

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**β-CASEÍNA A1 DIETÉTICA COMO FATOR DE
RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM CÃES**

Ronald Glanzmann

Médico veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**β-CASEÍNA A1 DIETÉTICA COMO FATOR DE
RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM CÃES**

Ronald Glanzmann

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi

Exame de Qualificação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Ciência Animal).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL

G546

Glanzmann, Ronald
-Caseína A1 dietética como fator de risco para o desenvolvimento de processos inflamatórios em cães / Ronald Glanzmann. -- Jaboticabal, 2024. 54 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Andriago Barboza de Nardi

1.-caseína A1.. 2.-caseína A2.. 3. Biomarcadores inflamatórios..

I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: β -CASEÍNA A1 DIETÉTICA COMO FATOR DE RISCO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM CÃES

AUTOR: RONALD GLANZMANN

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária,
área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Data: 03/01/2024 22:12:55-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. ANNELEISE CARLA CAMPRESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br ANNELEISE CARLA CAMPRESI DOS SANTOS
Data: 04/01/2024 11:00:35-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. GERALDO LUIZ COLNAGO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal Fluminense - Niterói/RJ

Documento assinado digitalmente
gov.br GERALDO LUIZ COLNAGO
Data: 03/01/2024 20:41:05-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 03 de janeiro de 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ronald Glanzmann, São Paulo / SP, nascido em 16/01/1972, Médico Veterinário UEL 1996, Co-fundador, Diretor de Marketing e Novos Negócios Inovet, OmniLab, Equostar, M2i, Master Minds Inovet e Petfarma; Pós-graduado em Nutrição Clínica pela Uningá – Ipupo/SBE – Sociedade Brasileira de Educação Farmacêutica e Nutracêutica; Pós-Graduação em Adequação Nutricional e Manutenção da Homeostase – Prevenção e Tratamento de Doenças Relacionadas à Idade pela Uningá e Instituto Lair Ribeiro. Mestrando pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela UNESP Jaboticabal; Curso Medicina Funcional Integrativa para Profissionais da Saúde Dr. Victor Sorrentino. Professor Módulo Nutrição Clínica Pós-Graduação Clínica Médica e Cirúrgica Unoeste - Campo Grande-MS! MBA em MKT e Comércio Exterior pela FGV. Professor pela FGV no período de 2002 a 2015, na disciplina Marketing no Curso de Administração de Empresas. Oficial Veterinário pela FEI. Pioneiro no conceito de protocolos com suplementos terapêuticos para Equinos e Pequenos Animais no Brasil.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	9
INTRODUÇÃO.....	9
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 Aspectos gerais.....	11
1.2 Marcadores inflamatórios.....	13
1.2.1 Proteína C Reativa.....	14
1.2.2 Ácido Fólico (Vitamina B9) e Cobalamina (Vitamina B12).....	15
1.2.3 Hemograma.....	15
1.2.4 Bioquímica Sérica.....	17
1.2.5 Fibrinogênio.....	17
1.2.6 Relação Monócito/Linfócito e Eosinófilo/Linfócito.....	17
1.3 As β -caseínas e o processo inflamatório.....	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1 Animais.....	20
2.2 Alimentos.....	20
2.3 Coletas de sangue.....	21
2.4 Delineamento experimental.....	22
2.5 Análises Estatísticas.....	22
3 RESULTADOS.....	23
4 DISCUSSÃO.....	32
5 CONCLUSÃO.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

ANEXOS	44
A - CERTIFICADO DE COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	45
B - IDENTIFICAÇÃO DE ALELO A2A2 DO GENE DA BETA-CASEÍNA INGREDIENTE GRUPO CONTROLE:.....	46
C - CERTIFICADO DE ANÁLISE DE INGREDIENTE DO PRODUTO GRUPO TESTE.....	47
D - NF REABILITY GRUPO TESTE E CONTROLE.....	48
E - RAÇÃO UTILIZADA PARA COMPLEMENTAR A DIETA.....	53

β-CASEÍNA A1 DIETÉTICA COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM CÃES

Resumo: Este estudo objetivou comparar o efeito de duas dietas, uma contendo β-caseína A1 (teste) e outra β-caseína A2 (controle) em cães, analisando marcadores inflamatórios e parâmetros sanguíneos durante 30 dias. Foi possível observar que a concentração de vitamina B12 mostrou-se significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo controle, o que pode indicar uma relação inversa entre a quantidade de B12 e a presença de inflamação. O grupo alimentado com β-caseína A1 apresentou uma relação eosinófilo/linfócito e relação monócito/linfócito maior ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle, sugerindo por consequência maior disbiose, acidez e estresse oxidativo, com inflamação como consequência neste grupo. A concentração de fibrinogênio também foi maior ($p < 0,05$) no grupo alimentado com β-caseína A1. As concentrações da Proteína C Reativa no grupo que recebeu β-caseína A1 foi maior ($p < 0,05$) que a do grupo controle, o que destaca ainda mais a influência das diferentes dietas na resposta inflamatória e no status de saúde dos cães.

Palavras-chave: β-caseína A1. β-caseína A2. Biomarcadores Inflamatórios.

Abstract: This study aimed to compare the effect of two diets, one containing A1 β-casein (test) and the other A2 β-casein (control) in dogs, analyzing inflammatory markers and blood parameters for 30 days. It was possible to observe that the concentration of vitamin B12 was significantly higher ($p < 0.05$) in the control group, which may indicate an inverse relationship between the amount of B12 and the presence of inflammation. The group fed with A1 β-casein showed a higher eosinophil/lymphocyte ratio and monocyte/lymphocyte ratio ($p < 0.05$) compared to the control group, suggesting consequently greater dysbiosis, acidity and oxidative stress, with inflammation as a consequence in this group. Fibrinogen concentration was also higher ($p < 0.05$) in the group fed with A1 β-casein. The concentrations of C-Reactive Protein in the group that received A1 β-casein were higher ($p < 0.05$) than in the control group, which further highlights the influence of different diets on the inflammatory response and health status of dogs.

Keywords: β-casein A1. β-casein A2. Inflammatory Biomarkers.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O leite bovino é uma importante fonte de proteínas na alimentação humana. Das proteínas presentes no leite, cerca de 80% são caseínas. Estas se dividem em quatro grupos: α -S1 (30-46%), α -S2 (8- 11%), β (25-35%) e κ (8-15%) e são codificadas respectivamente pelos genes *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* e *CSN3*, presentes no cromossomo 6 bovinos. As β -caseínas possuem 13 alelos: A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G sendo as formas mais comuns no leite de bovinos as β -caseínas A1 e A2 que se diferenciam pela mudança de um aminoácido na posição 67 da cadeia peptídica, uma prolina na A2 por uma histidina na A1.

Estudos indicam que, inicialmente, a população bovina possuía apenas o alelo para produção da β -caseína A2 e que por meio de uma mutação da prolina por histidina, surgiu o alelo da A1. A frequência do alelo A1 é maior em raças taurinas, como o Holandês e Pardo Suíço, intermediária na raça Jersey e muito baixa na raça Guernsey (Kaminski et al., 2007). No Brasil, Vercesi Filho et al. (2012), relataram uma frequência de 88,5% para o alelo A2 e 11,5% para o alelo A1 em uma população da raça Gir Leiteiro.

Sabe-se que a histidina presente na proteína A1 é susceptível à clivagem proteolítica, enquanto a prolina da proteína A2 não é (Taylor et al., 2017). Logo, uma vez que leite ou produtos derivados são consumidos, enzimas digestivas intestinais convertem facilmente a β -caseína A1 desses produtos no peptídeo opioide bioativo β -casomorfin7 (BCM7), enquanto a β -caseína A2 é convertida minimamente. A BCM-7 ativa os receptores μ -opioides, expressos em diversos tecidos do corpo, inclusive no trato gastrointestinal (Ho et al., 2014).

O consumo de leite e derivados com β -caseína A1 foi associado com diversas doenças de características crônica e inflamatória, como doenças cardiovasculares e diabetes mellitus. A BCM-7 também é associada com diminuição da motilidade intestinal através da redução da frequência e amplitude das contrações, além de outros estudos a apontarem como possível fator contribuinte para processos inflamatórios do intestino, o que pode levar a problemas no processo digestivo (Pal et al, 2015). Desta forma, podemos considerar que, a princípio, o benefício maior ao

consumir leite e derivados livres da β -caseína A1 se daria através de melhorias do processo digestivo e menor tendência ao desenvolvimento de processos inflamatórios.

O leite e seus derivados estão presentes em diversos tipos de alimentos devido aos seus altos valores proteicos e palatabilidade, além de serem necessários para o preparo de alimentos básicos para o consumo humano. Isso também ocorre em rações e alimentos do ramo pet food, o que possivelmente sujeita esses animais às mesmas condições desfavoráveis mencionadas anteriormente dos humanos que consomem β -caseína A1.

Atualmente os tutores de animais de companhia buscam oferecer melhor qualidade de vida aos seus animais, por conseguinte se torna importante estudar como o organismo de cães responde a ingestão da β -caseína A1, tendo em vista que análises apontam a probabilidade de ocorrência de processos que possam prejudicar o animal a nível fisiológico devido seu consumo. O presente projeto tem como objetivos estudar os mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos causados por dietas com β -caseína A1 em cães, averiguando a presença de biomarcadores inflamatórios em comparação com dietas contendo β -caseína A2.

1. Revisão de Literatura

1.1 Aspectos gerais

As β -caseínas representam cerca de 30% das proteínas presentes no leite bovino, possuindo a β -caseína A1 e β -caseína A2 como principais membros de sua família, as quais se diferenciam pela mudança de um aminoácido na posição 67 da cadeia peptídica, uma prolina na A2 por uma histidina na A1. A formação da β -casomorfina 7 (BCM-7) é maior na digestão de produtos lácteos contendo β -caseína A1. Esse peptídeo é composto de 7 aminoácidos, percorrendo da posição 60 até a 66 na cadeia proteica das β -caseínas (Damiani et al., 2009) como pode ser observado na Figura 1.

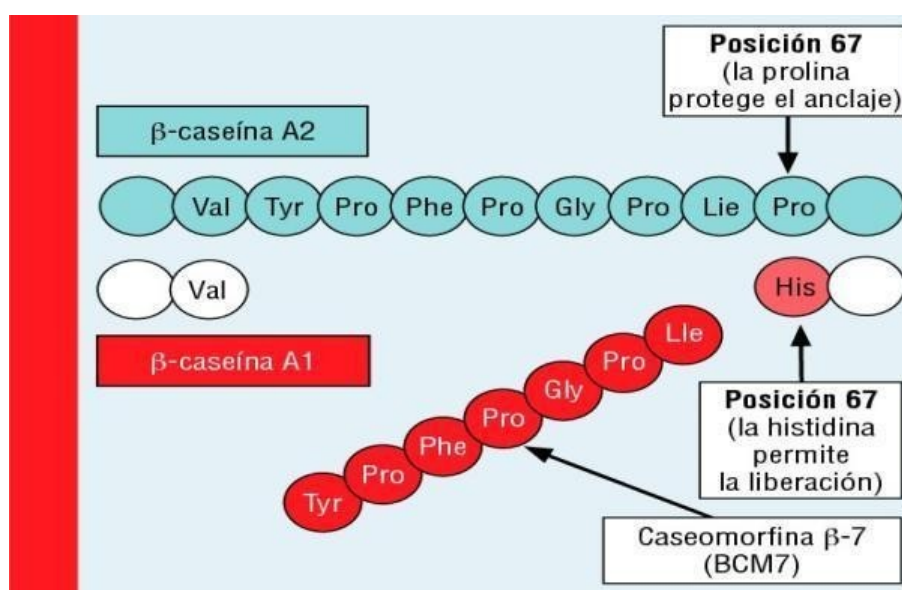


Figura 1: Betas caseínas A2 e A1 e a betacasomorfina 7 (BCM7) resultante da digestão da beta caseína A1.

Fonte: Scientific Diagram (researchgate.net)

A BCM-7 foi descrita a primeira vez por Brantl e Teschemacher (1979 Apud Taylor et al., 2017) enquanto procuravam por opioides resistentes à pronase no leite e seus derivados. Posteriormente, foi descoberto que extratos de clorofórmio-metanol do leite bovino digerido por enzimas digestivas de caseína, e comida de

bebê com leite, provocam a inibição da contração intestinal no íleo de porquinhos da Índia (Taylor et al., 2017). Essa atividade foi bloqueada pela naloxona, um antagonista de opioide, o que sugere que os peptídeos do leite no extrato se ligavam a receptores μ -opioides. Esses receptores estão localizados principalmente no sistema nervoso central e trato gastrointestinal (Teschemacher, 2003 Apud Kaminski et al., 2007) e, quando ativados, induzem diversas respostas no corpo como: redução do trânsito gastrointestinal e alteração da resposta imune celular e humoral (Chuang et al., 1995), além de estudos conduzidos por (Mathew et al. 2011) sugerirem efeito direto da ativação de receptores μ -opioides na progressão de câncer de pulmão.

Mais especificamente, a ativação da β -caseína A1 exerce efeito tanto nos neurônios entéricos quanto nas células epiteliais (Greenwood-Van et al., 2004), sendo que a ativação do sistema nervoso entérico inibe tanto as vias neurais excitatórias quanto as inibitórias que coordenam a motilidade intestinal, além de aumentar a atividade muscular gastrointestinal e aumentam o tônus muscular, espasmos e padrões de motilidade não-propulsora, o que caracteriza um atraso no trânsito intestinal (Holzer, 2010; Leppert, 2012).

Em estudos conduzidos por Cieślińska et al. (2012), foram selecionadas 177 vacas Holstein-Friesian, apresentando uma frequência alélica de 12,4% (22 indivíduos) para o genótipo A1A1, de 48,6% (86 indivíduos) para A2A2 e de 39% (69 indivíduos) para A1A2. Dessas vacas, 18 foram selecionadas para fazerem a primeira lactação e serem ordenhadas no mesmo período; a BCM-7 foi identificada em todas as amostras de leite, inclusive as que foram digeridas pela pepsina e as que foram digeridas por uma mistura de pepsina, tripsina e elastase; ademais, em leites com β -caseína A1 hidrolisados e processados, foi observada a maior liberação de BCM-7, o que mostra a grande influência do alelo A1 na liberação desse peptídeo que é relacionado com diversas doenças em humanos.

Em estudo com ratos, (Barnett et al. 2014), relataram que os animais submetidos a dietas com β -caseína A1 apresentaram trânsito intestinal mais lento que os submetidos a dietas com β -caseína A2, além de demonstrar um aumento significativo (65%) da expressão do marcador inflamatório mieloperoxidase. Resultado semelhante foi obtido por (Haq et al. 2014) que descreveram, diminuição

da motilidade intestinal; aumento significativo da expressão de IL-4; imunoglobulina E e de infiltração leucocitária, em camundongos que receberam dieta contendo β -caseína A1 em comparação com os que receberam dieta com a β -caseína A2.

Estudos, como o conduzido por (Haq et al., 2014), sustentam que o consumo de variantes A1 da β -caseína pode ter efeitos deletérios no trato gastrointestinal e possivelmente agravar respostas inflamatórias associadas a diversos distúrbios de saúde. Por esse motivo, recomenda-se o consumo de leite com β -caseína A2 em vez de β -caseína A1 para humanos. Essa recomendação também se estende a pequenos mamíferos, como camundongos e ratos, indicando que a mesma lógica pode se aplicar a outros mamíferos, incluindo cães. No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos específicos sobre esse assunto em cães.

1.2 Marcadores inflamatórios

A inflamação é uma resposta de defesa desencadeada por um dano celular, o qual pode ser causado por micróbios, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas. Ela inclui a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras. Ela primeiramente se apresenta em fase aguda, podendo evoluir para a fase crônica, a qual é associada com diversas doenças como cardiopatias, diabetes, artrite, alergias e doença pulmonar obstrutiva crônica (Lima et al., 2007).

A princípio, o processo inflamatório é benéfico buscando limitar a sobrevivência e proliferação dos agentes causadores de lesão tecidual, promover a sobrevivência, reparo e recuperação do tecido, além de conservar a energia do organismo (Lima et al., 2007).

Entretanto, a persistência do processo inflamatório leva a evolução desse quadro, se tornando uma inflamação crônica, havendo a infiltração do tecido por células mononucleares (monócitos e linfócitos), proliferação de fibroblastos e fibras de colágeno, além da formação de tecido conjuntivo. Nesse sentido, se dá início a

degeneração do tecido lesionado, levando até mesmo a liquefação desse tecido (Gleeson et al., 2011 Apud Abdulkhaleq et al., 2018).

Nesse contexto, durante os processos inflamatórios ocorre a liberação, pelo epitélio e células (como mastócitos, linfócitos, fibroblasto e neurônios), de mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis, resumidamente, pela coordenação da resposta inflamatória e influenciam diversos mecanismos no corpo, podendo alterar a integridade de tecidos (Martin e Wallace, 2006).

Logo, em quadros crônicos, a liberação e ação desses mediadores são amplificadas, podendo resultar no agravamento da lesão causadora de inflamação e prejudicar a saúde do animal. Dentre esses mediadores, alguns são usados como marcadores inflamatórios, de forma que são dosados no plasma sanguíneo a fim de identificar a ocorrência de processos inflamatórios no organismo do animal (Martin e Wallace, 2006).

1.2.1 Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma das proteínas de fase aguda (PFA) cuja solicitação como um indicador sensível de processos inflamatórios e infecciosos em cães e outros animais têm crescido de forma exponencial em vários países, incluindo o Brasil. Proteínas de fase aguda são aquelas cuja concentração sérica aumenta ou diminui pelo menos 25% durante estados inflamatórios. Apesar do nome, elas também podem sofrer alterações durante processos inflamatórios crônicos. Atualmente, os testes baseados em dosagens de PFAs mais utilizados são apenas dois: velocidade de hemossedimentação (VHS) e PCR (Aguiar et al., 2013).

Ela é sintetizada principalmente pelos hepatócitos do fígado, mas também é sintetizada por macrófagos, células endoteliais, linfócitos, adipócitos e células do músculo liso. Por ser identificado sua grande importância na identificação de processos inflamatórios é frequentemente utilizada para acompanhamentos e diagnósticos de diversas alterações fisiológicas (Aguiar et al., 2013).

De acordo com (Severo et al., 2016), a Proteína C Reativa (PCR) é conhecida como a principal proteína de fase aguda em cães. Nesses espécimes, a elevação da

PCR tem sido observada em ampla variedade de condições mórbidas. A determinação da PCR tem sido proposta como um marcador inflamatório de algumas doenças autoimunes.

A PCR tem por proposta ser um marcador precoce inflamatório. Em geral, inflamações leves e infecções virais conduzem elevações na faixa de 10 a 40mg/L, enquanto inflamações mais graves e infecção bacteriana têm concentrações séricas entre 40-200mg/L (Aguiar et al. 2013).

1.2.2 Ácido Fólico (Vitamina B9) e Cobalamina (Vitamina B12)

O ácido fólico (AF), também conhecido como folato, é uma vitamina do complexo B (vitamina B9) que atua como cofator de enzimas que participam as transferências de carbono (radicais metílicos) (Ho et al., 2013). Tanto a vitamina B12 como o AF são essenciais para a metilação da homocisteína (HCY) à metionina, mantendo os níveis de HCY normais, uma vez que em concentrações elevadas, a homocisteína tem efeito citotóxico (Kale et al., 2010).

O ácido fólico e cobalamina em baixas concentrações entram como papel importante para nortear o perfil da inflamação; no entanto, atualmente no Brasil, há falta de laboratórios veterinários específicos para os exames de homocisteína, desta forma os parâmetros de ácido fólico e vitamina B12 podem ser considerados (Kale et al., 2010).

1.2.3 Hemograma

O hemograma e o perfil bioquímico do plasma sanguíneo são exames laboratoriais amplamente utilizados na medicina veterinária para avaliar a saúde e diagnosticar diversas condições em animais. O hemograma é responsável por analisar as células sanguíneas, incluindo hemácias, leucócitos e plaquetas, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre o estado fisiológico do animal (Grego et al., 2006; Falce, 2009).

As informações qualitativas são obtidas a partir da observação da morfologia celular durante o exame do esfregaço sanguíneo, enquanto as informações quantitativas englobam a contagem global de células, dosagem de hemoglobina (Hb), determinação do hematócrito (Ht), contagem diferencial de leucócitos e cálculo dos índices hematimétricos (González; Scheffer, 2003). Segundo Silva (2017), o hemograma é essencial para diagnosticar anemias, infecções, inflamações, neoplasias malignas, além de monitorar o progresso de terapias medicamentosas e avaliar distúrbios plaquetários.

Os leucócitos, também conhecidos como glóbulos brancos, desempenham um papel crucial no sistema imunológico, participando da resposta imune inata e específica (Silva, 2017). A leucopoiese ou leucocitopoiese, processo de produção dos leucócitos, ocorre na medula óssea. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes em todas as espécies e atuam como a primeira linha de defesa do organismo diante de processos inflamatórios e infecciosos (Thrall, 2017).

Os eosinófilos, também produzidos na medula óssea, estão envolvidos nas reações alérgicas, anafiláticas e da resposta aguda inflamatória. Os basófilos, embora presentes em pequena quantidade no sangue periférico, acredita-se que participem de processos alérgicos junto com os eosinófilos (González, 2008).

A trombocitopoese, conforme (Silva, 2017), é o processo de produção das plaquetas, que são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos encontrados na medula óssea. As plaquetas são essenciais para a formação de coágulos, participando da hemostasia primária ao cessar temporariamente a hemorragia antes da estabilização do coágulo. Além disso, as plaquetas desempenham funções na cicatrização de feridas e manutenção da integridade vascular.

Os exames, sob a visão de (González, 2008), hemograma e perfil bioquímico, desempenham um papel vital na avaliação da saúde dos animais, permitindo diagnósticos precisos e auxiliando no acompanhamento de tratamentos médicos. Com sua aplicação em medicina veterinária, é possível monitorar a saúde geral dos animais, identificar doenças e distúrbios hematológicos e metabólicos, bem como auxiliar na formulação de estratégias terapêuticas mais efetivas.

1.2.4 Bioquímica Sérica

O exame bioquímico sérico tem como objetivo determinar e interpretar os compostos químicos presentes no sangue, fornecendo informações importantes sobre o metabolismo e funcionamento de órgãos como rins, fígado, músculos e ossos. Entre os principais indicadores deste exame estão a ureia, creatinina e alanina aminotransaminase (ALT). Esses indicadores bioquímicos são fundamentais na avaliação da saúde do animal, auxiliando na detecção precoce de alterações metabólicas e disfunções orgânicas, permitindo intervenções e tratamentos adequados, (González, 2008).

1.2.5 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma proteína produzida pelo fígado e desempenha um papel fundamental na coagulação sanguínea. Durante uma resposta inflamatória, os níveis de fibrinogênio podem aumentar devido à ação de substâncias pró-inflamatórias, como citocinas. Esse aumento ocorre como parte da resposta do organismo à inflamação e está relacionado à formação de coágulos sanguíneos e à reparação de tecidos danificados. No entanto, é importante notar que o fibrinogênio elevado não é específico para a inflamação, pois também pode ocorrer em outras condições, como infecções, traumas e certas doenças crônicas. A interpretação dos níveis de fibrinogênio deve ser feita em conjunto com outros parâmetros clínicos e laboratoriais para uma avaliação adequada (González, 2022).

1.2.6 Relação Monócito/Linfócito e Eosinófilo/Linfócito

A relação monócito/linfócito (RML) é um indicador hematológico que calcula a proporção entre os monócitos e os linfócitos no sangue periférico. A RML é um parâmetro útil na avaliação de processos inflamatórios em animais, principalmente em casos agudos (Asahina, 2017).

Durante inflamações, ocorre um aumento nos níveis de monócitos, que atuam na resposta inicial do sistema imunológico ao combater infecções e remover detritos celulares. Em contrapartida, os linfócitos, responsáveis pela resposta imunológica específica, podem temporariamente diminuir no sangue devido à migração para os tecidos inflamados. Assim, o aumento da RML pode indicar atividade inflamatória no organismo do animal e auxiliar veterinários na tomada de decisões clínicas (Asahina, 2017).

A relação eosinófilo/linfócito (REL), segundo Feitian et al. (2022) é um parâmetro hematológico que calcula a proporção entre o número de eosinófilos e o número de linfócitos no sangue periférico. Esta relação é uma ferramenta importante para avaliar a atividade inflamatória em animais. Os eosinófilos são glóbulos brancos envolvidos na resposta a alergias e parasitas, enquanto os linfócitos são fundamentais na resposta imunológica específica. Em condições alérgicas, a REL pode aumentar, indicando maior presença de eosinófilos em resposta a alérgenos. Por outro lado, em processos inflamatórios infecciosos, a relação pode diminuir, já que os linfócitos estão mais ativos no combate aos patógenos. A REL é um indicador útil para auxiliar os veterinários na avaliação da atividade inflamatória, embora sua interpretação deva ser considerada em conjunto com outros dados clínicos e laboratoriais específicos para cada animal.

1.3 As β -caseínas e o processo inflamatório

Os efeitos das β -caseínas provindas do leite já foram muito estudados em humanos, uma vez que podem desencadear efeitos gastrointestinais adversos, semelhantes a intolerância à lactose. Então, a partir de análises comparativas entre duas dietas diferentes, uma contendo a β -caseína do tipo A1 e outra com a do tipo A2, muitos estudos buscaram analisar presença de inflamação, desconforto digestivo, diminuição da motilidade intestinal, entre outros (Barnett et al., 2014).

Apesar da relação diretamente proporcional entre o consumo da β -caseína A1 e a liberação da β -casomorfina-7, os mecanismos pelos quais os receptores μ opioides atuam no processo inflamatório intestinal precisam ser mais bem

elucidados. Visto isso, a maior parte dos estudos a respeito da ação da BCM-7 não explica ou aprofunda os mecanismos envolvidos nos resultados obtidos, se atendo principalmente às alterações fisiológicas do organismo. Entretanto, como citado anteriormente, já se concluiu que a ativação dos receptores μ -opioides do sistema nervoso entérico inibe tanto as vias neurais excitatórias quanto as inibitórias que coordenam a motilidade intestinal, causando um atraso no trânsito intestinal (Pal et al., 2015).

Em estudo conduzido por Jianqin et al. (2016), 45 pessoas foram submetidas a dietas contendo ambas as β -caseínas ou somente a de tipo A2; as dietas contendo o tipo A1 foram associadas com aumento da inflamação gastrointestinal, aumento do desconforto digestivo e diminuição da motilidade, sintomas que foram atenuados após a remoção dessa proteína da dieta, o que possibilitou concluir que o processo inflamatório estaria relacionado diretamente com a presença da β -caseína A1 na dieta. Outros estudos também comprovam esses resultados, tanto os feitos em animais (Barnett et al., 2014; Haq et al., 2014), quanto os realizados em humanos (Ho et al., 2014; Jianqin et al., 2015; Pal et al., 2015), o que oferece suporte a este projeto de pesquisa.

Ademais, a dosagem dos marcadores demonstra concentrações elevadas em processos inflamatórios, os quais são associados, a longo prazo, a deterioração dos tecidos, desenvolvimento de doenças crônicas, o que leva a predisposição no desenvolvimento de câncer, uma vez que células inflamatórias são promotores tumorais por disponibilizarem, a longo prazo, um microambiente favorável para o desenvolvimento de neoplasias (Barnett et al., 2014; Haq et al., 2014).

2 Materiais e métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 20 cães sendo 19 da Raça PitBull e 1 da Raça Belgian Malinois (12 fêmeas e 08 machos), de peso corporal médio de 20,2kg, e idades entre 1 e 10 anos, provenientes do Canil "Red Action Pit Kennel" em São Paulo, sob a responsabilidade do tutor André Corrêa, mediante aprovação prévia pelo mesmo e assinatura de um termo de compromisso e responsabilidade. O projeto foi aprovado no CEUA, sob protocolo número 4971/23 e nas normas do CONCEA (anexo A).

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 2 grupos conforme descrito no item 2.2 abaixo.

2.2 Alimentos

A dieta experimental correspondendo à cerca 30% da necessidade diária de calorias de cada animal foi baseada no produto NF Reability® da empresa INOVET – Compromisso com a vida. Este produto é um alimento úmido, completo e balanceado para cães e gatos, possuindo em sua composição as seguintes fontes proteicas: plasma suíno (fornecendo 37% da proteína bruta - PB), ovo integral em pó (fornecendo 34% da PB) (fórmula original como 80% da fonte proteica a albumina (proteína do ovo) e leite em pó integral com lactose reduzida (fornecendo 29% da PB). Para suprir os cerca de 30% da necessidade diária de calorias foi fornecido, uma vez ao dia, uma lata contendo 280gramas do produto para cada animal experimental.

Foram utilizadas duas versões do produto durante o período experimental:

1- Grupo Controle – receberam a dieta experimental formulada com leite em pó integral contendo beta caseína A2 (Anexo C);

2- Grupo Teste – receberam a dieta experimental formulada com leite em pó integral contendo a beta caseína A1 e A2 (Anexo C).

Complementando os 70% da necessidade diária de calorias, para ambos os grupos, foi fornecido um alimento seco, completo e balanceado (Anexo D) sem proteínas do leite em sua composição.

2.3 Coletas de sangue

Todos animais foram vermífugados com o produto DUPRANTEL PLUS cedido gentilmente pelo Laboratório DUPRAT, e fizeram o uso do suplemento adsorvente CAPTOR por 14 dias e do probiótico MICROLAC por 21 dias, estes dois últimos cedidos gentilmente pelo Laboratório INOVET, antes do início do período experimental, sendo realizadas quatro coletas de sangue após o término desse período de medicação.

A primeira coleta de sangue (T0), um dia antes de iniciar o fornecimento da dieta experimental, a segunda (T1) dez dias após o início do fornecimento da dieta experimental, a terceira (T2) 20 dias após o início do fornecimento da dieta experimental e a quarta (T3) 30 dias após o início do fornecimento da dieta experimental.

As amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular. Após processamento, foi realizado hemograma completo, calculadas relação eosinófilo linfócito e relação monócito e linfócito e dosados: fibrinogênio, ureia, creatinina, frutossamina, glicose, alanina aminotransferase (ALT), proteína C reativa, vitamina B12, ácido fólico, uma vez que a maioria deles são marcadores inflamatórios.

O material coletado foi processado e laudado pelo laboratório: ANIMALAB 20 Anos - Centro de Diagnóstico Veterinário, CNPJ: 48.409.810/0001-22, localizado na cidade de Americana/SP com colaborações especiais do Laboratório TECSA (B12 e ácido fólico) e da empresa KOVALENT (Proteína C reativa).

2.4 Delineamento experimental

Este experimento corresponde a um estudo clínico prospectivo de tipo caso-controle inteiramente casualizado.

O estudo caso-controle é uma metodologia de pesquisa observacional frequentemente utilizada em áreas como medicina e epidemiologia. Seu principal objetivo é investigar a associação entre um fator de exposição (ou tratamento) e um desfecho (doença ou condição). Diferentemente dos ensaios clínicos, o estudo caso-controle não envolve intervenções diretas no cenário estudado (Moretti, 2023).

Tanto o estudo caso-controle quanto o ensaio clínico prospectivo desempenham papéis essenciais na pesquisa científica. Enquanto o primeiro explora associações retrospectivamente, o segundo avalia intervenções prospectivamente. Ambos contribuem para o avanço do conhecimento e aprimoramento da prática clínica (Moretti, 2023).

2.5 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com Software R (Versão 4.4.1). Inicialmente os pressupostos matemáticos de normalidade (Shapiro Wilk teste) e homocedasticidade (Bartlett's teste) foram verificados.

Todos os dados foram analisados considerando Parcelas Subdivididas no tempo em Delineamento Completamente Aleatório balanceado, considerando o grupo como a parcela principal e o dia de avaliação como a subparcela, assim se compararam os efeitos do grupo, do dia e da interação destes parâmetros.

Os valores resultantes de cada variável apresentam-se como a média +/- erro padrão da média (EPM). Em todos os testes a significância foi declarada como $P \leq 0,05$ e tendência quando $P > 0,05$ e $< 0,10$. O post teste de Tukey foi aplicado para a comparação de médias caso a comparação dos grupos, dias ou sua interação.

3 Resultados

Não foi observado efeito da interação grupo × tempo de avaliação sobre a concentração de vitamina B12 ($P > 0,10$; Tabela 1). Entretanto, a concentração de Vitamina B12 foi influenciada pelo efeito simples do grupo ofertado ($P = 0,005$) e do tempo de avaliação ($P = 0,023$), o grupo Teste apresentou menor concentração média de Vitamina B12 (425 pg/mL) durante o período experimental comparado ao grupo Controle (486,75 pg/mL). Por outro lado, as concentrações médias observadas de Vitamina B12 após 20 dias ($T_2 = 536,94$ pg/mL) de oferta das dietas foram significativamente maiores que os valores médios observados após 30 dias ($T_3 = 340,63$ pg/mL).

Tabela 1. Indicadores de inflamação em cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação.

	Grupo	Dias de Avaliação				Média	EPM	p-valor		
		T0	T1	T2	T3			L	T	G×T
Vitamina B12, pg/mL	Teste	411,20	533,60	488,80	266,40	425,00	33,51	0,005	0,023	0,189
	Controle	536,44	397,00	590,44	423,11	486,75				
	Média	470,52 ^{ab}	568,89 ^{ab}	536,94 ^a	340,63 ^b					
Ácido Fólico, ng/mL	Teste	12,608	11,298	11,898	6,509	10,578	0,627	0,547	< 0,01	0,656
	Controle	12,591	9,462	9,462	5,926	9,360				
	Média	12,600 ^a	10,428 ^a	10,744 ^a	6,232 ^b					
Fibrinogênio, mg/dL	Teste	260,00	170,00	270,00	240,00	235,00	10,65	0,504	0,110	0,084
	Controle	277,77	233,33	200,00	177,77	222,22				
	Média	268,42	200,00	236,84	210,52					
Frutosamina, μmol/L	Teste	156,70	192,80	189,20	206,80	186,37	43,73	0,762	0,003	0,238
	Controle	175,22	182,11	170,77	197,55	181,41				
	Média	165,47 ^b	187,73 ^{ab}	180,47 ^{ab}	202,42 ^a					
Proteína C reativa, mg/dL	Teste	10,248	26,017	25,153	33,419	23,709	4,00	0,021	0,269	0,737
	Controle	10,000	13,835	16,194	16,855	14,221				
	Média	10,117	19,605	20,43	24,701					

Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0 = 26/06/2023 antes do início da oferta das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após

início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. EPM = erro padrão da média. G = efeito do grupo. T = efeito do tempo de avaliação. L×G = efeito da interação grupo – tempo de avaliação. Letras sobrescritas minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa os tempos de avaliação pelo teste de Tukey.

A concentração de Ácido Fólico também foi influenciada pelo efeito simples dos dias de avaliação, observando-se valores médios similares entre os grupos estudados antes (T0 = 12,60 ng/mL) e durante os 10 dias (T1 = 10,42 ng/mL) e 20 dias (T2 = 10,74 ng/mL) após oferta das dietas, com uma redução significativa na concentração média de ácido fólico após 30 dias de avaliação (T3 = 6,23 ng/mL), sendo este valor menor quando comparado aos outros dias (Tabela 1; $P < 0.01$). Não foi observado efeito do grupo e nem efeito da interação grupo × tempo de avaliação sobre a concentração de Ácido Fólico ($P > 0,10$; Tabela 1).

A concentração de fibrinogênio (mg/dL) apresentou uma tendência de interação grupo e tempo de avaliação (Tabela 1; $P = 0,084$). Observando-se, baixas concentrações de fibrinogênio nos cães do Grupo Controle durante os dias 20 e 30 de avaliação (T2 = 200 mg/dl, T3 = 177 mg/dL, respectivamente) quando comparado aos valores observados nos mesmos dias nos animais do Grupo Teste (T2 = 270 mg/dL, T3 = 240 mg/dL) (Figura 2).

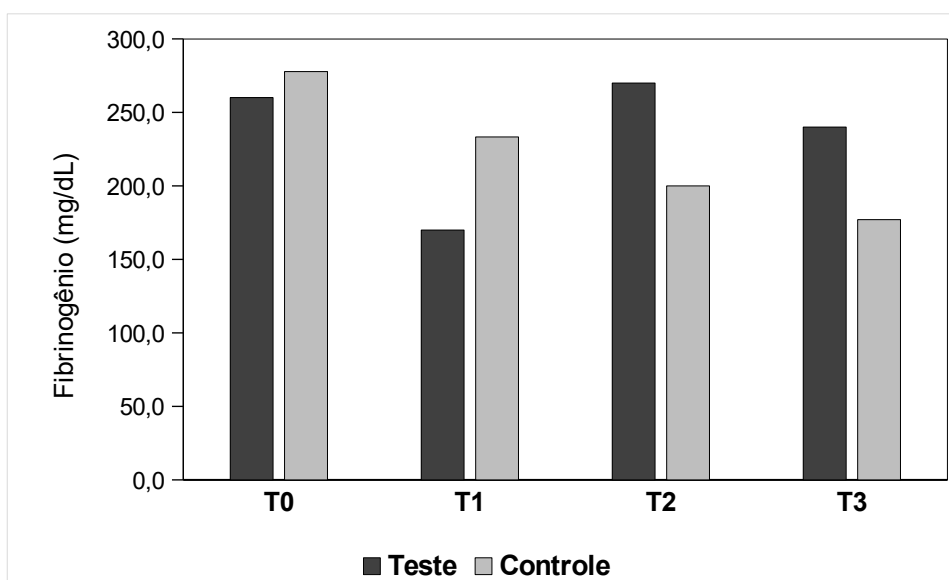


Figura 2. Concentrações de fibrinogênio (mg/dL) em cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação. Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0 = 26/06/2023 antes do início da oferta das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. Tendência de interação grupo e tempo de avaliação pelo teste de Tukey ($P=0,084$).

A concentração média de frutamina ($\mu\text{mol/L}$) foi influenciada pelos dias de avaliação (Tabela 1; $P = 0,003$), observando-se valores similares antes ($T_0 = 165,47$) e durante os 10 ($T_1 = 187,73$) e 20 ($T_2 = 180,47$) dias após início da oferta das dietas, com aumento significativo na concentração média de frutamina observado após 30 dias ($T_3 = 202,42$), sendo este valor significativamente maior quando comparado ao valor médio observado antes do início da oferta das dietas (T_0).

A concentração de proteína C reativa não foi influenciada pelo tempo de avaliação nem pela interação grupo \times tempo de avaliação ($P > 0,10$). Entretanto, quando avaliado o efeito do grupo ($P = 0,021$; Tabela 1), a concentração média de proteína C reativa encontrada no Grupo Teste (23,709 mg/dL) foi maior ao valor encontrado no Grupo Controle (14,221 mg/dL).

Os dias de avaliação não influenciaram a concentração de hemácias encontrada nos cães ($P > 0,10$). Entretanto, houve uma tendência na concentração de hemácias ser maior no Grupo Controle (7,43 milhões/mm³) quando comparado ao encontrado no Grupo Teste (6,91 milhões/mm³) (Tabela 2; $P=0,091$).

A concentração de hematócrito (%) não foi influenciada pelo grupo utilizado nas dietas dos animais ($P = 0,197$). Porém, observou-se efeito significativo dos dias de avaliação sobre esta variável (Tabela 2; $P < 0,01$), sendo que valores menores de hematócrito foram encontrados nos dias 10 ($T_1 = 44,52\%$) e 20 ($T_2 = 44,26\%$) após início das dietas quando comparados ao valor encontrado antes do início da oferta das dietas ($T_0 = 46,31$).

Tabela 2a. Valores de Hematológicos em cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação.

	Grupo	Dias de Avaliação				Média	EPM	p-valor		
		T0	T1	T2	T3			L	T	G \times T
Hemácias, milhões/mm ³	Teste	6,79	6,98	6,89	6,98	6,917	7,068	7,200	7,210	0,101
	Controle	7,60	7,14	7,55	7,44	7,436				
	Média	7,173	7,068	7,200	7,210					
Hematócrito, %	Teste	45,20	44,10	42,90	44,30	44,12	0,460	0,197	< 0,01	0,216
	Controle	47,55	45,00	45,77	47,22	46,34				
	Média	46,31 ^a	44,52 ^b	44,26 ^b	45,68 ^{ab}					

Hemoglobina, g/dL	Teste	15,93	15,41	14,97	15,45	15,44	0,168	0,231	0,032	0,134
	Controle	16,43	15,83	16,31	16,25	16,20				
	<i>Média</i>	16,16 ^a	15,61 ^{ab}	15,60 ^b	15,83 ^{ab}					
V.C.M, μ	Teste	63,85	63,28	61,89	63,36	63,10	0,324	0,779	0,118	0,735
	Controle	62,73	62,82	61,84	63,89	62,83				
	<i>Média</i>	63,32	63,06	61,88	63,63					
C.H.C.M, %	Teste	35,25	34,91	34,93	34,75	34,97	0,126	0,847	0,395	0,418
	Controle	34,77	35,15	35,61	34,50	35,01				
	<i>Média</i>	35,03	35,03	35,26	34,62					

Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0 = 26/06/2023 antes do início da oferta das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. EPM = erro padrão da média. G = efeito do grupo. T = efeito do tempo de avaliação. L×G = efeito da interação grupo – tempo de avaliação. Letras sobrescritas minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa os tempos de avaliação pelo teste de Tukey.

Tabela 2b. Valores de Hematológicos em cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação.

	Grupo	Dias de Avaliação				Média	EPM	p-valor		
		T0	T1	T2	T3			L	T	G×T
Proteína plasmática, g/dL	Teste	8,540	8,206	8,630	8,460	8,460	0,096	0,035	< 0,001	0,660
	Controle	7,800	7,456	8,011	7,578	7,711				
	<i>Média</i>	8,189 ^{ab}	7,852 ^c	8,336 ^a	8,042 ^{bc}					
Metarrubricitos, %	Teste	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,013	0,305	0,397	0,350
	Controle	0,001	0,002	0,111	0,001	0,027				
	<i>Média</i>	0,001	0,002	0,052	0,001					
Leucócitos, mm ³	Teste	15,666	13,513	13,170	13,480	13,955	509,6	0,408	0,002	0,298
	Controle	13,144	12,533	12,300	11,178	12,288				
	<i>Média</i>	14,468 ^a	13,047 ^{ab}	12,757 ^b	12,389 ^b					
Segmentados, %	Teste	64,50	59,10	57,10	58,80	59,87	1,220	0,425	0,074	0,161
	Controle	64,22	63,11	67,00	57,88	63,30				
	<i>Média</i>	64,36	61,00	61,78	58,84					
Linfócitos, %	Teste	23,20	25,20	28,90	26,30	25,90	1,071	0,763	0,494	0,108
	Controle	24,77	24,77	22,00	27,44	24,75				
	<i>Média</i>	23,94	25,00	25,63	26,84					

Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0 = 26/06/2023 antes do início da oferta

das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. EPM = erro padrão da média. G = efeito do grupo. T = efeito do tempo de avaliação. L×G = efeito da interação grupo – tempo de avaliação. Letras sobrescritas minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa os tempos de avaliação pelo teste de Tukey.

Tabela 2c. Valores de Hematológicos em cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação.

	Grupo	Dias de Avaliação				Média	EPM	p-valor		
		T0	T1	T2	T3			L	T	G×T
Monócitos, %	Teste	5,100	6,600	4,600	5,900	5,55	0,307	0,619	0,038	0,993
	Controle	5,333	7,000	5,222	6,440	6,00				
	Média	5,210 ^{ab}	6,789 ^a	4,894 ^b	6,157 ^{ab}					
Eosinófilos, %	Teste	7,100	9,000	3,700	8,700	7,125	0,792	0,539	0,165	0,410
	Controle	5,444	5,222	5,000	6,222	5,472				
	Média	6,315	7,210	4,315	7,526					
Bastonetes, %	Teste	0,001	0,100	0,400	0,400	0,225	0,251	0,291	0,310	0,542
	Controle	0,222	0,001	0,667	2,222	0,777				
	Média	0,105	0,052	0,526	1,263					
Metamielócitos, %	Teste	0,001	0,001	0,001	0,100	0,025	0,013	0,357	0,403	0,450
	Controle	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001				
	Média	0,002	0,001	0,001	0,052					
Plaquetas, mm ³	Teste	294.888	264.888	289.444	288.666	284.472	10.523	0,084	0,019	0,370
	Controle	379.800	327.800	370.100	327.000	351.175				
	Média	339.578 ^a	298.000 ^b	331.894 ^{ab}	308,842 ^{ab}					

Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0 = 26/06/2023 antes do início da oferta das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. EPM = erro padrão da média. G = efeito do grupo. T = efeito do tempo de avaliação. L×G = efeito da interação grupo – tempo de avaliação. Letras sobrescritas minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa os tempos de avaliação pelo teste de Tukey.

A concentração de Hemoglobina (g/dL) não foi influenciada pelos grupos utilizados (P = 0,231). Entretanto, aos 20 dias de avaliação (T2 = 15,60 g/dL) foram observados valores médios menores quando comparado aos valores médios encontrados antes do início da oferta das dietas (T0 = 16,16 g/dL).

O Volume Corpuscular Médio (V.C.M, μ), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (C.H.C.M, %) e Metarrubricitos (%) não foram influenciados pelo grupo e nem pelos dias de avaliação (Tabela 2; P > 0,10).

A concentração média de Proteína plasmática (g/dL) encontrada no Grupo Controle foi menor (7,711 g/dL) quando comparada ao Grupo Teste (8,460 g/dL) ($P = 0,035$). Durante os dias de avaliação também foram observadas mudanças na concentração média de Proteína plasmática ($P < 0,001$), sendo observado uma baixa concentração média aos 10 dias ($T1 = 7,852$ g/dL) após início da oferta das dietas, quando comparado aos outros dias de avaliação. Seguido pelo aumento na concentração média aos 20 dias ($T2 = 8,336$ g/dL) quando comparado aos 10 dias ($T1$) e 30 dias ($T3 = 8,042$ g/dL) após início da oferta das dietas (Tabela 2).

A contagem de leucócitos foi similar entre os grupos avaliados ($P = 0,408$) e não houve efeito da interação grupo e tempo de avaliação ($P = 0,298$). Entretanto, maior contagem média de leucócitos foi observada antes do início da oferta das dietas ($T0 = 14.468$ leucócitos/mm³) quando comparado as contagens observadas após 20 ($T2 = 12.757$ leucócitos/mm³) e 30 dias ($T3 = 12.389$ leucócitos/mm³) de oferta das dietas ($P = 0,002$).

A proporção de segmentados foi similar entre os grupos avaliados e os dias de avaliação (Tabela 2; $P > 0,10$), mas observou-se uma tendência de efeito do tempo de avaliação (Tabela 2; $P = 0,074$), com baixas concentrações média de fibrinogênio nos cães após 30 dias de oferta das dietas ($T3 = 58,84\%$) quando comparado ao observado antes do início da oferta das dietas ($T0 = 64,36$).

Os Linfócitos, Eosinófilos, Bastonentes e Metamielócitos tiveram proporções similares entre os grupos e tempos de avaliação ($P > 0,10$; Tabela 2). Enquanto, não foram identificados Mielócitos nem Basófilos nas amostras coletadas.

A proporção de Monócitos foi similar entre os grupos avaliados ($P = 0,619$), porém, houve diferença nos valores médios encontrados ao longo dos dias de avaliação ($P = 0,038$), observando-se valores maiores de Monócitos aos 10 dias ($T1 = 6,78\%$) após início da oferta das dietas, quando comparado ao observado aos 20 dias ($T2 = 4,89\%$) após início da oferta das dietas.

A relação eosinófilos/linfócitos e monócitos/linfócitos não mudaram ao longo dos dias de avaliação e não foram influenciadas pela interação grupo e dias de avaliação ($P > 0,10$; Tabela 3). Entretanto, a média da relação eosinófilos/linfócitos foi influenciada pelos grupos avaliados ($P = 0,027$), encontrando-se menor relação no Grupo Controle (0,256) quando comparado a relação encontrada no Grupo Teste

(0,430). E a média da relação monócitos/linfócitos foi maior no Grupo Teste (0,271) quando comparado ao observado no Grupo Controle (0,121) ($P = 0,007$). A média da relação monócitos/linfócitos foi 2,2 vezes maior no Grupo Teste comparado ao Grupo Controle (Figura 3).

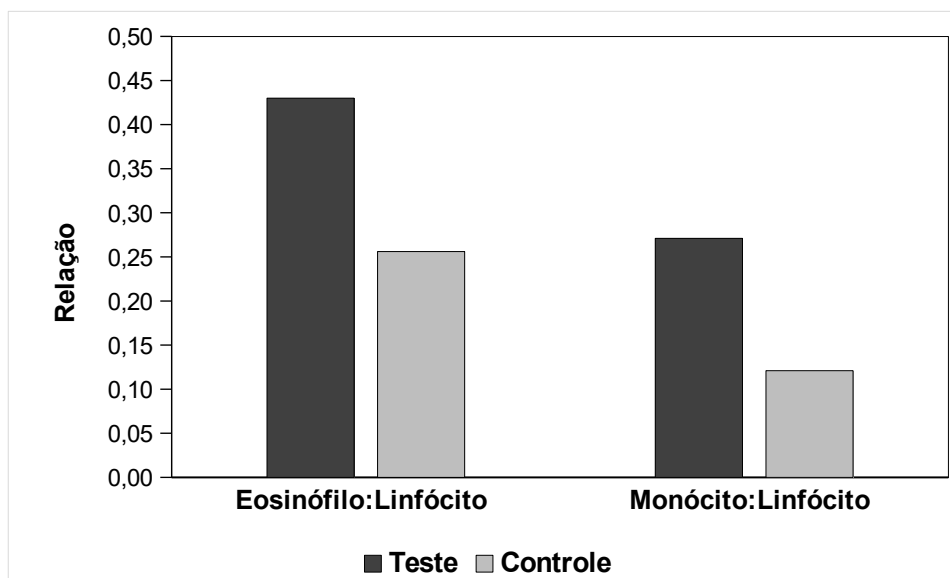


Figura 3. Relação Eosinófilo/Linfócito e Monócito/Linfócito em cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação. Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0 = 26/06/2023 antes do início da oferta das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. Efeito significativo do grupo na relação eosinófilo/linfócito e monócito/linfócito pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

A concentração média de Plaquetas foi maior no Grupo Teste (351.175 plaquetas/mm³) do que observado no Grupo Controle (284.472 plaquetas/mm³) ($P = 0,084$). Adicionalmente, uma menor concentração média de plaquetas foi observada aos 10 dias (T1 = 298.000 plaquetas/mm³) após início da oferta das dietas quando comparado ao valor médio observado antes do início da oferta (T0 = 339.572 plaquetas/mm³).

A concentração média de Creatinina (mg/dL) em soro foi similar entre ambos os grupos testados (Tabela 3; $P > 0,10$). Mas esta variável mudou em função dos dias de avaliação, observando-se alta concentração média de creatinina após 10 dias (T1 = 1,258 mg/dL) após início da oferta das dietas quando comparado aos valores observados após 20 dias (T2 = 0,867 mg/dL) e 30 (T3 = 0,896 mg/dL) de avaliação ($P < 0,001$).

Tabela 3. Parâmetros sanguíneos complementares avaliados em cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação.

	Grupo	Dias de Avaliação				Média	EPM	p-valor		
		T0	T1	T2	T3			L	T	L×T
Creatinina, mg/dL	Teste	1,169	1,216	0,905	0,837	1,031	0,046	0,916	0,007	0,741
	Controle	1,070	1,031	0,826	0,962	1,040				
	Média	1,122 ^{ab}	1,258 ^a	0,567 ^b	0,896 ^b					
Glicose, mg/dL	Teste	85,70	55,20	57,80	72,90	67,90	2,400	0,504	< 0,001	0,241
	Controle	91,33	63,00	97,66	61,63	70,93				
	Média	88,36 ^a	58,89 ^b	62,47 ^b	67,60 ^b					
Ureia, mg/dL	Teste	36,30	34,77	42,30	39,40	38,19	2,559	0,314	0,010	0,186
	Controle	24,44	21,62	29,66	44,66	29,35				
	Média	29,26 ^b	28,54 ^b	36,31 ^{ab}	41,89 ^a					
ALT, U/L	Teste	55,22	51,11	58,22	84,77	61,70	3,169	0,233	0,269	0,024
	Controle	61,70	49,10	51,90	46,50	55,22				
	Média	58,63	50,05	54,89	64,63					

Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0= 26/06/2023 antes do início da oferta das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. EPM = erro padrão da média. L = efeito do Grupo. T = efeito do tempo de avaliação. L × T = efeito da interação grupo – tempo de avaliação. Letras sobrescritas minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa os tempos de avaliação pelo teste de Tukey.

A dieta não influenciou a concentração de ureia em soro dos cães (P = 0,314). Porém, aumento na concentração média de ureia foi detectado após 30 dias de início da oferta das dietas (T3 = 41,89 mg/dL) quando comparado aos valores encontrados antes (T0 = 29,26 mg/dL) e aos 10 dias após início de oferta das dietas (T1 = 28,54 mg/dL).

A concentração de ALT (U/L) apresentou efeito significativo da interação grupo e tempo de avaliação (Tabela 3; P = 0,024). Observando-se alta concentração de ALT no soro de cães do Grupo Teste após 30 dias de avaliação (T3 = 84,77 U/L), quando comparado ao valor médio observado no Grupo Controle (T3 = 46,50 U/L) aos 30 dias (Figura 4). Os valores observados no dia 0 (T0 = 55,2 vs 61,7 U/L), 10 (T1 = 51,1 vs 49,1 U/L) e 20 (T2 = 58,2 vs 51,9 U/L) foram estatisticamente similares entre o grupo teste e controle, respectivamente.

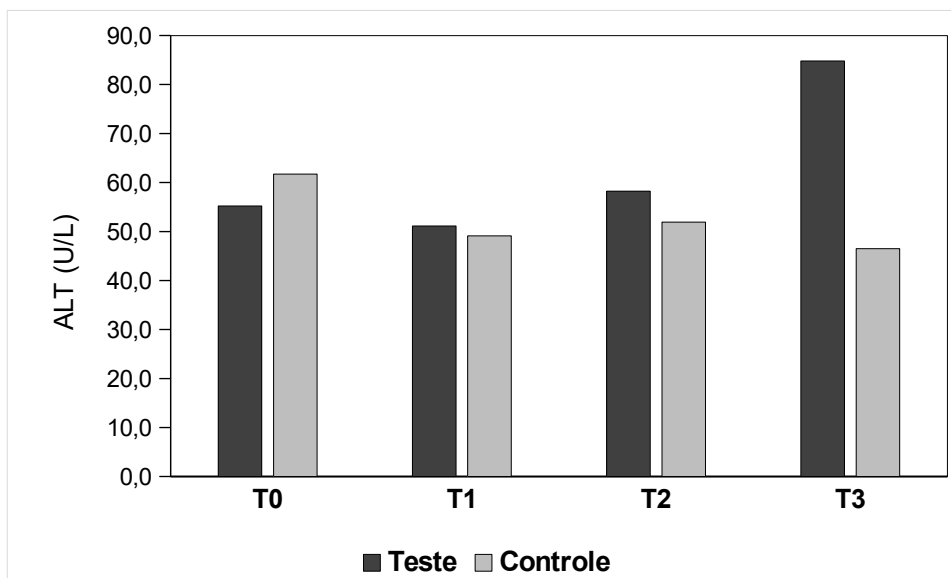


Figura 4. Concentração de ALT (U/L) no soro de cães alimentados com duas dietas em função dos dias de avaliação. Grupo Controle = dieta contendo 20% da fonte de proteína derivada de leite A2. Grupo Teste = dieta contendo 20% da fonte com proteína derivada de leite A1. T0 = 26/06/2023 antes do início da oferta das dietas. T1 = 06/07/2023, 10 dias após início da oferta das dietas. T2 = 16/07/2023, 20 dias após início da oferta das dietas. T3 = 26/07/2023, 30 dias após início de oferta das dietas. Efeito significativo da de interação grupo e tempo de avaliação pelo teste de Tukey ($P = 0,024$).

4 Discussão

O leite é um dos alimentos essenciais para o ser humano e muito utilizado também para demais espécies animais, uma de suas principais características é o elevado teor de proteínas. As proteínas mais frequentes neste alimento segundo Daniloski (2021) são as caseínas (α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína e κ -caseína), importantes fontes de aminoácidos para a dieta dos mamíferos principalmente nos primeiros dias de vida.

De modo geral, as pesquisas sobre β -caseína A2 ainda podem ser consideradas preliminares, no entanto, segundo Olenski (2012) há evidências de relação entre a presença do alelo A2 e a elevada produtividade de leite e concentração proteica na raça Holandesa.

Desta forma a β -caseína A2 tem sido objeto de estudo em várias áreas, inclusive na veterinária. Pois, de acordo com pesquisas recentes tem sido associada a propriedades redutoras do colesterol e dos triacilgliceróis, passando a ser caracterizado pelo seu potencial de digestibilidade mais facilitada e associado a menos problemas gastrointestinais, benefício que é associado a menor liberação de BCM-7 quando comparado ao leite contendo a β -caseína A1 (Daniloski et al., 2021. Olenski, 2012). No entanto, a variante A1 da β -caseína produz um peptídeo bioativo denominado β -casomorfina-7 (BCM-7), que pode desempenhar uma função etiológica ainda desconhecida no desenvolvimento de algumas doenças, (Padilla e Zambrano, 2021).

Outro ponto relevante na pesquisa é a Cobalamina (Cbl) ou vitamina B12 pertence ao grupo das vitaminas hidrossolúveis, é uma importante coenzima na síntese de DNA e lipídios neuronais, essencial para o bom funcionamento do sistema nervoso e hematopoiese (Paniz et al. 2005). A relação entre a concentração de vitamina B12 e a inflamação tem sido amplamente estudada, a literatura científica mostra que baixos níveis de B12 podem estar associados a processos inflamatórios no organismo e um amplo espectro de manifestações clínicas.

A vitamina B12 é importante para o sistema nervoso e para a formação de células vermelhas do sangue. Além disso, outro indicador, a CRP (Proteína C

Reativa) é uma proteína de fase aguda que pode ter sua concentração aumentada em até 1000 vezes durante processos ou doenças inflamatórias (Anziliero et al. 2013). Ela também se mostra um ótimo biomarcador para processos inflamatórios, devido sua função na regulação do sistema imunológico e na produção de células sanguíneas. Assim, durante um processo inflamatório, o corpo aumenta a produção de células imunológicas para combater a infecção ou lesão fazendo com que o consumo de vitamina B12 seja aumentado. Por esses motivos, a vitamina B12 é frequentemente utilizada para acompanhamento e diagnóstico de diversas alterações fisiológicas.

Em pesquisas sobre recuperação de cães após doação de sangue foi observado que a medula óssea de animais com deficiência dessas vitaminas além de não conseguir regenerar com rapidez, produzem hemácias com membranas frágeis e irregulares em vez do formato normal e com sobrevida reduzida (Guyton e Hall 2011 Apud Baeta, 2015).

Em humanos, em um artigo sobre 'Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico' é evidenciado que a deficiência dessa vitamina pode ocasionar transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares, porém ainda não há metodologia laboratorial considerada adequada para sua verificação e especificidades (Paniz, et al., 2005).

Nossos resultados corroboram com essas evidências, uma vez que foi possível observar o grupo com β -caseína A2 apresentar maior concentração de B12, sugerindo uma menor resposta disruptiva, e por consequência inflamatória nesse grupo e demonstrando também menor fibrinogênio.

Além disso, a relação eosinófilo/linfócito – que se refere ao parâmetro hematológico que calcula a proporção entre o número de eosinófilos e o número de linfócitos no sangue periférico, sendo essa relação uma ferramenta importante para avaliar a atividade inflamatória em animais e os eosinófilos são glóbulos brancos envolvidos na resposta a alergias e parasitas, enquanto os linfócitos são fundamentais na resposta imunológica específica – e relação monócito/linfócito – que se refere a um indicador hematológico que calcula a proporção entre os monócitos e os linfócitos no sangue periférico, ferramenta importante para avaliar a atividade inflamatória em animais, pois os monócitos são células do sistema

imunológico que atuam na resposta inicial ao combater infecções e remover detritos celulares, enquanto os linfócitos são fundamentais na resposta imunológica específica – têm sido consideradas marcadores importantes de estresse oxidativo e inflamação.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio (Russo et al. 2016). Já a inflamação é uma resposta do sistema imunológico a lesões, infecções ou doenças. Desta forma o estresse oxidativo e a inflamação estão interligadas, pois os radicais livres ativam genes pró-inflamatórios, os quais desencadeiam uma cascata de inflamações progressivas.

Nossos achados indicam que o grupo com β -caseína A1 exibiu maiores valores dessas relações, o que pode estar relacionado a um desvio do status otimizado de saúde, com tendência a um estado inflamatório mais acentuado e maior estresse oxidativo nesse grupo.

Considerando essas evidências, podemos inferir que a dieta contendo β -caseína A2 pode desencadear um efeito protetor contra processos inflamatórios e estresse oxidativo em cães, estimulando a otimização do status de saúde, enquanto a dieta com β -caseína A1 pode atuar como um fator disruptor endógeno que contribui para o desenvolvimento, agravamento e evolução de processos inflamatórios e desregulação do status de saúde em cães.

5 Conclusão

O presente estudo sugere que a dieta com β -caseína A2 (controle) pode estar relacionada a uma modulação mais favorável do status de saúde dos cães em comparação com a dieta com β -caseína A1 (teste). A maior concentração de vitamina B12 no grupo alimentado com β -caseína A2 sugere uma possível associação inversa entre B12 e inflamação.

As concentrações médias tanto da proteína C reativa quanto do fibrinogênio encontradas no Grupo Teste foram maiores aos valores encontrados em cães alimentados no Grupo Controle.

A relação eosinófilo/linfócito e relação monócito/linfócito maiores no grupo teste indicam a presença de maior estresse oxidativo e inflamação. Esses achados fornecem indícios de que a β -caseína A1 pode atuar como um fator disruptor endógeno que contribui para o agravamento e evolução de processos inflamatórios e desregulação do status de saúde em cães.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante salientar que são necessárias pesquisas adicionais com um maior número de animais, um período de avaliação mais longo e até mesmos indicadores inflamatórios adicionais para confirmar e aprofundar os resultados encontrados.

Priorizamos marcadores que facilitam a rotina clínica, facilmente disponibilizados pelos laboratórios de análises clínicas veterinárias, mas, adicionalmente, recomenda-se investigar outros marcadores inflamatórios e variáveis metabólicas e hormonais para uma avaliação mais abrangente dos efeitos das dietas contendo β -caseína A1 e β -caseína A2 na saúde dos cães.

Em suma, os resultados deste estudo sugerem que a dieta com β -caseína A2 pode ser uma opção mais benéfica para a modulação do status de saúde e redução da inflamação em cães. No entanto, são necessárias investigações mais detalhadas para confirmar esses efeitos e compreender completamente os mecanismos envolvidos nessa relação.

Os resultados encontrados no presente estudo são de grande relevância pois destacam a importância da composição nutricional das dietas e sua influência sobre a saúde e bem-estar dos cães. Além disso, fornecem base para futuros estudos que possam aprofundar o conhecimento sobre o papel da β -caseína A1 e A2 na modulação da resposta inflamatória e na promoção da saúde dos animais. A compreensão desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias nutricionais mais adequadas e personalizadas para a saúde de cães e possivelmente outras espécies animais.

REFERÊNCIAS

Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018, 15 de maio). Os papéis cruciais dos mediadores inflamatórios na inflamação: Uma revisão. *Mundo Veterinário*. Mundo Veterinário. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>.

Aguiar F. J.B, Ferreira, M. J, Sales, M. M., Cruz. L. M. Neto, Fonseca, L. A.M., Sumita, N. M., Duarte, N. J.C., Linchtenstein, A., Duarte, A. J.S. (2013). Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. Artigos de Revisão. REV ASSOC MED BRAS.; 59(1):85-92. scielo.br/j/ramb/a/gKQtTBk44SPSqzYtcjtZTXt/?format=pdf&lang=pt pdf.

Ansar, W.; Ghosh, S.. (2013). C-reactive protein and the biology of disease. *Immunologic research*, v. 56, n. 1, p. 131-142. DOI: [10.1007/s12026-013-8384-0](https://doi.org/10.1007/s12026-013-8384-0). PMID: 23371836.

Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Jul 31;8 (7): 1-10. e3010. DOI: [10.1371/journal.pntd.0003010](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003010). PMID: 25077613; PMCID: PMC4117453.

Asahina, A., Kubo, N., Umezawa, Y., Honda, H., Yanaba, K. and Nakagawa, H. (2017). Neutrophil–lymphocyte ratio, platelet–lymphocyte ratio and mean platelet volume in Japanese patients with psoriasis and psoriatic arthritis: Response to therapy with biologics. *J Dermatol*, 44: 1112-1121. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13875>.

Alencar, N; X. Kohayagawa A. Higino de Campos K. C. (2002) Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 5, n. 2, p. 196-205, 1 jul.. DOI: [10.36440/RECMVZ.V5I2.3274](https://doi.org/10.36440/RECMVZ.V5I2.3274).

Anziliero D., Bazzi E., Pain K.M., Valle S.F. & Kreutz L. 2013. Determination of serum levels of C-reactive protein (CRP) in dogs with changes in haematological parameters. *Ciênc. Anim. Bras.* 14(2):265-272. <https://www.scielo.br/j/pvb/a/M3mLdWHcLNM3CFrLnZFTHRJ/?lang=en>.

Baeta, J. S. V. (2015) Influência da suplementação de ferro e vitaminas hematopoiéticas (vitamina B12 e ácido fólico) no tempo de recuperação do hematócrito em cães após doação de sangue. Viçosa, MG. (ufv.br) pdf.

Barnett, MP et al. (2014) Dietary A1 β -casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 β -casein in Wistar rats. *International journal of food sciences and nutrition*, v. 65, n. 6, p. 720-727. DOI: [10.3109/09637486.2014.898260](https://doi.org/10.3109/09637486.2014.898260). Epub 2014 Mar 20.

Black, S; Kushner, I; Salomons AMOLS, D. (2004) C-reactive protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 47, p. 48487-48490. DOI: [10.1074/jbc.R400025200](https://doi.org/10.1074/jbc.R400025200). Epub 2004 Aug 26.

Cies'lin'ska, A. Kostyra, E. Kostyra, H. Olen'ski, K. Fedorowicz, E. & Kamin'ski. S. (2012) Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7. In *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, June 2012; 63(4): 426-430. Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7 (researchgate.net) DOI: [10.3109/09637486.2011.634785](https://doi.org/10.3109/09637486.2011.634785).

Chuang, L. M., Wu, T. C., Wu, C. C., & Su, T. C. (1995). Exercise-induced changes in immune response. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 94(11), 647-652.

Compri-nardi, M.; Oliveira, C.; Stella A, M. B. (2009). *Práticas de laboratório de bioquímica e biofísica: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 96 p.

Coussens, L M.; Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 860-867. DOI: [10.1038/nature01322](https://doi.org/10.1038/nature01322).

Damiani G., Pilla F., Leone P., Caccio S. (2009) Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine β -casein B variant. *Anim. Genet.* 23:561-566. DOI: [10.1111/J.1365-2052.1992.TB00180.X](https://doi.org/10.1111/J.1365-2052.1992.TB00180.X).

Daniloski, D., D'Cunha, N. M., McCarthy, N. A., O'Callaghan, T. F., McParland, S., & Vasiljevic, T. (2021). Resultados relacionados à saúde do polimorfismo genético de variantes bovinas de β -caseína: uma revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados. *Tendências em Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 111, 233-248. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.073>.

Dinarello, C A. (2011). A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *European journal of immunology*, v. 41, n. 5, p. 1203-1217. DOI: [10.1002/EJI.201141550](https://doi.org/10.1002/EJI.201141550).

Elliot R.B.; Harris, D.P.; Hill, J.P.; Bibby, N.J.; Wasmuth, H.E. Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption.

Diabetologia, v.42, p. 292-296. DOI: [10.1007/S001250051153](https://doi.org/10.1007/S001250051153).

Falce, M. C. L. B. (2009). Hematologia de Répteis - Revisão Bibliográfica. 53 p. Monografia (Pós-graduação em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos) - Universidade Castelo Branco, Instituto Qualittas de Pós Graduação. Campinas. [Hematologia de Repteis - Maria Cecília Lopes Bitten Court Falce | PDF | Sangue | Núcleo celular \(scribd.com\)](#).

Feitian L, Xunbei S, Chunfu D, (2020). Prognostic value of pre-operative peripheral inflammation markers in patients with squamous cell carcinoma of the external auditory canal, Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, Volume 88, Issue 2, 2022, P. 161-167, ISSN 1808-8694. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.05.018>.

Gonzalez, F. H. D.; Scheffer, J. F. S. (2003) Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: I SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2003, Porto Alegre. Anais [...]. Porto Alegre: UFRGS. 73-89 p.

Gonzalez, F. H. D.; Silva, S. C. (2017). Introdução à bioquímica clínica veterinária. ePub rev., atual. e ampl. Porto Alegre: ISBN 978-65-00-43160-5. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/237269>.

Gonzalez, F. H. D.; Silva, S. C. (2008). Patologia clínica veterinária: texto introdutório. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 342.

Greenwood-van M, B. et al. (2004). Preclinical studies of opioids and opioid antagonists on gastrointestinal function. Neurogastroenterology & Motility, v. 16, p. 46-53.

Grego, K. F. et al. (2006). Referências hematológicas para a jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém capturadas da natureza. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 58, n. 6, p. 1240-1243.

Haq, M. R. Ul et al. (2014). Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th 2-mediated inflammatory response in mouse gut. European journal of nutrition, v. 53, n. 4, p. 1039-1049. DOI: [10.1007/S00394-013-0606-7](https://doi.org/10.1007/S00394-013-0606-7).

Ho, S. et al. (2014). Comparative effects of A1 versus A2 β -casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. European journal of clinical nutrition, v. 68, n. 9, p. 994-1000. DOI: [10.1038/EJCN.2014.127](https://doi.org/10.1038/EJCN.2014.127).

Holzer, P. (2009). Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regulatory peptides*, v. 155, n. 1-3, p. 11-17. DOI: [10.1016/J.REGPEP.2009.03.012](https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2009.03.012).

Ho V, Massey T E, King W D. (2013). Effects of methionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on markers of one-carbon metabolism. *Genes Nutr*; 8(6): 571-80. DOI: [10.1007/S12263-013-0358-2](https://doi.org/10.1007/S12263-013-0358-2).

Jianqin, S; Leiming, X.; Lu, X.; Yelland, G. W.; Ni, J.; Clarke, A. J. (2016). Effects of milk containing only A2 β - casein versus milk containing both A1 and A2 β - casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows milk. *Nutrition Journal*. abr. DOI: [10.1186/S12937-016-0147-Z](https://doi.org/10.1186/S12937-016-0147-Z).

Kale A, Naphade N, Sapkale S, Kamaraju M, Pillai A, Joshi S, et al. (2010). Reduced folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid and increased homocysteine and cortisol in never-medicated schizophrenia patients: Implications for altered one-carbon metabolism. *Psychiatry Res* 2010; 175:47–53. DOI: [10.1016/J.PSYCHRES.2009.01.013](https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2009.01.013).

Kamiński S, Cieslińska A, Kostyra E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet*;48(3):189-98. DOI: [10.1007/BF03195213](https://doi.org/10.1007/BF03195213). PMID: 17666771.

Kimura, A; Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology*, v. 40, n. 7, p. 1830-1835. DOI: [10.1002/EJI.201040391](https://doi.org/10.1002/EJI.201040391).

Kumar, A et al. (2018). Milk proteins, health issues and its implications on National Livestock Breeding Policy of India. *Current science*, v. 115, n. 7, p. 1393. DOI: [10.18520/CS/V115/I7/1393-1398](https://doi.org/10.18520/CS/V115/I7/1393-1398).

Lima, R R. et al. (2007). Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev. Para. Med.*, Belém, v. 21, n. 2, p. 29- 34, jun. 2007.

Leppert, W. (2012). The impact of opioid analgesics on the gastrointestinal tract function and the current management possibilities. *Contemporary Oncology*, v. 16, n. 2, p. 125. DOI: [10.5114/WO.2012.28792](https://doi.org/10.5114/WO.2012.28792).

Martin, G R.; Wallace, J L. (2006) Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Experimental Biology and Medicine*, v. 231, n. 2, p. 130-137. DOI: [10.1177/153537020623100202](https://doi.org/10.1177/153537020623100202).

Mathew, B et al. (2011) The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory investigation. *Anesthesia and analgesia*, vol. 112, n. 3, p. 558-567. DOI: [10.1213/ANE.0B013E31820568AF](https://doi.org/10.1213/ANE.0B013E31820568AF).

McLachlan, C.N.(2001). B- casein A1, ischemic heart disease mortality and other illness. *Med.Hypotheses*, v.56, p. 262-272, 2001. DOI: [10.1054/MEHY.2000.1265](https://doi.org/10.1054/MEHY.2000.1265).

Moretti, I. (2023, 22 junho). [Estudos caso-controle: o que são, como fazer e exemplo \(viacarreira.com\)](https://viacarreira.com).

Neurath, M F.; Finotto, S. (2011) IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 22, n. 2, p. 83-89. DOI: [10.1016/J.CYTOGFR.2011.02.003](https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2011.02.003).

Noack, Mélissa; Miossec, Pierre. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity reviews*, v. 13, n. 6, p. 668-677, 2014.

Olen'ski, K.; Cies'lin'ska, A.; Suchocki, T.; Szyda, J.; Kamin'ski, S. (2012). Polimorfismo em sequências codificantes e regulatórias do gene da beta-caseína está associado a características de produção de leite em bovinos Holstein-Friesian. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:53122225>.

Padilla D. J, Zambrano A. JC. (2021). Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. *CES Med. Zootec*; 16(3): 62-95. <https://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.5231>.

Pal, S; Woodford, K.; Kukuljan, S.; Ho, S. (2015). Milk intolerance, β - casein and lactose. *Nutrients*, 7, 7285-7297. DOI: [10.3390/NU7095339](https://doi.org/10.3390/NU7095339).

Paniz, C. et al. (outubro 2005). Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n. 5, p. 323-34.

Ren, K; Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain research reviews*, v. 60, n. 1, p. 57-64. DOI: [10.1016/J.BRAINRESREV.2008.12.020](https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2008.12.020).

Santiso RM, López SP, Robert CL, et al. (2016). Homocisteína, marcador de riesgo vascular. Revisión bibliográfica. *Mediciego*; 22 (Suppl: 1):66-76. (medigraphic.com).

Silva. M. N. (2017). Hematologia veterinária. Belém: EditAEDi. E-book. Disponível em: <http://www.multimedia.ufpa.br/jspui/handle/321654/2525>.

Sethi, G et al. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front biosci*, v. 13, n. 2, p. 5094-5107, 2008. DOI: [10.2741/3066](https://doi.org/10.2741/3066).

Severo J. S.; Santana A. E.; Larsson Jr C. E.; Michalany N. S.; Aoki V.; Larsson C. E. (2016). Avaliação da proteína C reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 13, n. 3, p. 40-40, 18 jan/16.

Shrivastava, Amit Kumar et al. (2015). C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *The Egyptian Heart Journal*, v. 67, n. 2, p. 89- 97. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110260814001173?via%3Dihub>.

Sproston, N R.; Ashworth, J J. (2018). Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 754. DOI: [10.3389/FIMMU.2018.00754](https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00754).

Steinerova, A. et al. (2009). B- CASEIN A1 IS A POSSIBLE RISK FACTOR FOR ATHEROSCLEROSIS: W-A213. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 47. DOI: [10.1016/S1567-5688\(09\)71422-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(09)71422-9).

Sun, L; Richard, D. Y. (2016). Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism. *Gene*, v. 583, n. 1, p. 48-57. DOI: [10.1016/J.GENE.2016.02.044](https://doi.org/10.1016/J.GENE.2016.02.044).

Tanaka, T; Narazaki, M; Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 6, n. 10, p. a016295. DOI: [10.1101/CSHPERSPECT.A016295](https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A016295).

Taylor, S. B., Dwyer, K. Woodford, K. Kost. N. (2017). Revisão Sistemática dos Efeitos Gastrointestinais da A1 em Comparação com a A2 β -Caseína. 8(5):739-748. DOI: [10.3945/an.116.013953](https://doi.org/10.3945/an.116.013953).

Thrall, M. A. et al. (2017). *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Tradução: Alexandre Barros. 2 ed. Reimp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. Roca Ltda.

Vercesi Filho, A.E.; Camargo, G. M. F.; Cardoso, D. F.; Zafra, L. F.; Fernandes, A. R.; Tonhati, H.(2012). Identificação de alelos A1 e A2 para o gene da beta-caseína na raça Gir Leiteiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL. 9.

João Pessoa. Anais... João Pessoa, Paraíba: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2012. [Microsoft Word - sbmaA2 \(sbmaonline.org.br\)](https://www.scribd.com/document/344444444/Microsoft-Word-sbmaA2-sbmaonline-org-br).

Zhang, Y et al. (2019). Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases. *Advances in clinical chemistry*, v. 90, p. 25-80. DOI: [10.1016/BS.ACC.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2019.01.002).

Zoghbi, Sandra et al. (2006). β -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a μ -opioid pathway. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 290, n. 6, p. G1105-G1113. DOI: [10.1152/AJPGI.00455.2005](https://doi.org/10.1152/AJPGI.00455.2005).

ANEXOS

A - CERTIFICADO DE COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO



Certificamos que o projeto intitulado " β -caseína a1 dietética como fator de risco para o desenvolvimento de processos inflamatórios em cães", protocolo nº 4971/23, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "Ad referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	26/06/2023 a 26/08/2023
Espécie / Linhagem	19 Pit Bull e 1 Belgian Malinois
Nº de animais	20
Peso / Idade	17-26 kg, idade de 1 ano a 10 anos
Sexo	8 machos e 12 fêmeas
Origem	Canil

Jaboticabal, 22 de junho de 2023.

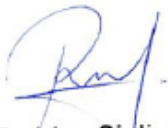
Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-Coordenadora em exercício – CEUA FCAV

B - Identificação de alelo A2A2 do gene da Beta-Caseína INGREDIENTE GRUPO
CONTROLE:

		Laboratório de Genética – Instituto de Zootecnia Secretaria de Agricultura e Abastecimento Rua Heitor Penteado, n. 56 Centro – Nova Odessa – SP – CEP 13380-011 CNPJ 46.384.400/0025-16					
Identificação de alelos A1 e A2 do gene da Beta-Caseína							
Cliente: Inovet Indústria e Comércio de Produtos Veterinários LTDA - Contato do Aníbal – Robert						Caso Nº: 283-2	
Endereço: Rua Sargento Aquino, 451					Bairro: Olaria		
Município: Rio de Janeiro				UF: RJ		CEP:21.021-640	
Telefone: (21)2230.4765			Celular: (19) 98161.2273		e-mail: vinhedo@ino.vet		
CPF/CNPJ: 09.261.542/0001-92					Inscrição Estadual:		
Espécie: Cães e Gatos				Tipo de amostra: Alimento completo para cães e gatos a base de ovos e leite – Baixa Lactose		Recebido em: 25/09/23	
Descrição das análises: A amostra foi submetida à extração de DNA por meio de kit de extração específico que, em seguida, foi submetido à análise genética por PCR em Tempo Real, o que permite a detecção do alelo A1 do gene da beta-caseína na amostra.							
Identificação das Amostras e Resultados							
Ordem	Produto	Cód. Barra	Quantd.	Data Vald.	Lote	Genótipo	% de A1
283-2	Alimento completo para cães e gatos a base de ovos e leite – Baixa Lactose – NF Reability Superpremium	7898936195 425	1 lata de 280g	28/12/24	17448	A2A2	0

Nova Odessa, 28 de Setembro de 2023.

Responsável Técnico:


Rodrigo Giglioti, PhD
 Biólogo, Geneticista
 CRBio n. 124604
 Instituto de Zootecnia-IZ

Diretor Técnico de Serviço:


 Dr. Anibal Eugênio Vercesi Filho
 Anibal Eugênio Vercesi Filho
 Diretor Técnico de Serviço
 ULH-Biotec, da Produção Animal
 RG 10.300.076-8

C - CERTIFICADO DE ANÁLISE DE INGREDIENTE DO PRODUTO GRUPO
TESTE

	CERTIFICADO DE ANÁLISE DE PRODUTO
	LEITE PASTEURIZADO TIPO A2A1

Produto: Leite Pasteurizado tipo A2A1 - 3,0%		
Fab 04/09/2023 – Val 15/09/2023 L.247 -5L/1 L		
Análise Sensorial:		
Aspecto, Cor e odor característicos.		
ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS		
<i>Análises</i>	<i>(resultados)</i>	<i>Especificação</i>
Temperatura (°C)	3,5°C	5,0°C
Acidez (g ácido láctico/100ml)	0,16	0,12 -0,18
Gordura (%)	3,0%	3,0%
Densidade (g/ml)	1,0332	1,028-1,034
Extrato seco Total (%)	12,10%	Min. 1 1,40%
Extrato Seco deseng.(%)	9,10%	Min. 8,40%
Crioscopia (°H)	-0,540	-0,530 a -0,555 °H
Inibidores	aus	aus
Conservante/Adulterantes	aus	aus
*Contagem Total de Enterobactérias (UFC/mL)	<1,0 x10 ⁰	<10 ufc/ml
<p>Fonte de Especificação: Instrução Normativa 76/2019 *Resultado: Médias de análises Físico-Químicas e microbiológicas</p> <p>Os resultados das análises diárias de leite pasteurizado integral estão de acordo com os valores exigidos pela legislação. Os resultados das análises aplicam-se exclusivamente ao lote analisado citado acima. A conservação do produto é sob refrigeração a 5°C.</p>		
<p>Erik A. S. Canonico CRQ – 04436613/ 4ª Região/SP</p>		

D - NF REABILITY GRUPO TESTE E CONTROLE

FÓRMULA NF REABILITY GRUPO TESTE

Ingredientes	%	Kg/360 kg
Calcáreo calcítico	0,306	1,100
Sal refinado	0,330	1,120
Água ou Gelo	78,400	282,000
Lecitina de soja	0,500	1,800
Alga Prime	0,750	2,700
Óleo de coco	3,500	12,600
Fibra de beterraba	1,530	5,500
Leite em pó integral Tipo A1A2	6,000	21,600
Ovo em pó integral	4,000	14,400
Plasma suíno	2,500	9,000
Suplemento mineral cães	0,050	1,800
Taurina	0,061	0,220
Corante caramelo Natural	0,069	0,250
Vitagold	0,100	0,360
Cloreto de potássio	0,500	1,800
Banana desidratada	1,300	4,700
Extrato de alecrim	0,111	0,400
Total	361,350	100,007
		361,350

Composição Química Proximal Calculada na Matéria Natural Para Efeito de Registro no MAPA

Valores na base de MS

Energia Metabolizável (Min)	0,90 Cal/g	4,500 Cal/kg
Umidade (max)	810,00 g/kg	-
Proteína Bruta (Min)	45,00 g/kg	225,00 g/kg
Extrato Etéreo (Min)	45,00 g/kg	225,00 g/kg
DHA (min)	1.000,00 mg/kg	5.000,00 mg/kg
Matéria Mineral (max)	15,00 g/kg	75,00 g/kg
Cálcio (min)	1.500,00 mg/kg	7.500,00 mg/kg
Cálcio (max)	3.500,00 mg/kg	17.500,00 mg/kg
Fósforo (min)	1.000,00 mg/kg	5.000,00 mg/kg
Lactose (min)	5.000,00 mg/kg	25.000,00 mg/kg

Lactose (max)	15,00 g/kg	75,00 g/kg
Sódio (min)	600,00 mg/kg	3.000,00 mg/kg
Cloro (min)	900,00 mg/kg	4.500,00 mg/kg
Potássio (min)	1.800,00 mg/kg	9.000,00 mg/kg
Fibra Bruta (max)	3000,00 mg/kg	15.000,00 mg/kg
CHO Solúvel (max)	40,00 g/kg	200,00 g/kg
Magnésio (min)	150,00 mg/kg	600,00 mg/kg

Composição de AA Essenciais Calculado

	Na M.Natura	% na MS
Arginina	0,31 %	1,55 %
Histidina	0,17 %	0,85 %
Isoleucina	0,27 %	1,35 %
Leucina	0,54 %	2,70 %
Lisina	0,44 %	2,20 %
Metionina	0,14 %	0,70 %
Cistina	0,14 %	0,70 %
Fenil Alanina	0,32 %	1,60 %
Tirosina	0,25 %	1,25 %
Treonina	0,30 %	1,50 %
Triptofano	0,11 %	0,55 %
Valina	0,41 %	2,05 %
Taurina	0,06 %	0,30 %

ENRIQUECIMENTO POR KG DE PRODUTO

Ácido fólico (min)	0,60 mg;
ácido pantotênico (min)	8,00 mg;
Biotina (min)	0,08 mg
Cobalto (min)	0,50 mg
Cobre (min)	4,00 mg
Colina (min)	200,00 mg
Ferro (min)	15,00 mg
Iodo (min)	0,50 mg
Manganês (min)	5,00 mg
Niacina (min)	2,00 mg
Piridoxina- vitamina B6 (min)	2,00mg/kg

Riboflavina (min)	4,00 mg
Selênio (min)	0,10 mg
Tiamina (min)	3,00mg
Vitamina A (min)	3.000,00 UI
Vitamina B12 (min)	10,00 mcg
Vitamina D3 (min)	400,00 UI
Vitamina E (min)	15,00 UI
Vitamina K (min)	1,00 mg
Zinco (min)	25,00 mg

Distribuição % das Fontes de Energia

Proteína	- 21,00%
Extrato etéreo	56,00%
Carboidratos	21,00%

FÓRMULA NF REABILITY GRUPO CONTROLE

Ingredientes	%	Kg/360 kg
Calcáreo calcítico	0,306	1,100
Sal refinado	0,330	1,120
Água ou Gelo	78,400	282,000
Lecitina de soja	0,500	1,800
Alga Prime	0,750	2,700
Óleo de coco	3,500	12,600
Fibra de beterraba	1,530	5,500
Leite em pó integral Tipo A2A2	6,000	21,600
Ovo em pó integral	4,000	14,400
Plasma suíno	2,500	9,000
Suplemento mineral cães	0,050	1,800
Taurina	0,061	0,220
Corante caramelo Natural	0,069	0,250
Vitagold	0,100	0,360
Cloreto de potássio	0,500	1,800
Banana desidratada	1,300	4,700
Extrato de alecrim	0,111	0,400
Total	361,350	100,007
		361,350

Composição Química Proximal Calculada na Matéria Natural Para Efeito de Registro no MAPA

Valores na base deMS

Energia Metabolizável (Min)	0,90 Cal/g	4,500 Cal/kg
Umidade (max)	810,00 g/kg	-
Proteína Bruta (Min)	45,00 g/kg	225,00 g/kg
Extrato Etéreo (Min)	45,00 g/kg	225,00 g/kg
DHA (min)	1.000,00 mg/kg	5.000,00 mg/kg
Matéria Mineral (max)	15,00 g/kg	75,00 g/kg
Cálcio (min)	1.500,00 mg/kg	7.500,00 mg/kg
Cálcio (max)	3.500,00 mg/kg	17.500,00 mg/kg
Fósforo (min)	1.000,00 mg/kg	5.000,00 mg/kg
Lactose (min)	5.000,00 mg/kg	25.000,00 mg/kg
Lactose (max)	15,00 g/kg	75,00 g/kg
Sódio (min)	600,00 mg/kg	3.000,00 mg/kg
Cloro (min)	900,00 mg/kg	4.500,00 mg/kg
Potássio (min)	1.800,00 mg/kg	9.000,00 mg/kg
Fibra Bruta (max)	3000,00 mg/kg	15.000,00 mg/kg
CHO Solúvel (max)	40,00 g/kg	200,00 g/kg
Magnésio (min)	150,00 mg/kg	600,00 mg/kg

Composição de AA Essenciais Calculado

	Na M.Natura	% na MS
Arginina	0,31 %	1,55 %
Histidina	0,17 %	0,85 %
Isoleucina	0,27 %	1,35 %
Leucina	0,54 %	2,70 %
Lisina	0,44 %	2,20 %
Metionina	0,14 %	0,70 %
Cistina	0,14 %	0,70 %
Fenil Alanina	0,32 %	1,60 %
Tirosina	0,25 %	1,25 %
Treonina	0,30 %	1,50 %
Triptofano	0,11 %	0,55 %
Valina	0,41 %	2,05 %

Taurina	0.06 %	0,30 %
---------	--------	--------

ENRIQUECIMENTO POR KG DE PRODUTO

Ácido fólico (min)	0,60 mg;
ácido pantotênico (min)	8,00 mg;
Biotina (min)	0,08 mg
Cobalto (min)	0,50 mg
Cobre (min)	4,00 mg
Colina (min)	200,00 mg
Ferro (min)	15,00 mg
Iodo (min)	0,50 mg
Manganês (min)	5,00 mg
Niacina (min)	2,00 mg
Piridoxina- vitamina B6 (min)	2,00mg/kg
Riboflavina (min)	4,00 mg
Selênio (min)	0,10 mg
Tiamina (min)	3,00mg
Vitamina A (min)	3.000,00 UI
Vitamina B12 (min)	10,00 mcg
Vitamina D3 (min)	400,00 UI
Vitamina E (min)	15,00 UI
Vitamina K (min)	1,00 mg
Zinco (min)	25,00 mg

Distribuição % das Fontes de Energia

Proteína	21,00%
Extrato etéreo	56,00%
Carboidratos	21,00%

E - RAÇÃO UTILIZADA PARA COMPLEMENTAR A DIETA

- Premier Fórmula, porte médio. Adultos a partir de 12 meses



