivasan, P., Dash, P., M.D., Young, G. P., Binder, H. J., 2000. Amylase-Resistant Starch Plus Oral Rehydration Solution For Cholera. **The New England Journal of Medicine**. February 3, Volume 342 Number 5. P 308-313.

Rebolé, A., Ortiz, L. T., Rodriguez, M. L., Alzueta, C., Trevino, J., Velasco, S., 2010. Effects of inulin and enzyme complex, individually or in combination,

on growth performance, intestinal microflora, cecal fermentation characteristics, and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat- and barley-based diet. **Poultry Science** 89:276–286.

Riaz, M. N., 2003. Extrusion basics. *In*: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. **Petfood technology**. Illinois Mt Morris, p.347-360.

Roberti-Filho, F. O., 2013. **Influência da granulometria da matéria prima e da configuração de extrusora no conteúdo de amido resistente, digestibilidade, fermentação intestinal e respostas metabólicas de cães**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

Sá, F. C., Vasconcellos, R. S., Brunetto, M. A., Filho, F. O. R., Gomes, M. O. S., Carciofi, A. C., 2013. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: effects on processing and digestibility. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** 97, Suppl 1, 51-59.

Scheppach, W., 1994. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**, supplement 1: S35-S38.

Sheffy, B. E., Williams, A. J., Zimmer, J. F., Ryan, G. D., 1985. Nutrition and metabolism of the geriatric dog. **Cornell Veterinarian**, v. 75, p. 324-347.

Simpson, W. J., 1998. Diet and Large Intestinal Disease in Dogs and Cats. **The Journal of Nutrition**, 2717S-2722.

Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Healy, H. P., Dawson, K. A., Merchen, N. R., Fahey Jr., G. C., 2002. 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.

Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., Conlon, M. A., 2006. Resistant Starch Prevents Colonic DNA Damage Induced by High Dietary Cooked Red Meat or Casein in Rats. **Cancer Biology & Therapy** 5:3, 267-272.

Tsukahara, T., Yoshie, I., Nakayama, K., Ushid, K., 2003. Stimulation of Butyrate Production in the Large Intestine of Weaning Piglets by Dietary Fructooligosaccharides and Its Influence on the Histological Variables of the Large Intestinal Mucosa. **Nutr Sci Vitaminol**, 49, 414-421.

Vieira, P. F., 1980. **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.

Wong, C. S. M, Gibson, P. R., 2003. The trophic effect of dietary fibre is not associated with a change in total crypt number in the distal colon of rats. **Carcinogenesis**, vol.24 no.2 pp.343–348.

Zanotto, D.L., Belaver, C. 1996. Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves. **Comunicado Técnico EMBRAPA – Suíno e Aves**. CT 215. 1-5.

Tabela 1. Composição química analisada e parâmetros de qualidade dos kibbles das dietas experimentais para cães processadas para se obter diferentes graus de cozimento e teores de amido resistente.

Item	Dietas ^a	
	Baixo AR ^b	Elevado AR ^c
Composição química, %		
Matéria seca	95.20	95.20
Matéria mineral	8.20	7.90
Proteína bruta	26.60	26.60
Extrato etéreo hidrólise ácida	16.20	17.20
Fibra bruta	1.90	2.10
Amido	42.50	41.60
Diâmetro geométrico médio (µm)	224	312
Desvio padrão geométrico (µm)	1.50	1.70
Índice de gelatinização do amido, %	99.90	62.60
Teor de Amido resistente, %	0.21	1.46
Densidade aparente, g/L	300	505

^a Lista de ingredientes: milho 54.30%, farinha de vísceras de aves 25%, gordura de aves 9%, glúten de milho 60% proteína 5%, fibra de cana 2%, palatabilizante líquido 3%, premix mineral/vitamínico 0.30%, sal comum 0.50%, cloreto de potássio 0.48%, cloreto de colina 0.20%, antioxidante 0.10%, calcário 0.05%, antifúngico 0.04%, L-lisina 0.03%.

^b Baixo AR – ração finamente moída e extrusada com maior aplicação de energia mecânica específica;

^c Elevado AR – ração grosseiramente moída e extrusada com menor aplicação de energia mecânica específica.

Tabela 2. Peso corporal, ingestão e digestibilidade dos nutrientes e da energia das dietas experimentais para cães idosos processadas para se obter diferentes graus de cozimento e teores de amido resistente.

Item	Dietas ¹		EPM ²	Valor P ³
	Baixo AR	Alto AR		
Peso corporal (kg)	13.53	13.69	0.28	0.796
Ingestão (g/cão/dia)				
Matéria Seca	194.50	190.10	4.34	0.633
Proteína Bruta	52.60	51.40	1.17	0.650
Extrato Etéreo	27.50	27.20	0.61	0.833
Fibra Bruta	4.30	4.40	0.09	0.794
Amido	76.90	74.90	1.72	0.597
Digestibilidade dos nutrientes (%)				
Matéria Seca	82.02	80.84	0.47	0.169
Matéria Orgânica	86.70	85.64	0.36	0.126
Proteína Bruta	87.76	85.61	0.50	0.002
Extrato Etéreo	94.10	92.28	0.51	<0.001
Amido	99.78	99.80	0.01	0.368
Energia Bruta	87.64	86.32	0.38	0.056
EM (kcal/g na MS)	4.27	4.22	17.58	0.125

¹ Baixo AR – ração finamente moída e extrusada com maior aplicação de energia mecânica específica; Elevado AR – ração grosseiramente moída e extrusada com menor aplicação de energia mecânica específica.

² Erro Padrão da Média (n = 8 cães por ração)

³ Valor de P do modelo

Tabela 3. Produção, características e concentração de produtos de fermentação e IgA nas fezes de cães idosos alimentados com dietas experimentais processadas para se obter diferentes graus de cozimento e teores de amido resistente

Item	Dietas ¹		EPM ²	Valor P ³
	Baixo AR	Alto AR		
Fezes				
g/cão/dia (MO)	79.71	85.47	2.88	0.333
g/cão/dia (MS)	34.94	36.26	0.90	0.428
Umidade (%)	55.85	57.31	0.91	0.457
Escore	3.88	3.89	0.05	0.859
pH	7.17	6.76	0.08	<0.001
Produtos de fermentação (mMol/kg fezes na MS)				
Ácido acético	208.64	249.60	11.22	0.082
Ácido propiônico	92.70	154.30	10.05	<0.001
Ácido butírico	40.41	59.95	3.54	0.003
Total de AGCC	341.75	463.86	23.40	0.006
Ácido isobutírico	8.32	7.36	0.38	0.256
Ácido isovalérico	12.63	11.39	0.57	0.327
Ácido valérico	1.01	1.55	0.21	0.228
Total AGCR	21.96	20.30	0.97	0.447
Total AGV	363.70	484.10	23.65	0.008
Amônia	253.90	219.10	10.24	0.051
Lactato	0.40	1.76	0.33	0.043
IgA (mg/g fezes na MS)	1.92	2.31	0.26	0.467

¹ Baixo AR – ração finamente moída e extrusada com maior aplicação de energia mecânica específica; Elevado AR – ração grosseiramente moída e extrusada com menor aplicação de energia mecânica específica.

² Erro Padrão da Média (n = 8 cães por ração)

³ Valor de P do modelo

Tabela 4. Análise histológica das mucosas do estômago, intestinos delgado e grosso de cães idosos alimentados com dietas experimentais processadas para se obter diferentes graus de cozimento e teores de amido resistente. Valores expressos como mediana (mínimo-máximo).

Item	Dieta ¹		Valor P ³
	Baixo AR	Elevado AR	
<i>Infiltrado linfoplasmocitário</i>			
Estômago	0 (0-2) ²	0.5 (0-2)	0.346
Duodeno	1 (0-1)	1(0-1)	1.000
Jejuno	0 (0-1)	0 (0-1)	0.766
Íleo	0 (0-1)	0 (0-1)	0.773
Cólon ascendente	0 (0-0)	0 (0-1)	- ⁴
Cólon transverso	0 (0-0)	0 (0-1)	-
Cólon descendente	0 (0-0)	0 (0-1)	1.000
<i>Linfócitos intraepiteliais</i>			
Estômago	0 (0-1)	0.5 (0-1)	0.149
Duodeno	1 (0-1)	1 (0-1)	1.000
Jejuno	0.5 (0-1)	0 (0-1)	0.773
Íleo	0 (0-1)	0 (0-0)	-
<i>Linfócito em cripta</i>			
Cólon ascendente	0 (0-1)	0.5 (0-1)	0.484
Cólon transverso	0 (0-1)	0.5 (0-1)	0.484
Cólon descendente	0 (0-1)	0.5 (0-1)	0.766
<i>Hiperplasia de cripta</i>			
Cólon ascendente	0 (0-1)	0.5 (0-0)	0.777
Cólon transverso	0 (0-1)	1 (0-1)	0.424
Cólon descendente	0 (0-1)	1 (0-1)	0.424
<i>Dilatação de cripta</i>			
Cólon ascendente	0 (0-1)	0 (0-1)	0.424
Cólon transverso	0.5 (0-1)	1 (0-1)	0.424
Cólon descendente	1 (0-1)	1 (1-1)	-

¹ Baixo AR – ração finamente moída e extrusada com maior aplicação de energia mecânica específica; Elevado AR – ração grosseiramente moída e extrusada com menor aplicação de energia mecânica específica.

² Com base no sistema de escore de 0-3, descrito por Day et al. (2008)

³ Valor de P do modelo

⁴ Não analisado

Tabela 5. Análise morfométrica das criptas do intestino grosso de cães idosos alimentados com dietas experimentais processadas para se obter diferentes graus de cozimento e teores de amido resistente

Item	Dieta ¹		Valor P ²
	Baixo AR	Elevado AR	
<i>Criptas (μm)</i>			
Cólon Ascendente	356.6	367.8	0.598
Cólon Transverso	346.5	334.7	0.495
Cólon Descendente	320.8	341.7	0.083

¹ Baixo AR – ração finamente moída e extrusada com maior aplicação de energia mecânica específica; Elevado AR – ração grosseiramente moída e extrusada com menor aplicação de energia mecânica específica.

² Valor de P do modelo

Legendas das Figuras

Figura 1. Fotomicrografias da mucosa gástrica de cães após 61 dias de consumo das rações experimentais. a) Mucosa fúndica de cão que consumiu dieta com baixo AR. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 50 μm ; b) Mucosa fúndica de cão que consumiu dieta com baixo AR. Discreta gastrite linfoplasmocítica superficial. HE, barra = 50 μm ; c) Mucosa fúndica de cão que consumiu dieta com elevado AR. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 50 μm ; d) Píloro de cão que consumiu dieta com elevado AR. Discreta gastrite linfoplasmocítica. HE, barra = 50 μm .

Figura 2. Fotomicrografias da mucosa do intestino delgado de cães após 61 dias de consumo das rações experimentais. a) Duodeno de cão que consumiu dieta com baixo AR. Discreta enterite linfoplasmocítica com aumento de linfócitos intraepiteliais (LIE). HE, barra = 50 μm ; b) Duodeno de cão que consumiu dieta com elevado AR. Discreta enterite linfoplasmocítica com aumento de LIE. HE, barra = 50 μm ; c) Jejuno de cão que consumiu dieta com baixo AR. Discreta enterite linfoplasmocítica com aumento de LIE. HE, barra = 50 μm ; d) Jejuno de cão que consumiu dieta com elevado AR. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 50 μm . e) Íleo de cão que consumiu dieta com baixo AR. Discreta enterite linfoplasmocítica. HE, barra = 50 μm . f) Íleo de cão que consumiu dieta com elevado AR. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 50 μm .

Figura 3. Fotomicrografias da mucosa do intestino grosso de cães após 61 dias de consumo das rações experimentais. a) Cólon ascendente de cão que consumiu dieta

com baixo AR. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 50 μ m; b) Cólon ascendente de cão que consumiu dieta com elevado AR. Discreta dilatação e hiperplasia de criptas. HE, barra = 50 μ m; c) Cólon transversal de cão que consumiu dieta com baixo AR. Dentro do padrão de histologia normal. HE, barra = 50 μ m; d) Cólon transversal de cão que consumiu dieta com elevado AR. Discreta colite linfoplasmocítica com discreta dilatação e hiperplasia de criptas. HE, barra = 50 μ m; e) Cólon descendente de cão que consumiu dieta com baixo AR. Discreta colite linfoplasmocítica com dilatação e hiperplasia de criptas. HE, barra = 50 μ m; f) Cólon descendente de cão que consumiu dieta com alto AR. Discreta colite linfoplasmocítica com dilatação e hiperplasia de criptas. HE, barra = 50 μ m.

Figura 4. Fotomicrografias de criptas da mucosa do intestino grosso de cães após 61 dias de consumo das rações experimentais.; a) Cólon ascendente de cão que consumiu dieta com elevado AR. HE, barra = 50 μ m; b) Cólon transversal de cão que recebeu dieta com baixo AR. HE, barra = 50 μ m; c) Cólon transversal de cão que recebeu dieta com alto AR. HE, barra = 50 μ m; d) Cólon descendente de cão que recebeu dieta com baixo AR. HE, barra = 50 μ m; e) Cólon descendente de cão que recebeu dieta com alto AR. HE, barra = 50 μ m.

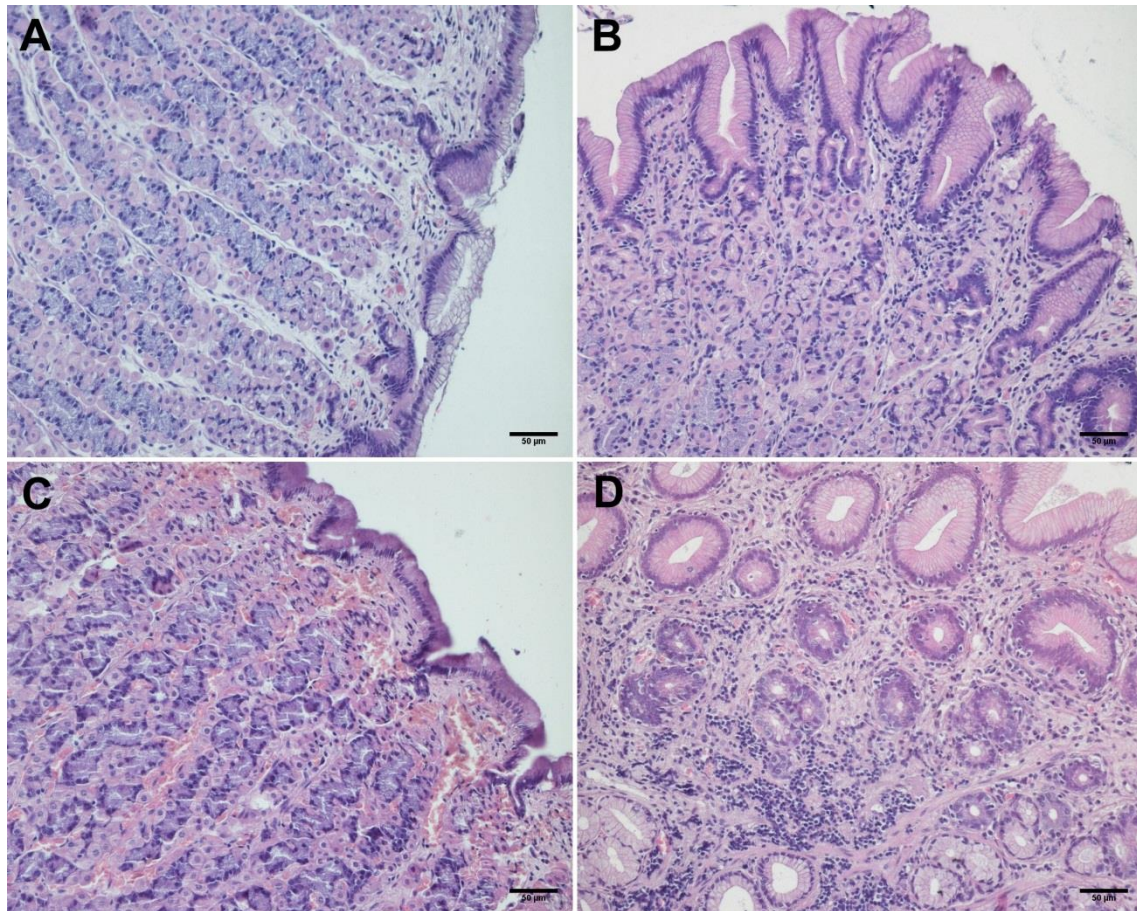
Figura 1.

Figura 2.

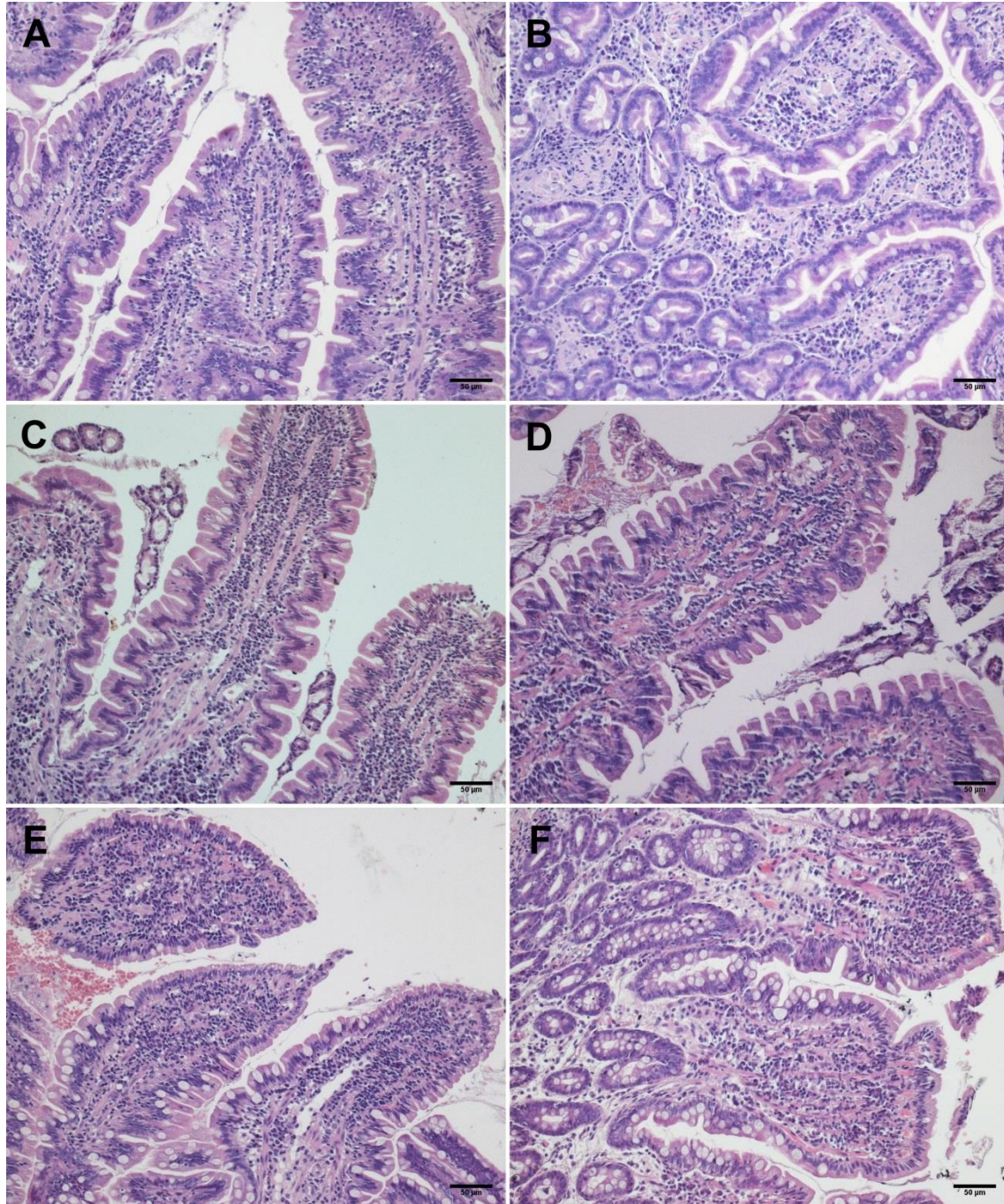


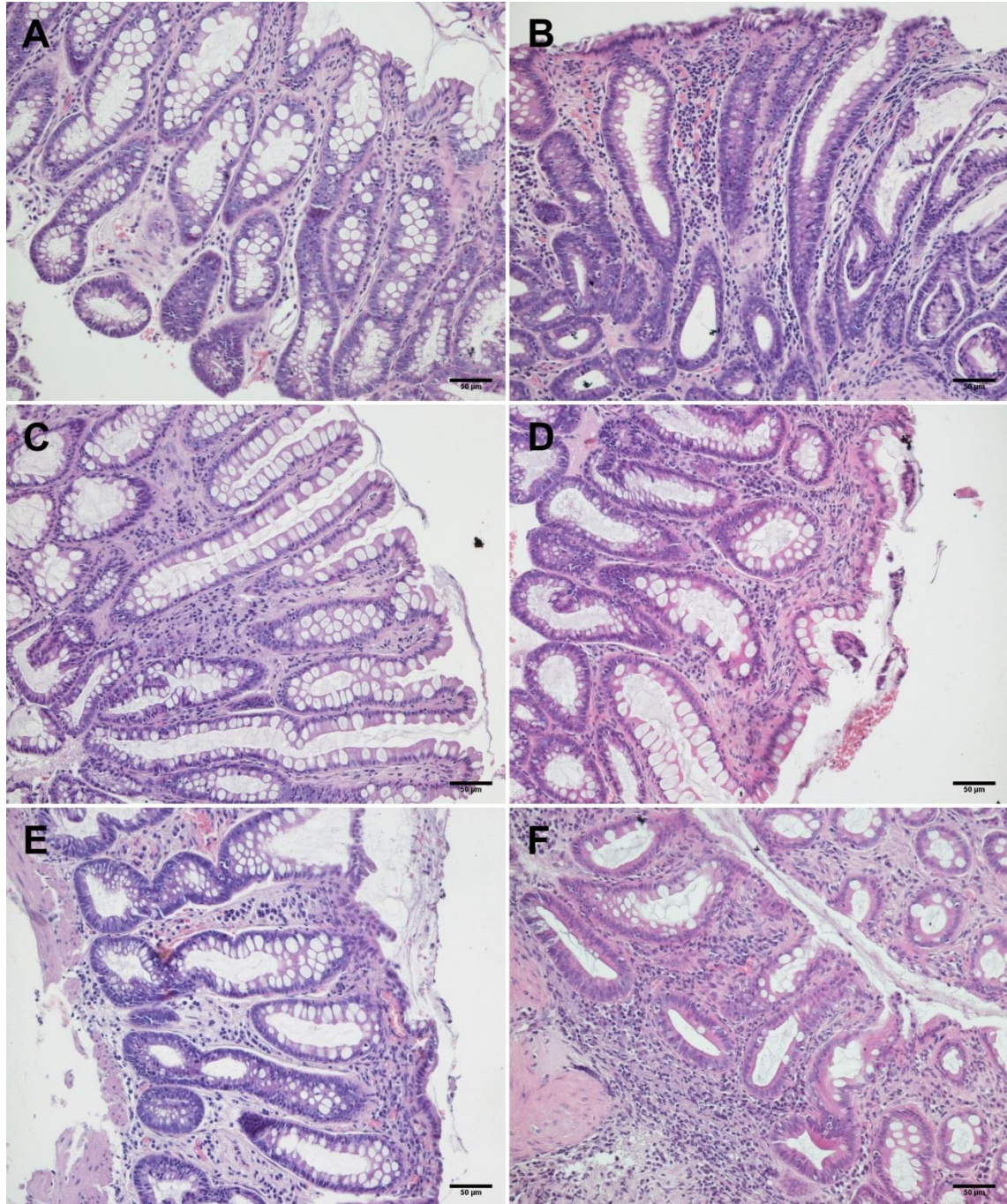
Figura 3.

Figura 4.