

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n06a1126.1-9>

Eficácia da adição de prebiótico na modulação da resposta imune de cadelas no pós-parto

Nathalia de Oliveira², Daniel de Souza Ramos Angrimani³, Karine Priscila Silva Duarte², Ana Carolina Rusca Correa Porto^{1*}, Lilian Mara Kirsch Dias¹

¹Docentes do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba, Departamento de Imunologia Veterinária, Sorocaba – SP, Brasil

²Alunas do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba, Sorocaba – SP, Brasil

³Doutorando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo – SP, Brasil

*Autor para correspondência. E-mail: carolvet.porto@gmail.com

Resumo. A reprodução canina e o consequente crescimento populacional vêm aumentando e com eles uma série de doenças infecciosas relacionadas, principalmente no período pós-parto. Com a infecção já instalada, os antimicrobianos são a primeira escolha de tratamento, porém o uso indiscriminado contribui para a resistência bacteriana. Como alternativa, a utilização de aditivos prebióticos é cada vez mais comum por sua eficácia no incremento de resposta imune local e sistêmica e na profilaxia de infecções. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da adição de prebiótico na modulação da resposta imune após o parto em cadelas. Para tanto foram avaliados parâmetros hematológicos, citológicos vaginais e produção de anticorpos específicos. Para tal, oito cadelas prenhes foram submetidas ou não à suplementação com prebiótico a partir do 30º dia de gestação. As coletas das amostras ocorreram até o quarto mês após o parto, consideradas a partir das primeiras 48h, seguindo intervalos de 7,15 e 30 dias. Foi observada anemia discreta somente nas primeiras semanas, e sem alterações na série branca em ambos os grupos. Na citologia vaginal, ocorreram variações de leucócitos e bactérias, porém com maior presença de bactérias nos animais do grupo controle. Foi possível observar o desenvolvimento de resposta imunológica pela produção de anticorpos frente à imunização nos dois grupos, porém com intensidade maior no grupo controle. Dessa maneira, conclui-se que a adição do prebiótico promove modulação positiva no sistema imune das cadelas no pós-parto.

Palavras-chave: Puerpério de cadelas, resistência bacteriana, sistema imunológico, suplemento

Prebiotic efficacy in immune response modulation during postpartum in bitches

Abstract. Canine breeding and population growth have increased and with them a number of related infectious diseases as well, especially in the postpartum period. Antimicrobials are generally a first choice of treatment in veterinary clinics, but indiscriminate use contributes to bacterial resistance. Alternatively, a use of prebiotic additives is increasingly common because of their effectiveness without increased local and systemic immune response. For example, the aim of this work is to evaluate the efficacy of prebiotic addition in response modulation. Parameters, bitches of bitches, pre-launched or not to the pre-biotic supplementation from the 30th day of gestation. Samples were collected up to the fourth month after delivery, considered from the first 48 hours, at intervals of 7.15 and 30 days. A discrete anemia was observed in the first few weeks, and without the white series in both groups. In vaginal cytology, there were variations of leukocytes and bacteria, greater presence of bacteria in the animals of the control group. It was possible to observe the development of immunological response by the production

of antibodies against immunization in both groups, but with a greater intensity than the control group. Thus, we conclude that it is an addition of the prebiotic promotes positive modulation without the immune system of the non-postpartum bitches.

Keywords: Puerperium of bitches, bacterial resistance. immune system, supplement

Introdução

A população de cães domésticos vem aumentando nas cidades e, conseqüentemente, uma série de doenças relacionadas à reprodução também; principalmente no período após o parto ([Lui et al., 2011](#)). Dessa forma, diversos tratamentos são instituídos, e geralmente são os antimicrobianos a primeira escolha nas clínicas veterinárias. Todavia, o uso indiscriminado destas drogas contribui para o aumento progressivo da resistência bacteriana. A resistência aos antibióticos é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública, já que seus produtos e derivados se tornam fontes para resistência bacteriana na espécie humana ([Mota et al., 2005](#)). Uma alternativa, seria a utilização de prebióticos como moduladores de resposta imunológica para auxiliar ou incrementar os tratamentos utilizados, a fim de diminuir os riscos de resistência tanto pelo organismo do paciente em relação a bactéria quanto o inverso.

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimular a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, inibindo a multiplicação de patógenos, além de estimular a resposta imune, levando a benefícios adicionais ao organismo ([Roberfroid, 2002](#); [Roberfroid, 2000](#)). Os dois principais polissacarídeos constituintes da parede celular das leveduras (β -D-glucanos e α -D-manano) têm sido recentemente reconhecidos como prebióticos por serem capazes de promover modulação do sistema imune de diversos organismos vivos, desde insetos até humanos, mediante interações específicas com diferentes células imunocompetentes ([Hesselman & Åman, 1986](#); [Shurson, 2018](#); [Zarghi, 2018](#)). No caso, o prebiótico em estudo foi MOS (Mananoligossacarídeos - obtidos a partir da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e algas marinhas calcárias *Lithothamnium calcareum*). Em estudos de Gouveia et al. ([2006](#)) em cães com gastroenterite, a suplementação diária de 2 g de MOS e 2 g de FOS, conjuntamente na dieta, apresentou os melhores resultados em relação à saúde dos cães, com aumento da resposta imune local (44% a mais de IgA) e diminuição de compostos putrefativos. Em função disso, sabe-se que durante a gestação ocorrem importantes alterações no sistema imunológico materno para que este seja tolerante aos antígenos paternos ([Degli-Esposti & Smyth, 2005](#)). A imunossupressão é uma característica evidenciada no final da gestação, quando os animais normalmente apresentam deficiências na reatividade imune, mediada por células contra antígenos não fetais ([Tizard, 2017](#)). Imediatamente após o parto, inicia-se o puerpério definido como a fase onde ocorre a involução uterina da cadela e a preparação do útero para nova gestação, sendo este classificado em duas fases: delivramento e puerpério ([Grunert et al., 2005](#)), possuindo como duração 12 semanas. Após o parto, a redução da ingestão de alimento e o aumento do consumo energético ocasionado pelo processo de lactação, levam a um quadro de imunossupressão sistêmica, o que aumenta a suscetibilidade das fêmeas à ocorrência de infecções uterinas e outras doenças puerperais ([Lewis, 1997](#)). A suscetibilidade do útero e sua resistência dependem da atividade dos neutrófilos, da motilidade e do tônus uterino, da eliminação de microrganismos e da presença de imunoglobulinas ([Grunert et al., 2005](#); [Nascimento & Santos, 2000](#)).

As cadelas geralmente são acometidas por diversas infecções após o parto, dentre elas a vaginite aguda e crônica ([LeBlanc, 1999](#); [Thacher & Bradley, 1983](#)), endometrite subclínica e crônica ([Cockcroft, 1995](#); [Fayrer-Hosken et al., 1994](#); [Olson et al., 1984](#)), metrite aguda ou puerperal que ocorre após o parto devido a distocia, retenção de placenta e/ou manipulação obstétrica incorreta ([Feldman, 1997](#); [Nelson & Couto, 2015](#); [Purswell, 2004](#); [Sanchez & Ferri, 2002](#); [Tejerina, 1991](#)), subinvolução dos sítios placentários ([Al-Bassam et al., 1981](#); [Burke, 1977](#)) e cistos luteais que tendem a aumentar a produção de progesterona levando a quadros de hiperplasia cística endometrial e piometrite ([Youngquist, 1986](#)).

De acordo com Hansen ([2013](#)), em vacas leiteiras, há fatores de risco que podem explicar variações individuais no desenvolvimento de doenças uterinas após o parto, como por exemplo, exposição a desafio bacteriano superior a idoneidade do sistema imunológico, adaptações ocorridas para manter

concepto durante a gestação podendo persistir e favorecer a presença de microrganismos invasores ou falhas no mecanismo de defesa imune local e/ou sistêmica relacionados com a limpeza do ambiente uterino. É citado também o efeito imunossupressor da progesterona e a presença de células do sistema imunológico que inibem a resposta inflamatória. Em várias espécies, logo após o parto, é comum ocorrer certo grau de infecção uterina ([Nascimento & Santos, 1997](#)). Em sua maioria, as lesões inflamatórias do útero não-gestante têm origem infecciosa e resultam de infecção ascendente por microrganismos que normalmente habitam o trato genital inferior ou por agentes infecciosos introduzidos na cavidade uterina durante o acasalamento, inseminação artificial ou no pós-parto ([Jones et al., 2000](#); [Stockham & Scott, 2011](#); [Zachary et al., 2012](#)). Desse modo, os achados históricos e físicos, além do exame ginecológico completo nas cadelas é de extrema importância para o diagnóstico de patologias da reprodução, fazendo necessária a utilização de exames complementares para a conclusão correta da etiologia, como por exemplo a colpocitologia ([Raskin & Meyer, 2003](#); [Sá, 2008](#)) e hemograma. A colpocitologia permite a associação dos tipos celulares encontrados com achados clínicos, como o caso da presença de leucócitos, como indicativo de infecções do trato reprodutivo e diferencial da fase de diestro ([Apparício et al., 2015](#); [Arthur & Santos, 1979](#); [Geoffrey, 1979](#)). Pelo o hemograma são obtidos valores quantitativos de leucócitos, o que pode auxiliar no diagnóstico de algumas doenças de caráter sistêmico ([Kerr, 2003](#); [Thrall, 2015](#)).

Os tratamentos de doenças reprodutivas variam de acordo com a etiologia e/ou sintomatologia, mas geralmente o uso de antimicrobianos, fluidoterapia, OSH (Ovário Salpingue Esterectomia), e até mesmo agentes hormonais são empregados. Porém, vários estudos têm sugerido que o tratamento com antimicrobianos pode ser contraindicado, uma vez que estes podem impedir a função fagocitária dos neutrófilos uterinos se infundidos diretamente dentro do lúmen. Muitos agentes antimicrobianos ou antissépticos (como iodo e seus derivados) são irritantes para o endométrio, resultando em futura infertilidade ([Johnston et al., 2001](#)). Além disso, deve-se considerar os efeitos prejudiciais sobre os neonatos, já que alguns fármacos podem passar para os filhotes via leite ([Menegassi et al., 2016](#); [Nelson & Couto, 2015](#)). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da adição de prebióticos à base de MOS, na dieta de cadelas gestantes na modulação da resposta imune após o parto utilizando-se de parâmetros hematológicos, citológicos vaginais e produção de anticorpos específicos.

Material e métodos

Animais e grupos experimentais

Este trabalho foi realizado segundo as Normas e Éticas estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP-International Association for the Study of Pain), com aprovação do CEUA (comitê de ética do uso de animais/ nº: A019/CEP/2009).

Foram utilizadas no total oito fêmeas gestantes de raças distintas, escolhidas aleatoriamente, sendo: Yorkshire, Shih-tzu, Maltês, Pastor Alemão e Border Collie. A alimentação das fêmeas de ambos os grupos foi baseada em ração comercial e água a vontade durante todo o estudo. Os animais foram sublocados em dois grupos experimentais: grupo tratado com suplementação (GT) e grupo controle sem suplementação (GC).

Suplementação com mananligossacarídeos (MOS® Univittá Saúde Animal)

A suplementação com MOS® (Univittá Saúde Animal) das fêmeas pertencentes ao GT foi iniciada no 30º dia de gestação contado a partir da data da última cobertura. Se tratando de raças distintas com peso inferior a 10 kg, a dose estipulada foi de 1,5g (doses recomendadas pelo fabricante) por dia, até o dia do parto. O produto fornecido em pó, foi pesado e distribuído em recipientes de vidro, identificados e numerados para cada fêmea do grupo.

Imunização

Para avaliação da resposta imune humoral específica foi realizada a imunização com KHL (Keyhole limpet hemocyanin – KLH) das cadelas gestantes de ambos os grupos. A imunização ocorreu 30 e 23 dias antes da data prevista de parto pela via intramuscular, após avaliação ultrassonográfica dos fetos. Se tratando de raças distintas, fêmeas com peso < 10 kg foram imunizadas com duas doses

de 0,15mg de KHL diluída em água deionizada estéril e fêmeas com peso >10k g foram imunizadas com duas doses 0,25 mg.

Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas 15 dias antes da data prevista do parto, até 48 horas após o parto e nos dias D8, D15, D30, D45, D60, D90 e D120 após a ocorrência do parto. A punção foi realizada pela veia cefálica ou jugular, utilizando seringas descartáveis de 5 ml para possibilitar a retirada de 4 ml de sangue total; e agulhas hipodérmicas (13 x 0,38 mm / Pol. 27,5G 1/2") e armazenados em tubos contendo anticoagulantes (EDTA – pó ou líquido) para a realização de hemograma e em tubos sem anticoagulante para realização do ensaio imunológico.

Em todas as imunizações realizadas foram coletadas entre 0,5 – 1 mL de amostras de sangue, sendo armazenadas em tubo gel (sem anticoagulante) e refrigeradas em caixa de isopor de transporte contendo gelo. Nas primeiras 48h após o parto foram coletados entre 2 – 4 mL de amostras de sangue, contando como D1 (dia 1). As amostras foram armazenadas em tubo gel e tubo com anticoagulante (EDTA), também refrigeradas em caixa de isopor de transporte até a chegada ao laboratório. Os esfregaços sanguíneos foram corados com Panótico para realização de diferenciação de leucócitos no microscópio óptico.

Todas as amostras contidas em tubo gel foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos para posterior retirada do soro. Este foi colocado em tubo plástico, devidamente identificado e armazenado em congelador para posterior análise de anticorpos.

Coleta de amostras para citologia vaginal

Nas primeiras 48h após o parto também foram coletadas amostras para citologia vaginal com o auxílio de 1 ou 2 swab estéreis, que gentilmente foram introduzidos na comissura dorsal da vagina em um ângulo de 45° em direção ao arco isquiático com movimentos de rotação em sentido horário ou anti-horário (Sá, 2008), em seguida sendo transpassadas em lâminas (coradas com Panótico) para posterior análise em microscópio óptico. Da mesma forma que a coleta hematológica, a partir do D1 (dia 1) as coletas se tornaram sucessivas aumentando os intervalos entre elas, sendo: D8, D15, D30, D45, D60, D90 e D120. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em porta lâmina. As análises citológicas foram baseadas segundo estudos de Allen (1985) e Sá (2008), quantificando as estruturas observadas (presença de neutrófilos, leveduras e bactérias) em nulas/quase nulas (0), raras (1), frequentes (2), abundantes (3) e incontáveis (4).

Hemogramas e hematócritos

Amostras contidas no tubo de EDTA foram homogeneizadas e processadas no contador automático de células da marca Brasmed® (*Full-auto Hematology Analyzer*), além de centrifugadas em microcapilares por 5 minutos a 11.500 RPM para leitura dos hematócritos e realização de esfregaço sanguíneo para avaliação qualitativa.

Dosagens de imunoglobulinas específicas

Para dosagens de imunoglobulinas no soro, foi realizado o ensaio de ELISA para verificar a presença de anticorpos IgG capazes de reconhecer a proteína KLH. Placas de poliestireno de 96 poços (NUNC, Inc. Naperville USA) foram incubadas com a preparação de KHL (1%) em tampão carbonato de sódio 0,2M, pH 9,6 (50µL/poço). Após 24 horas de incubação a 4°C, o conteúdo líquido de cada poço foi removido através de lavagens sucessivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T/Sigma ChemicalCo. St Louis, MO, USA), seguindo-se bloqueio (100µL/poço) com gelatina a 3% diluída em PBS-T, por 1 hora a 37° C, em banho maria. As placas foram lavadas uma vez com PBS-T e incubadas com as amostras do soro antes e após a imunização, em diferentes diluições na solução de bloqueio (gelatina 1%), por 2 horas a 37° C. Após 4 lavagens com PBS-T, deveu-se incubar com anticorpos anti-IgG de cão conjugado a peroxidase (BethylLaboratories INC, Montgomery, Texas, USA) (100µL/poço). Após 1 hora de incubação a 37° C, os poços foram lavados 4 vezes com PBS-T e em seguida a reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de 100 µL/poço da solução reveladora [peróxido de hidrogênio 0,1% (30 vol, 19µL) (Merck S.A., Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, BR), ortofenilenodiamina (5mg) (p/v) (Sigma), ácido cítrico 0,1M (3mL), fosfato de sódio 0,2M (3,2mL)

pH 5,5 e água destilada (6,25mL)], com incubação por 10 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 2M. A leitura de absorbância foi feita em comprimento de onda de 490nm em leitor automático de ELISA (Multiskan MMC/340 P, Version 2.20).

Análise estatística

Todos os dados foram avaliados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os efeitos de grupo, tempo de avaliação, e as interações entre esses fatores foram estimados pelas medidas repetidas ANOVA (procedimento MIXED do SAS). Diferenças entre os tratamentos foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos, de acordo com a normalidade residual (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. Sempre que um desses pressupostos não foi respeitado, os dados foram transformados. Se transformações não foram bem-sucedidas, foram utilizados os testes não paramétricos. No caso de não ocorrer significativas interações, o efeito dos grupos foi analisado ao fundir todos os momentos de avaliação, e, inversamente, os tempos de avaliação foram comparados combinando todos os grupos, tendo em conta a correção de Bonferroni (PROC GLIMMIX); caso contrário, as comparações foram realizadas tendo em conta os efeitos principais combinados. As variáveis respostas foram também submetidas à análise de correlação de Spearman. Os resultados foram descritos como a média e erro padrão. O nível de significância utilizado foi de 5%. Ou seja, foram consideradas diferenças estatísticas entre as variáveis de classificação para uma determinada variável resposta se $P \leq 0,05$.

Resultados

A suplementação com MOS a base de pó homogeneizado à ração seca não foi bem aceita pelas fêmeas gestantes. Houve aceitação somente quando adicionado a alimento úmido ou a água propriamente dita, formando uma espécie de papinha. Observou-se também que uma das cinco fêmeas testadas apresentou reação a suplementação, com sintomatologia clínica de êmese e diarreia, sendo necessário a retirada desta do estudo.

Não houve interação entre os momentos de avaliação (D1, D8, D15, D30, D45, D60, D90 e D120) e os grupos experimentais (controle x tratado, [Tabela 1](#)). Dessa maneira as variáveis foram analisadas considerando apenas a diferença entre os grupos (controle x tratado, [Tabela 2](#)), unindo todos os momentos de avaliação. Não foram avaliados quaisquer efeitos relevantes nos momentos de avaliação, independente dos grupos avaliados.

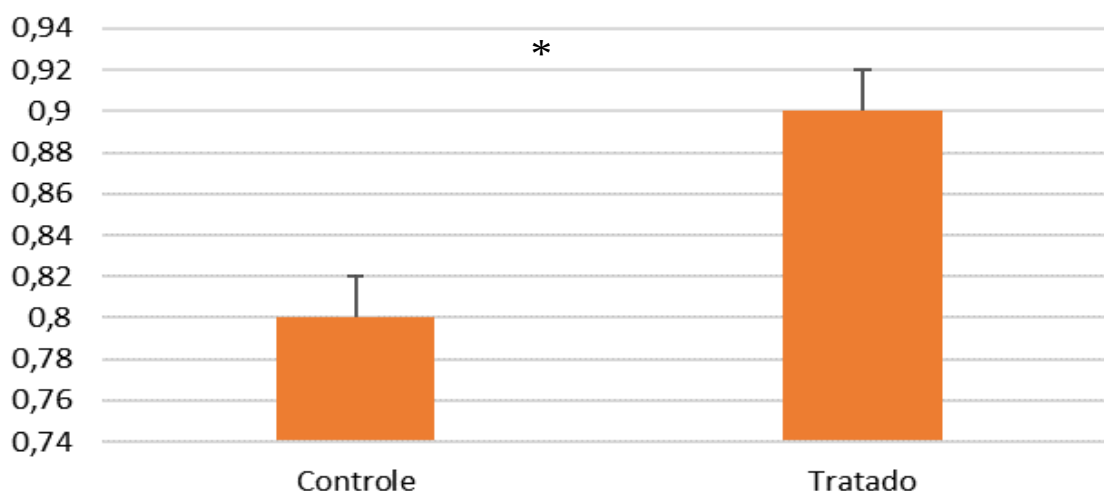
Tabela 1. Valores de probabilidade para o efeito dos grupos (tratado x controle) e tempo (1, 8, 15, 30, 45, 60, 90 e 120) e sua interação para as variáveis experimentais.

Variáveis	Grupo	Tempo	GxT
ELISA (nm)	0,07	<0,0001	0,97
Hemácia (mm ³)	0,53	<0,0001	0,38
Hemoglobina (g/dL)	0,0014	<0,0001	0,24
Hematócrito (%)	0,56	<0,0001	0,22
Volume Corpuscular Médio (fL)	0,26	0,16	0,25
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	0,18	0,06	0,15
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%)	0,13	0,21	0,22
PTT (dL)	0,78	0,38	0,33
Plaquetas	0,77	0,41	0,37
Leucócitos (mm ³)	0,89	0,52	0,18
Metamielócito (mm ³)	0	0	0
Bastonetes (mm ³)	0,27	0,60	0,81
Segmentados (mm ³)	0,62	0,14	0,72
Linfócitos (mm ³)	0,17	0,48	0,13
Eosinófilos (mm ³)	0,28	0,04	0,71
Monócitos (mm ³)	0,25	0,01	0,14
Basófilos (mm ³)	0	0	0
Metarrubricitos (mm ³)	0	0	0
Colpocitologia/leucócitos (0-4)	0,13	0,09	0,70
Colcocitologia/leveduras (0-4)	0,32	0,36	0,68
Colpocitologia/bactérias (0-4)	0,01	0,64	0,87

Tabela 2. Média e erro padrão dos efeitos dos grupos (controle x tratado) nas variáveis analisadas

Variável	Controle	Tratado	P
ELISA (nm)	0,08±0,02	0,9±0,02	<.0001
Hemácia (mm ³)	5,8±0,18	6,1±0,21	0,26
Hemoglobina (d/dL)	13,3±0,36	14,8±0,36	0.0008
Hematócrito (%)	36,8±0,88	38,1±1,1	0.32
Volume Corpuscular Médio (fL)	66,9±0,55	65,5±0,37	0.03
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	22,6±0,59	24,5±0,63	0.01
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (%)	33,8±0,87	37,5±1,03	0.0056
PTT (dL)	7,06±0,14	7,1±0,16	0.61
Plaquetas	332862,0±14917,39	352156,2±23739,49	0.49
Leucócitos (mm ³)	10572,4±853,40	10662,5±572,16	0.92
Metamielócitos (mm ³)	0	0	0
Bestonetes (mm ³)	27,6±12,91	75,1±27,47	0.12
Segmentados (mm ³)	8195,2±692,57	7232,8±460,78	0.25
Linfócitos (mm ³)	2444,0±205,03	3195,8±239,04	0.01
Eosinófilos (mm ³)	160,2±28,61	104,8±20,07	0.11
Monócitos (mm ³)	137,1±28,9	79,0±18,31	0.09
Basófilos (mm ³)	0	0	0
Metarrubríctos (mm ³)	0	0	0
Colpocitologia/Leucócitos	2,4±0,14	1,7±0,15	0.0048
Colpocitologia/Leveduras	1,2±0,15	0,9±0,12	0.09
Colpocitologia/Bactérias	2,4±0,12	1,6±0,12	<.0001

Assim, na análise do ELISA, foi possível observar maior produção de anticorpos frente ao KLH nos animais do grupo tratado (0,9±0,02nm), em relação ao grupo controle (0,8 ± 0,02, [Figura 1](#)). Em estimativa citológica, houve maior presença de bactérias e leucócitos no grupo controle (bactérias: 2,4 ± 0,12; neutrófilos: 2,4 ± 0,14 – 0-4), em relação ao grupo tratado (bactérias: 1,6 ± 0,12; neutrófilos: 1,7 ± 0,15 – 0-4, [Figura 2](#)). As demais variáveis hematológicas não tiveram efeito significativo para comparação entre os grupos, cuja média dos valores em hemograma e leucograma se encontraram dentro dos valores normais de referência ([Tabelas 1 e 2](#)); porém, a proporção no número de linfócitos do grupo tratado (3195,8±239,04mm³) foi relativamente maior em relação ao grupo controle (2444,0 ± 205,03mm³, [Tabela 2](#)). Já em análise qualitativa nos esfregaços sanguíneos foram notados somente a presença de corpúsculos de Howel-Jully nas lâminas de algumas fêmeas nas primeiras semanas após o parto.

**Figura 1.** Média e erro padrão dos efeitos de grupo (controle x tratado) no ELISA.

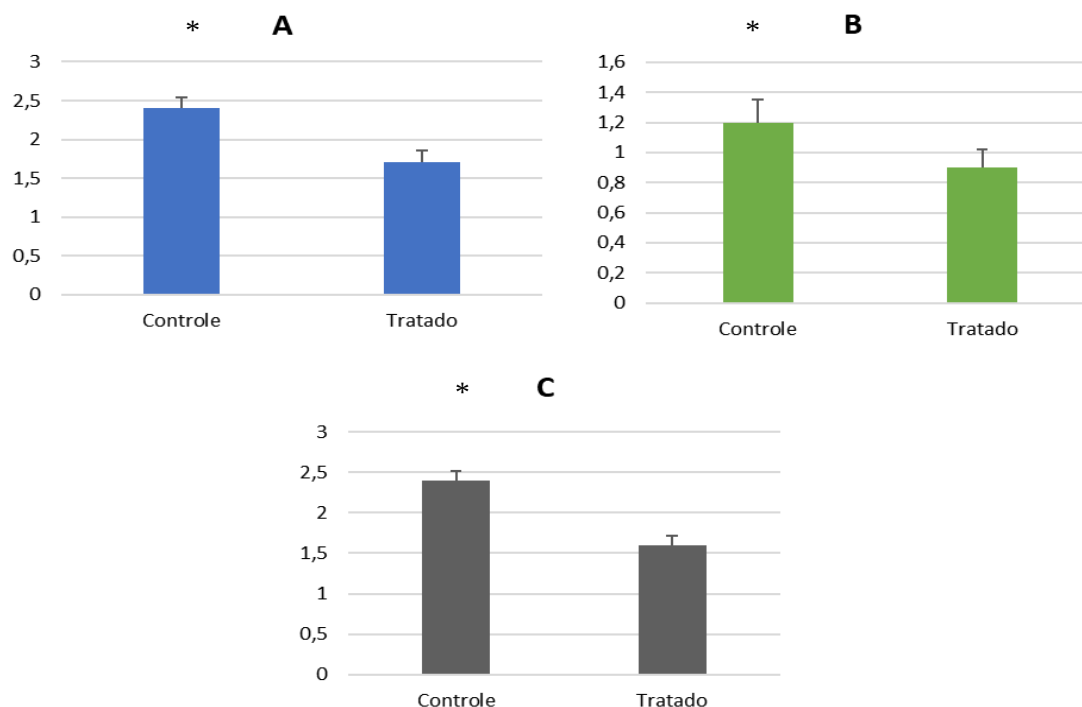


Figura 2. Média e erro padrão dos efeitos de grupo (controle x tratado) na citologia vaginal. Detecção de leucócitos (A), leveduras (B) e bactérias (C). * indica $p < 0,05$.

Discussão

Observou-se rejeição da ingestão do suplemento pelos animais, sendo necessário desenvolvimento de novas formas de apresentação. Foi possível constatar que não houve influência do MOS de forma significativa em incrementar as contagens celulares através de hemograma e leucograma das progenitoras. Contudo, a mensuração de maior produção de linfócitos pelo grupo tratado aparentemente sugere modulação na resposta imunológica. Se tratando de fêmeas saudáveis, sem quaisquer sinais clínicos ou achados em esfregaço, a presença do corpúsculo Howell-Jolly - fragmentos nucleares arredondados (micronúcleos) - pode ser justificada pelos efeitos de coloração ([Kirsch-Volders et al., 2003](#)).

Os achados em citologia vaginal apresentaram variações entre as fêmeas de ambos os grupos, sendo maior a presença de bactérias e leucócitos nas amostras do grupo controle ([Figura 2](#)). Todavia, a presença de grande número de leucócitos possivelmente não está associada a algum processo patológico, uma vez que no diestro é considerado normal em fêmeas sadias, sendo rara a presença de bactérias na fase de anestro ([Allen, 1985](#); [Ettinger et al., 2017](#); [Raskin & Meyer, 2003](#)). Dessa forma, a influência das boas condições da amostra, a manipulação laboratorial, o uso correto dos corantes, além de fatores como porte, raça e qualidade de amostra, pode ter influenciado nos resultados, não possibilitando uma justificativa plausível em relação à suplementação ([Motta et al., 2001](#)).

No ensaio imunológico (ELISA) observou-se desenvolvimento de resposta imunológica, frente à imunização com KHL nos animais de ambos os grupos em todas as amostras coletadas ([Figura 1](#)). Os níveis de anticorpos foram superiores nos animais do grupo tratado em todos os momentos analisados. Tal fato está de acordo com o observado por Gouveia et al. ([2006](#)) que cita a efetividade do MOS em relação à melhora na saúde dos cães suplementados com aumento da resposta imune local, caracterizada por uma maior produção de anticorpo.

Conclusão

De acordo com os dados coletados, não houve alterações relevantes entre os grupos frente aos resultados de hemograma e colpocitologia vaginal, sendo necessário maiores estudos relacionados. Entretanto, a obtenção de maiores títulos de anticorpos específicos contra a proteína utilizada pelo grupo testado com suplemento MOS, sugerem positivamente a influência deste no incremento da resposta imunológica dessas fêmeas.

Referências bibliográficas

- Al-Bassam, M. A., Thomson, R. G., & O'Donnell, L. (1981). Involution abnormalities in the postpartum uterus of the bitch. *Veterinary Pathology*, 18(2), 208–218. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098588101800208>
- Allen, W. E. (1985). Abnormal vaginal cytology in a fertile bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 26(6), 343–347. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1985.tb02208.x>
- Apparício, M., Vicente, & Russiano, W. R. (2015). Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. *MedVet*, 2, 9–13.
- Arthur, G. H., & Santos, O. R. F. (1979). *Reprodução e obstetrícia em veterinária*. Guanabara Koogan.
- Burke, T. J. (1977). Post-parturient problems in the bitch. *The Veterinary Clinics of North America*, 7(4), 693–698. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0091-0279\(77\)50079-2](https://doi.org/10.1016/s0091-0279(77)50079-2)
- Cockcroft, P. D. (1995). Focal cystic endometrial hyperplasia in a bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 36(2), 77–78. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1995.tb02830.x>
- Degli-Esposti, M. A., & Smyth, M. J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Reviews Immunology*, 5(2), 112–124. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1549>
- Ettinger, Stephen J, Feldman, E. C., & Cote, E. (2017). *Textbook of Veterinary Internal Medicine-eBook*. Elsevier Health Sciences.
- Fayrer-Hosken, R., Caudle, A., Downs, M., & Miller-Liebl, D. (1994). Evaluating the infertile breeding bitch. *Veterinary Medicine*, 1026–1038.
- Feldman, E. C. (1997). Tratado de medicina interna veterinária. In *Moléstias do cão e do gato* (Vol. 3).
- Geoffrey, H. A. (1979). *Reprodução e obstetrícia em veterinária: Retenção das membranas fetais*. Guanabara Koogan.
- Gouveia, E. M. F., Silva, I. S., Van Onselem, V. J., & Corrêa, R. A. C. (2006). Uso de mananoligossacarídeos fosforilados como adjuvante no tratamento de doenças gastrointestinais e seu efeito na inativação da E. coli em cães. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21, 23–26.
- Grunert, E., Birgel, E. H., & Vale, W. G. (2005). *Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia*. Varela.
- Hansen, P. J. (2013). Maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: Is there a prepartum–postpartum nexus? *Journal of Animal Science*, 91(4), 1639–1649. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5934>
- Hesselman, K., & Åman, P. (1986). The effect of β -glucanase on the utilization of starch and nitrogen by broiler chickens fed on barley of low-or high-viscosity. *Animal Feed Science and Technology*, 15(2), 83–93. DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(86\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(86)90015-5)
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001). Periparturient disorders in the bitch. In: -. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders. Cap.7, 129-131.
- Jones, T. C., D., H. R., & King, N. W. (2000). *Patologia veterinária*. Editora Manole Ltda.
- Kerr, M. G. (2003). *Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia*. Roca.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr, M., Kirchner, S., Lorge, E., & Morita, T. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153–163. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(97\)00030-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(97)00030-6)
- LeBlanc, M. M. (1999). Diseases of the vagina, vestibule and vulva. In P. T. Colahan, A. M. Merritt, & J. N. Moore (Eds.), *Equine medicine and surgery* (pp. 1175–1193).
- Lewis, G. S. (1997). Uterine health and disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(5), 984–994. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(97\)76024-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(97)76024-7)
- Lui, J. F., Toniollo, G. H., Savi, P. A. P., Voorwald, F. A., Silva, M. A. M., & Tosta, P. A. (2011). Esterilização cirúrgica de caninos e felinos em Jaboticabal. Interação entre o benefício social e a pesquisa científica. *Revista Ciência Em Extensão*, 7(2), 29–40.

- Menegassi, C. C., Martins, I. C. S., Pereira, G. M., Gomes, L. G., Bezerra, K. S., Spiller, P. R., Martini, A. C., Souza, R. L., & Ribeiro, A. P. (2016). Aspectos clínicos, cirúrgicos, histológicos e pós-operatórios de oito cadelas com leiomioma vaginal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(2), 307–312. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8232>
- Mota, R. A., Silva, K. P. C., Freitas, M. F. L., Porto, W. J. N., & Silva, L. B. G. (2005). Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 42(6), 465–470. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2005.26406>
- Motta, E. V., Fonseca, A. M., Bagnoli, V. R., Okumura, H., Ramos, L. O., Okada, M. M. K., Pereyra, E. A. G., & Pinotti, J. A. (2001). Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 47(4), 302–310. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0104-42302001000400032>
- Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2000). *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. Grupo Gen-Guanabara Koogan.
- Nelson, R. W., & Couto, C. G. (2015). *Medicina interna de pequenos animais* (Issue 1). Elsevier Editora.
- Olson, P. N., Thrall, M. A., Wykes, P. M., Husted, P. W., Nett, T. M., & Sawyer, H. R. (1984). Vaginal cytology. Part I. A useful toll for staging the canine estrous cycle. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 6(4), 288–298.
- Purswell, B. J. (2004). Vaginal disorders. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. Elsevier Saunders.
- Raskin, R. E., & Meyer, D. J. C. (2003). *Atlas de citologia de cães e gatos*. Roca.
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88(SupplementS2), S133–S138. DOI: <https://doi.org/10.1079/bjn2002677>
- Roberfroid, Marcel B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1660s-1664s. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1660s>
- Sá, F. N. (2008). Citologia e histopatologia: a sua importância no diagnóstico de tumores mamários em canídeos e felídeos. In *Faculdade de Medicina Veterinária: Vol. Master of*. Universidade Técnica de Lisboa.
- Sanchez, S. T., & Ferri, R. C. (2002). Reconhecimento e considerações da distocia em fêmeas da espécie canina: revisão. *Clínica Veterinária*, 41, 38–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.013>
- Shurson, G. C. (2018). Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology*, 235(June 2017), 60–76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>
- Stockham, S. L., & Scott, M. A. (2011). Fundamentos de patologia clínica veterinária. In *Guanabara Koogan* (Vol. 8).
- Tejerina, J. C. D. F. (1991). Distocias maternas. *Tratado de Veterinaria Práctica Bovis*, 42, 39–53.
- Thacher, C. I., & Bradley, R. L. (1983). Vulvar and vaginal tumors in the dog: a retrospective study. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(6), 690–692.
- Thrall, M. A. (2015). Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. In 2. ed. Editora Roca.
- Tizard, I. R. (2017). *Veterinary Immunology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Youngquist, R. S. (1986). Cystic follicular degeneration in the cow. *Current Therapy in Theriogenology*, 2, 243–246.
- Zachary, J. F., McGavin, D., & McGavin, M. D. (2012). *Bases da patologia em veterinária*. Elsevier Brasil.
- Zarghi, H. (2018). Application of xylanases and β -glucanase to improve nutrient utilization in poultry fed cereal base diets: Use of enzymes in poultry diet. *Insights in Enzyme Research*, 2(1), 11–17. DOI: <https://doi.org/10.21767/2573-4466.100011>

Histórico do artigo:**Recebido:** 16 de fevereiro de 2022.**Aprovado:** 14 de março de 2022.**Artigo disponível online:** 31 de maio de 2022**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.