

**UNIVERSIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO DO ESTADO E DA REGIÃO DO
PANTANAL – UNIDERP**

ELIANA MARIA MOREIRA FERREIRA GOUVEIA

**VIABILIDADE DO USO DE MANANOLIGOSSACARÍDEOS FOSFORILADOS
(Bio-Mos®) EM DOENÇAS GASTROINTESTINAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMPO GRANDE – MS
2004**

ELIANA MARIA MOREIRA FERREIRA GOUVEIA

**VIABILIDADE DO USO DE MANANOLIGOSSACARÍDEOS FOSFORILADOS
(Bio-Mos[®]) EM DOENÇAS GASTROINTESTINAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissionalizante em Produção e Gestão Agroindustrial, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção e Gestão Agroindustrial.

Orientação:

Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

Prof. Dr. Edison Rubens Arrabal Arias

Prof. Dr. Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro

CAMPO GRANDE – MS

2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UNIDERP

G719v Gouveia, Eliana Maria M. F.
Viabilidade do uso de mananoligossacarídeos fosforilados (bio-
Mos®) em doenças gastrointestinais em Medicina veterinária / Eliana
Maria M. F. Gouveia. -- Campo Grande, 2004.
28 f. : il. color.

Dissertação (mestrado)- Universidade para o
Desenvolvimento do
Estado e da Região do Pantanal, 2004.
Inclui bibliografia.

1. Medicina veterinária 2. Cães 3. Mananoligossacarídeos
fosforilados 4. Probiótico I. Título.

CDD 21.ed. 636.7089632

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: **Eliana Maria Moreira Ferreira Gouveia**

Dissertação defendida e aprovada em 23 de novembro de 2004 pela Banca Examinadora:

Profa. Doutora **Iandara Schettert Silva (Orientadora)**

Prof. Doutor **Alfredo Sampaio Carrijo (UFMS)**

Prof. Doutor **Ricardo Dutra Aydos (UFMS)**

Prof. Doutor **Francisco de Assis Rolim Pereira**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Produção e Gestão Agroindustrial

Profa. Doutora **Lúcia Salsa Corrêa**
Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da UNIDERP

Nossas vidas não resultam de acontecimentos e ações aleatórias. O período de cada vida é cuidadoso e sabiamente planejado para nos dar uma oportunidade de aprendizagem e evolução”.

(Brian Weiss)

A meus pais, Realino e Nayr, e aos meus irmãos Luiz, Miguel, Rafael, Ricardo e Regina, que sempre incentivaram meus ideais, dedico mais esta conquista.

Dedico esta vitória, também, ao meu esposo Gilber, companheiro para qualquer batalha, paciente e compreensivo, e ao meu querido filho Gilber Júnior, fontes de amor, de vida e estímulo para seguir sempre adiante.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida.

À Profa. Dra. Iandara Schettert Silva, pela orientação e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valter Joost Van Onselen, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela orientação das análises estatísticas.

À Alltech pelo incentivo à pesquisa e pelo fornecimento do Bio-Mos[®].

À Camila Junqueira e Silva, pela colaboração na digitação e pela dedicação na realização deste experimento.

À Gislaine Gouveia, pelo incentivo e auxílio para a realização do presente trabalho.

À Juliana Carrijo, pela colaboração na tradução das referências estrangeiras.

Aos funcionários da Clínica Veterinária Saúde Animal, Áureo, Gislaine, Shirlei e a colega Perla, pela ajuda nas coletas de materiais e cuidados com os animais.

Aos meus colegas mestrandos, pelo agradável convívio e apoio.

A todos os amigos que contribuíram na realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Número Total de Leucócitos totais.....	21
FIGURA 2: Número Total de Neutrófilos segmentados.....	22
FIGURA 3: Número Total de Linfócitos.....	24
FIGURA 4: Percentual de cães positivos para <i>Escherichia. coli</i>	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Grau de desidratação e suas características.....	17
TABELA 2: Variações de referência hematológicas para cães.....	17
TABELA 3: Distribuição dos animais conforme os grupos com gastroenterite ou saudáveis.....	20
TABELA 4: Presença ou ausência de <i>Escherichia. coli</i> na coprocultura.....	27

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 AMOSTRA.....	16
3.2 PROCEDIMENTO.....	16
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
5 CONCLUSÃO.....	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	36

RESUMO

Avaliou-se o efeito da adição de mananligossacarídeos fosforilados (2 g/animal) em cães de 2 a 6 meses de idade, com gastroenterite e clinicamente saudáveis, com ou sem vacina, pacientes de uma Clínica Veterinária. No experimento, foram avaliados os leucócitos, neutrófilos, linfócitos e a presença de bactérias enteropatogênicas nas fezes, através de coprocultura de 16 animais, distribuídos em dois grupos, sendo o G₁ composto por oito animais com gastroenterite; e o G₂, por oito animais clinicamente saudáveis. Os animais de cada grupo foram separados em dois subgrupos, A e B, com quatro animais cada um. O primeiro subgrupo G₁A₁ recebeu MOS; o segundo subgrupo G₁B₁ foi tratado sem o MOS. Da mesma forma, o subgrupo G₂A₂ recebeu o Mos; e G₂B₂ foi tratado sem o MOS. Para avaliação da coprocultura utilizou-se presença e ausência de E. coli, sendo que, essa bactéria apareceu em todos animais do G₁ e desapareceu em todos os animais que receberam MOS. Nos animais que receberam MOS, houve uma estabilização nos leucócitos mesmo quando houve diferença da primeira para a terceira coleta, considerou-se clinicamente como melhora do quadro.

PALAVRAS-CHAVE: cães, mananligossacarídeos fosforilados, probiótico.

ABSTRACT

It was evaluated the addition of mananoligosacarideos fosforilados (2 g/animal) in dogs ranging from 2 to 6 months old. Some dogs presented gastroenteritis and others were clinically healthy, all of them patients of a veterinarian clinic. In the study the leucocytes, neutrophyles, linfocytes and the presence of entheropathogenics bacteria in the feces were evaluated by means of the coproculture of 16 animals divided into two groups. G₁ was composed by eight animals with gastroenteritis and G₂ was composed by eight clinically healthy animals. The animals in each group were separated into sub-group A and sub-groupB with four animals each, received MOS or not. It was used the presence and absence of E. Coli in the coproculture analysis. When this bacteria was present in all animals of G₁ and disappeared in all animals that received the MOS. There was a leukocyte stabilization in the physiological parameters in those animals that received the MOS. It was noticed an overall improvement in the conditions of those dogs that received the MOS and presented a number of neutrophyles and phynphocytes out of the physiological parameters whose third collect presented normal parameters.

KEYWORDS: dogs, *monanoligosacarideos fosforilados*, probiotic, physiological parameters, gastroenteritis.

1 INTRODUÇÃO

Os mananoligossacarídeos fosforilados (MOS) são extraídos das paredes celulares da levedura *sacharomyces cerevisiae*. Esse carboidrato complexo oferece receptores ricos em manose para atrair as bactérias patogênicas, ocupando o sítio de ligação do patógeno e evita que as bactérias se liguem a manose do epitélio intestinal e provoquem doenças nos animais. Nesse experimento foram utilizados cães, e dada a escassa publicação nessa espécie citando o MOS para fins terapêuticos, citaremos trabalhos em outras espécies animais.

Os aditivos alimentares microbianos, definidos como fontes de microorganismos vivos (viáveis), incluem bactérias, fungos e leveduras, dos quais os considerados mais importantes e comumente utilizados na dieta de ruminantes são as leveduras ou culturas de leveduras e os extratos fúngicos, freqüentemente citados como sinônimos, embora um pouco distintos.

Os carboidratos desempenham vários papéis nutricionais e funcionam em cães, gatos e outros animais de companhia. Acreditava-se que os carboidratos desempenhavam três funções importantes em sistemas biológicos. A primeira seria atuar como fonte de energia ou componente de armazenamento de reservas de energia; a segunda função, a de componente estrutural, como na celulose e na quitina; a terceira função intrigava os cientistas.

A Alltech foi fundada em 1980 na cidade de Lexington, Kentucky. Começou sua história com o desenvolvimento do Yea-Sacc ¹ a partir de uma cepa natural da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Depois do sucesso do Yea-Sacc, os cientistas dos Centros de Biociências da Alltech pesquisaram e desenvolveram uma série de ingredientes e aditivos nutricionais obtidos através da tecnologia da fermentação, principal competência da empresa. Atualmente, é uma das vinte maiores empresas de saúde animal do mundo, com três Centros de Biociências, treze fábricas e quarenta e cinco escritórios. Os Centros de Biociências da Alltech criam um ambiente único em que cientistas podem identificar os desafios enfrentados pela indústria de alimentação animal e, então, trabalham em cooperação com outros cientistas para encontrar soluções para esses problemas. Os Centros de Biociências estabelecem conexões com universidades em todo o mundo, em três centros: nos Estados Unidos, na Irlanda e na China.

Cada Centro está ligado a uma ou mais instituições de agronegócios de ponta. Isso permite à Alltech compartilhar idéias e recursos. Uma das bases da filosofia de negócio é o marketing através da educação, patrocinando várias palestras, simpósios e reuniões. O Simpósio Anual da Indústria de Alimentação Animal da Alltech é um dos eventos técnicos mais esperados do setor, atraindo mais de 1.100 profissionais de todo o mundo.

A Alltech também organiza cinco ciclos de Rondas educativas a cada ano na Europa, Oriente Médio, África, América Latina e na Ásia, assim como o Circuito Universitário norte-americano. As Rondas buscam compartilhar informações técnicas e específicas do setor com indivíduos que não têm possibilidades de participar de encontros técnicos fora de sua região.

Presente em mais de 70 países, a Alltech está no Brasil há uma década. É líder mundial em aditivos para nutrição e saúde animal para aves, suínos, bovinos (corte e leite) e pequenos animais. A empresa tem uma extensa linha de minerais orgânicos, enzimas e leveduras produzidas de forma ecologicamente correta. Os produtos são naturais, não deixam resíduos químicos nos alimentos finais (carne, ovos e leite), ajudam os consumidores a se proteger contra doenças, como câncer,

¹ Marca Registrada: cepa 1026 (Bio-MOS[®]) Alltech, Rua Said Mohamed El Khatid, 280, Curitiba – PR.

aumentam a produtividade dos animais enquadrando-se nos conceitos de segurança alimentar e respeito ao meio ambiente.

Com base nessas informações e observando os animais pacientes com afecções gastrointestinais, evidencia-se a grande perda de estado nutricional e dificuldade de manutenção da dieta durante e após a ocorrência da doença. Considerando que o tratamento de doenças gastrointestinais é longo, exige muito cuidado com os animais internados e uso de diversos medicamentos, o que gera um custo muito alto e, além disso, considerando que o animal pode vir a óbito, o que determina ao proprietário prejuízo financeiro, propõe-se estudar a função do MOS na dieta desses pacientes.

Objetivou-se avaliar os efeitos do MOS em animais acometidos de gastroenterite de origem viral, parasitária ou bacteriana, com ou sem a presença de sangue. E, ainda, de forma específica, analisar a presença e as alterações bacterianas nas fezes, por coprocultura, para microorganismos enteropatogênicos e analisar as alterações no número de leucócitos, neutrófilos e linfócitos através de hemogramas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A definição isolada de levedura refere-se ao produto que foi separado do meio de cultura de leveduras: é o produto composto por leveduras fermentadas, isto é, células viáveis, com seu meio de crescimento. Dentre as culturas de leveduras destaca-se, particularmente, a de *Saccharomyces cerevisiae*.

As destilarias de álcool e as fábricas de cerveja são as indústrias que fornecem leveduras para alimentação animal. Nas usinas de álcool, durante a fase de fermentação alcoólica do melaço, são utilizadas leveduras que, após a fermentação, são recuperadas por centrifugação e denominadas leveduras de recuperação. Após a ressecagem e moagem, essas leveduras podem ser destinadas ao arraçãoamento de animais.

Os mananoligossacarídeos fosforilados (MOS) são extraídos de cepas específicas das leveduras *Sacharomyces cerevisiae*. Esses hidratos de carbono complexos encontram-se em maior número nas paredes celulares das leveduras, constituídas em mais de 30% por mananoligossacarídeos. A parede da célula da levedura é uma matriz complexa de proteína e de hidrato de carbono complexo que atua como uma barreira de proteção ao redor da célula e como interface entre o conteúdo celular e o ambiente externo. Assim, essa matriz complexa evoluiu com características especiais, de forma a permitir a sua comunicação com o ambiente externo. Os oligossacarídeos complexos, tais como os mananos, desempenham um

papel fundamental nessas interações, descobertas após uma boa análise sobre o papel dos açúcares na comunicação intracelular (SHARON, 1993).

As pesquisas têm se concentrado no modo de ação do MOS, descrito por Spring *et al.* (2000). O modo de ação, segundo os autores, baseia-se na capacidade de ligação do MOS a micróbios Gram-negativos específicos através da sua interação com lactinas sensíveis à manose presente na superfície dessas bactérias. A aplicação comercial desse fenômeno foi demonstrada pela capacidade do MOS de reduzir a contagem de *Salmonella* em frangos inoculados com uma cultura desses microrganismos (SPRING *et al.*, 2000).

Os prebióticos (MOS) modulam a motilidade gastrointestinal, reduzem a diarreia (absorção de água aumentada), promovem o desenvolvimento da mucosa do íleo e do cólon, proporcionam energia à mucosa intestinal, diminuem o pH do cólon favorecendo o crescimento de uma microbiota benéfica, aumentam a proteção contra infecções (função da barreira, imunidade) entre outros efeitos (BORGES & NUNES, 2003).

Pesquisas com MOS têm sido conduzidas há mais de cinco anos e, nesse curto período de tempo, obtiveram-se avanços com relação à elucidação de seu modo de ação frente aos antibióticos promotores de crescimento (APCs). Esse fator é, em parte, responsável pelo grau de indecisão e confusão existente quanto à impossibilidade de reintroduzir o uso de APCs na ração.

Mais de 100 ensaios de pesquisa publicados demonstraram os benefícios do MOS para a saúde e performance de suínos, aves e vitelos. O MOS foi também testado com sucesso em outras espécies, tais como coelhos, avestruzes, emas e peixes. O índice de melhora, tanto com o MOS como com os APCs, dependeu de diversos fatores que incluíam o estado sanitário dos animais / aves, o grau de contaminação do meio pela doença, o nível de estresse e a idade do animal (CONNOLLY, 2001).

A elucidação dos efeitos do MOS prossegue, especialmente, em relação aos seus efeitos sobre o sistema imunitário. Diversos pesquisadores descreveram

observações interessantes em suínos, vitelos e aves, sendo que outros trabalhos conduzidos nessa área poderão proporcionar informações relevantes sobre Bio-MOS nos próximos anos, especialmente com relação à enterite (CONNOLLY, 2001).

Os oligossacarídeos não digestíveis, tais como frutoligosacarídeos (FOS) e os mananoligosacarídeos (MOS), podem afetar a saúde gastrointestinal através do aumento das populações bacterianas benéficas e/ou através de estímulo direto do sistema imunológico. As bactérias competem por nutrientes e sítios de ligação com as bactérias menos desejáveis e produzem compostos antimicrobianos contra cepas de bactérias patogênicas. As alterações nas populações microbianas ou nos ácidos graxos de cadeia curta, que são produzidos como um substrato da fermentação dos oligossacarídeos, podem influenciar o sistema imunológico através da inibição de bactérias patogênicas, restaurando a flora intestinal normal e atuando como imunomoduladores (MEYER *et al.*, 2000).

O MOS também protege o animal através da neutralização de micotoxinas (DEVEGOWDA *et al.*, 1994), aumentando as concentrações sistêmicas de IgG (SAVAGE *et al.*, 1996) e a atividade de neutrófilo (O'CARRA, 1998). A suplementação de frangos de corte alimentados com ração contaminada por aflatoxina com cultura da levedura *S. cerevisiae* atenuou os efeitos da toxina (DEVEGOWDA *et al.*, 1994). O uso do MOS também resultou em elevação das concentrações de IgG em perus. Segundo os autores, observou-se que esses animais suplementados tiveram uma resposta imune sistêmica estimulada, expressa por um aumento da concentração de IgG, quando comparados aos grupo-controle, aumentando a atividade de neutrófilos (SAVAGE, *et al.* 1996).

Segundo Sawnson *et al.* (2002), apud GRIESHOP (2003), que realizaram experimentos, suplementando cães com 2g de MOS, 2g de FOS ou 2g de MOS + 2g de FOS por dia durante 14 dias, cães suplementados com 2 g de FOS + 2 g de MOS por dia apresentaram aumento expressivo nas concentrações de IgA no íleo em relação a cães-controle, indicando também estímulo da imunidade local. Os cães suplementados com MOS apresentaram uma menor concentração de bactérias aeróbicas e uma tendência de elevação das concentrações de lactobacilos nas fezes (GRIESHOP, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram utilizados 16 cães, com idade entre 2 a 6 meses, das raças Rottweiler, Pit Bull, Poodle e SRD, sendo 8 portadores de gastroenterite e 8 cães clinicamente saudáveis. Esses animais eram pacientes da Clínica Veterinária Saúde Animal, localizada na Av. Das Bandeiras nº 1296, no Bairro Marcos Roberto, na cidade de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul.

Os animais foram incluídos na amostra à medida que seus proprietários os encaminhavam para consulta na clínica veterinária, onde cada um permaneceu internado durante 10 dias em canil individual, período este suficiente para constatar a cura dos cães do experimento. Para fins de contagem do período total do experimento, o primeiro cão foi internado no dia 23-01-04 e o último no dia 09-06-04.

3.2 Procedimentos:

Os animais doentes, que permaneceram na clínica durante o experimento, foram internados em salas para receberem soroterapia e medicação para gastroenterite. Os animais saudáveis, por sua vez, foram mantidos em canis destinados à pensão, onde permaneceram, recebendo alimentação, e eram soltos num espaço maior, duas vezes ao dia, durante 30 minutos, para correrem e se exercitarem.

Como era desconhecida a ordem de entrada dos animais, já que eram clientes, considerou-se a amostra aleatória.

Os animais foram selecionados de acordo com a idade, apresentava-se com gastroenterite, tendo diarreia com ou sem sangue, foi considerado como motivo de exclusão a presença de vômito, já que o MOS era oferecido por via oral.

Todos os animais foram submetidos à coleta de sangue para hemograma e fezes no meio Cary Blair para coprocultura no 1º, 5º e 10º dias, considerando-se 1ª, 2ª e 3ª coletas, respectivamente. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório Pardini - Belo Horizonte - Minas Gerais.

Os animais com gastroenterite eram examinados para avaliação do grau de desidratação, conforme parâmetros abaixo; segundo Saunders (2003).

Tabela 1: Grau de desidratação e suas características.

Grau de desidratação	Características
5%	Mais branda, membrana normal e tempo de preenchimento normal
6% a 8%	Prega retorna lentamente, membranas mais pegajosas e secas. Prolongamento ligeiro do tempo de preenchimento capilar.
10% a 12%	Pulsos filiformes fracos, mucosas pálidas e ressecadas com sinais de choque.

FONTE: SAUNDERS (2003).

Assim como nos parâmetros hematológicos considerados como intervalo de normalidade foram segundo o mesmo autor, conforme tabela abaixo:

Tabela 2: Variações de referência hematológicas para cães.

Parâmetros	Cães
Neutrófilos segmentados (/μL)	3.000 – 11.500
Linfócitos (/μL)	1.000 – 4.800
Leucócito (/μL)	6.000 – 17.000

FONTE: SAUNDERS (2003).

Através do cálculo da taxa de desidratação, iniciava-se o tratamento com fluidoterapia até a hidratação e continuava-se o tratamento para manutenção, com Ringer com Lactato e a Solução Fisiológica a 0,9%.

O tratamento com antibiótico constituiu-se em: Enrofloxacin¹ endovenoso, 3 a 4 dias no máximo, diluído em partes iguais por um período de dois minutos. O antiemético utilizado foi a cloridrato de Metoclopramida² volume total, administrado nas 24 horas. Os vermífugos foram Praziquantel e Pamoato de Pirantel³, administrados por via oral quando o animal estava sem vômito. Ainda foram utilizadas vitaminas, complexo B₁ e B₁₂, diluídas no soro.

Quando o animal iniciava a alimentação, utilizava-se uma dieta de fácil digestão, pois intestinos levam de uma a duas semanas para se regenerarem. No grupo que recebeu MOS e o animal não estava comendo, foram diluídos dois gramas do medicamento em 2 ml de água, administrados com uma seringa por via oral.

O efeito dos tratamentos foi avaliado sob três variáveis obtidas através do hemograma (número de leucócitos totais, de neutrófilos segmentados e de linfócitos) e uma variável obtida através de coprocultura (presença ou ausência de *E. coli*).

Os dados foram colhidos no primeiro, quinto e décimo dia de internação de cada animal, sendo avaliadas, também, como resposta aos tratamentos, as alterações ocorridas no número de leucócitos totais, de neutrófilos segmentados e de linfócitos entre o 1º e o 5º dia, o 5º e o 10º dia e o 1º e o 10º dia.

Na avaliação clínica considerou-se ainda os exames clínicos e observações diárias dos animais, anotadas em prontuário de cada paciente assim como a interpretação dos dados expressos nos exames complementares realizados.

1- Dose: 5mg/Kg Flotril[®] 2,5 %, Schering-Plough

2- Dose: 1-2mg/kg Aristomida[®], Ariston

3- Dose: 10 mg/kg Ehdal Plus[®], Schering-Plough

3.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo que o primeiro cão, que se enquadrava nesses parâmetros com gastroenterite, foi selecionado para o grupo 1 e atribuiu-se a ele o tratamento com MOS ($G_1 A_1$); ao segundo cão selecionado foi atribuído o tratamento sem MOS ($G_1 B_1$); e assim sucessivamente. Da mesma forma, ao primeiro paciente sadio (grupo 2), com temperatura e fezes normais, atribuiu-se o MOS ($G_2 A_2$); e ao segundo, um tratamento sem MOS ($G_2 B_2$); e assim sucessivamente.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, com oito animais cada grupo:

G_1 – animais doentes (com gastroenterite).

G_2 – animais saudáveis (que, no exame clínico, estavam com temperatura, alimentações, mucosas e fezes normais).

Os animais de cada grupo foram separados em dois subgrupos, A e B, com quatro animais cada um:

- Subgrupo A_1 – animais com gastroenterite, medicados para a doença, e recebendo dois gramas de MOS por dia.
- Subgrupo B_1 – animais com gastroenterite, medicados para a doença, e não recebendo MOS
- Subgrupo A_2 – animais saudáveis clinicamente, recebendo dois gramas de MOS na alimentação.
- Subgrupo B_2 – animais saudáveis clinicamente, não recebendo MOS.

Tabela 3: Distribuição dos animais, conforme os grupos com gastroenterite ou saudáveis: $G_1 A_1$ (gastroenterite e MOS); $G_1 B_1$ (gastroenterite sem MOS); $G_2 A_2$ (saudáveis com MOS); e $G_2 B_2$ (saudáveis sem MOS).

Grupo	Sub-grupo	Tratamento
G_1 (8 animais doentes)	A_1 (4 animais)	MOS + Trat. P/ doença
	B_1 (4 animais)	Sem MOS
G_2 (8 animais saudáveis)	A_2 (4 animais)	Com MOS
	B_2 (4 animais)	Sem MOS

A análise estatística foi desenvolvida para se identificar a significância do efeito do tratamento (MOS) dentro de cada grupo (com gastroenterite e sadio) separadamente e entre os indivíduos desses grupos.

Como as amostras de cada um dos dois tratamentos dentro de cada grupo são independentes e as três variáveis do hemograma (leucócitos totais, neutrófilos segmentados e linfócitos) podem ser avaliadas na escala de mensuração ordinal, empregou-se o teste U de Mann-Whitney na comparação do MOS com e sem MOS. A estatística não paramétrica foi recomendada nesse caso porque as variáveis possuem coeficientes de variação muito elevados (variando nos tratamentos de CV=14% a CV=60%), o que faz a média de cada tratamento ser pouco representativa.

Para testar o efeito do tratamento com MOS sobre a frequência de cães que deixaram de ser positivos na coprocultura para *E. coli* no 10º dia do experimento, utilizou-se o teste Exato de Fisher. Em todas as análises os valores de *p-value* superiores a 0,05 foram considerados estatisticamente não significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise de Leucócitos

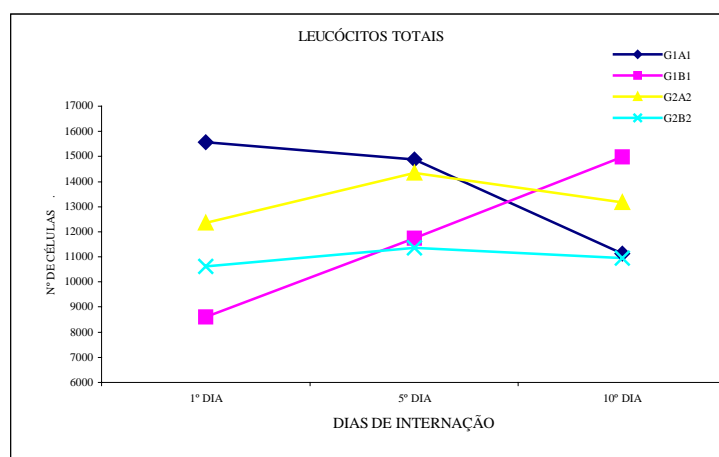


FIGURA 1 – Número de leucócitos totais obtido no hemograma do 1º, 5º e 10º dia de internação de cães dos grupos G_1A_1 (gastroenterite e MOS), G_1B_1 (gastroenterite sem MOS), G_2A_2 (saudáveis e MOS) e G_2B_2 (saudáveis sem MOS).

Observou-se que houve uma diferença ($p < 0,05$) no número de leucócitos entre o 1º e o 10º dia de internação no grupo de animais com gastroenterite, isto é, enquanto no grupo de animais com gastroenterite tratados com MOS (G_1A_1) o número de leucócitos diminuiu, no grupo de animais com gastroenterite sem MOS (G_1B_1) o número de leucócitos aumentou do 1º ao 10º dia de internação. Nos demais grupos, as mudanças no número de leucócitos não foram diferentes ($p > 0,05$) entre os animais tratados com MOS e sem MOS.

Pôde-se observar na figura 1, os resultados das diferenças no número de leucócitos do primeiro ao décimo dia de internação dos animais, sendo que o número de leucócitos diminuiu, mas permaneceu dentro da faixa de normalidade dos parâmetros fisiológicos. Conforme LOPES (1996), esse número expressa a contagem global de leucócitos, sendo que, na interpretação do leucograma, deve ser utilizado o resultado absoluto da contagem leucocitária, pois os resultados relativos não expressam a realidade fisiopatológica.

Numa infecção bacteriana, devido à inflamação, o número de leucócitos tende a aumentar; já numa infecção viral, drogas e químicos tóxicos, toxoplasmose e *Ehrlichia* induzem à diminuição. Os resultados deste trabalho sugerem que a infecção está sendo controlada no grupo de animais com gastroenterite que usou MOS. Nos que não receberam MOS, o número de leucócitos continuou aumentando, indicando a não resolução de infecção.

4.2 Análise de Neutrófilos

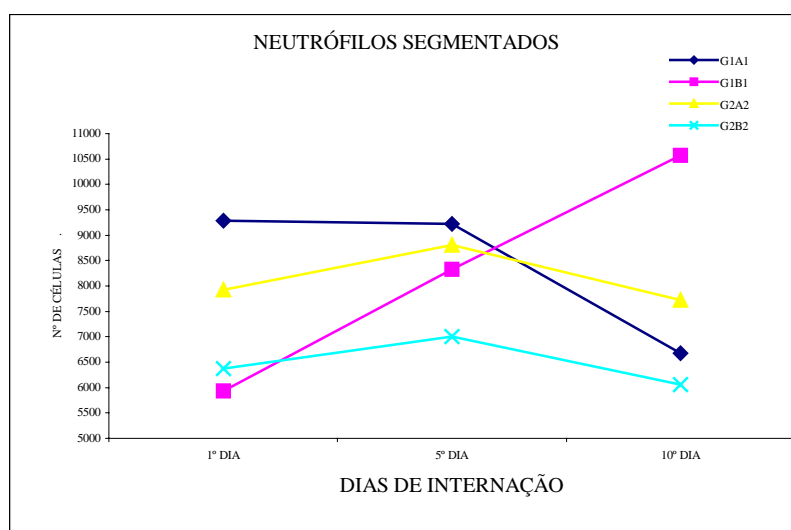


FIGURA 2 – Número de neutrófilos segmentados obtido no hemograma do 1º, do 5º e do 10º dia de internação de cães dos grupos G₁A₁ (gastroenterite e MOS), G₁B₁ (gastroenterite sem MOS), G₂A₂ (saudáveis e MOS) e G₂B₂ (saudáveis sem MOS).

Não houve diferença estatística entre os grupos e entre as amostras. Na análise dos neutrófilos do grupo G₁, porém, dois animais apresentaram uma queda muito grande no número de neutrófilos.

Animal 1 – A₁ – da 1^a.coleta (8329) para a 3^a. (4095).

Animal 2 – A₁ – da 1^a. coleta (12998) para a 3^a.coleta (4899).

Na análise dos neutrófilos, não houve uma diferença estatística entre os grupos e entre as amostras. Entretanto, no grupo que recebeu MOS, dois animais apresentaram uma queda muito grande no número de neutrófilos.

O primeiro animal permaneceu dez dias recebendo somente tratamento para gastroenterite e MOS, mas detectou-se, nos exames, que era positivo para haemobartonelose e babesiose. Segundo RASKIN (2003), animais com haemobartonelose apresentam uma anemia severa e aguda observando-se depressão, icterícia súbita e esplenomegalia. A babesiose na fase aguda inclui esplenomegalia, icterícia, anemia, trombocitopenia, hemoglobinúria e febre. Esse animal, sendo da raça Rottweiler, uma raça sensível às doenças gastrointestinais em geral, com idade de quatro meses e tendo ficado sem tratamento específico para essa doença num período de dez dias, não apresentou, apesar do acentuado grau de anemia, piora no quadro clínico, já que recebeu somente MOS antes da prescrição do tratamento específico. É importante ressaltar que, durante o período em que foi tratado para combater essas doenças, continuou recebendo o MOS.

O segundo animal, em exames posteriores foi considerado positivo para Leishmaniose justificando a queda no número de neutrófilos. Leishmaniose visceral (L.V.) ou calazar canino apresenta um amplo espectro de características clínicas que variam de aparente estado sadio a um estado severo final. De acordo com essas características, pode-se agrupar os animais com L.V. em três categorias: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos.

Os cães assintomáticos podem viver anos sem apresentar sinais da infecção, mas, uma vez iniciado o processo, a doença evolui inevitavelmente para a morte. Representam 57% dos animais soropositivos de uma área endêmica. Possuem níveis baixos de anticorpos apesar de serem clinicamente sadios; ao exame parasitológico de pele, o índice de parasitismo é em torno de 62,1%.

Os oligossintomáticos apresentam anticorpos que variam, podendo apresentar ou não perda de peso e com sinais de comprometimento dérmico,

mostrando não raramente opacidade de pêlo, alopecia e espessamento na extremidade das orelhas (OSHIRO, 2002).

Neste estudo, esse animal apresentou, na primeira coleta, 19.400 leucócitos, decaindo para 7.100 na terceira coleta. Apresentou, como sintomas, emagrecimento e gastroenterite o que sugere que a doença diagnosticada posteriormente ao experimento tenha provocado essa alteração leucocitária, possivelmente sendo um paciente oligossintomático.

4.3 Análise de Linfócitos

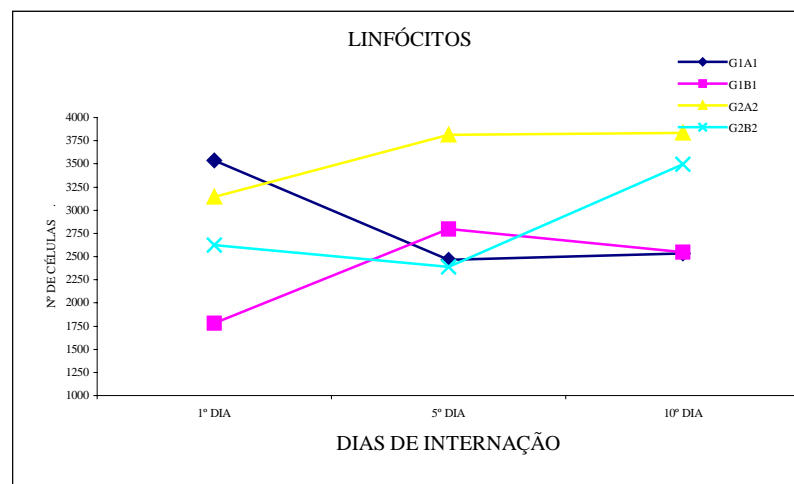


FIGURA 3 – Número de linfócitos obtidos no hemograma do 1º, do 5º e do 10º dia de internação de cães dos grupos G_1A_1 (gastroenterite e MOS), G_1B_1 (gastroenterite sem MOS), G_2A_2 (saudáveis e MOS) e G_2B_2 (saudáveis sem MOS).

Nos linfócitos também não se observou diferença estatística ($p > 0,05$), mas esses dados permaneceram dentro dos parâmetros fisiológicos, o que clinicamente pode ser considerado como melhora do quadro.

SWANSON *et al.* (2002) avaliaram o uso de frutooligossacarídeo e manooligossacarídeo em cães Large Bowel. Na análise total de células brancas, foi usada a porcentagem de neutrófilos e linfócitos, obtendo como resultado, nos cães suplementados com MOS, aumento ($p < 0,05$) da série linfocitária maior que o grupo-controle. Concluiu-se que o total de células brancas e a concentração de neutrófilo não foram diferentes entre os tratamentos, com a suplementação com MOS, apenas

mostrando um aumento de IgA ($p= 0,135$) e linfócitos ($p< 0,05$) concentração (% das células brancas). Houve também um aumento de linfócitos e uma diminuição de neutrófilos em comparação com o que recebeu placebo.

Contrariamente ao resultado obtido por Sawnson *et al.* (2002) no presente estudo, não houve diferenças significativas em níveis de neutrófilos e linfócitos. Os dados analisados foram os valores absolutos da diferença entre o primeiro e o décimo dia de coleta.

4.4 Resultado da Coprocultura

Após as três coletas (1° dia, 5° dia e 10° dia), em todos os 16 animais, foram isolados somente microorganismos enteropatogênicos, sendo positivos para:

1- *Pseudomonas aeruginosa*

2- *Proteus mirabilis*

3- *Providencia alcalifaciens*

4- *Enterobacter cloacae*

5- *Morganella motganii*

6- *Citrobacter freundii*

7- *Escherichia coli*

Pseudomonas aeruginosa – No grupo G_1 , essa bactéria foi isolada no subgrupo A_1 , na 1ª e na 2ª amostra, e na 3ª amostra, desapareceu. Não se observou a sua presença no subgrupo B_1 para uma possível comparação estatística.

Proteus mirabilis – isolada no G_1 , na terceira amostra do subgrupo A_1 . Foi isolada em dois animais do subgrupo B_1 na 1ª amostra, e não foi isolada na 3ª amostra dos dois animais. Esses animais estavam sendo tratados com antibiótico, o que sugere que o medicamento foi efetivo, mas ainda não observado o mesmo resultado nos subgrupos.

Providencia alcalifaciens – isolada no G₁, na 1^a amostra do animal 2; e não foi isolado na 3^a amostra. No subgrupo B₁, não foi isolada em nenhum dos animais. No grupo G₂, foram isoladas em dois animais no subgrupo A₂ na 1^a, 2^a e 3^a amostra; o mesmo resultado ocorreu no subgrupo B₂ em um animal.

Enterobacter cloacae – isolada no G₁ e subgrupo A₁ em um animal na 1^a amostra, não sendo isolada na 2^a nem na 3^a amostra. Não foi isolada em nenhum outro animal.

Morganella motganii – isolada em um animal no G₁ e subgrupo B₁, somente na 1^a amostra; e no G₂, em um animal no subgrupo B₂, só na 1^a amostra.

Citrobacter freundii – isolada em um animal no G₁, no subgrupo B₁, somente na 3^a amostra.

Escherichia coli – isolada em todos os animais do G₁, sendo que no subgrupo A₁, em todos os animais, não foi isolada na 3^a amostra.

No subgrupo B₁, em três animais, foi isolada na 3^a amostra, apenas em um animal não foi isolada na 3^a coleta.

Nos dois subgrupos do G₁, os animais que estavam doentes, receberam o mesmo tratamento de antibiótico. Comparou-se a efetividade do MOS no subgrupo A₁, que recebeu o produto, sendo positivo para todos os animais; na 3^a amostra não foi isolada a bactéria patogênica em nenhum animal.

TABELA 4: Presença (+) ou ausência (-) de *E. coli* na coprocultura no 10º dia de internação nos 14 animais que apresentaram a bactéria até o 5º dia de internação, de acordo com os grupos e os dois que não foram positivos representado pelo *.

Cães	Tratamento			
	G ₁ A ₁	G ₁ B ₁	G ₂ A ₂	G ₂ B ₂
1	-	+	-	-
2	-	+	+	+
3	-	+	*	+
4	-	-	*	+

No grupo G₂, subgrupo A₂ (com o MOS), isolou-se a bactéria em apenas dois animais, ou seja, não apareceram nos outros dois desse grupo. Nesses animais, na 3ª amostra, o exame de um animal permaneceu positivo; e o outro foi negativo. No subgrupo B₂ (sem o MOS), o resultado foi positivo em todos os quatro animais das amostras e em apenas um animal foi negativo na 3ª amostra.

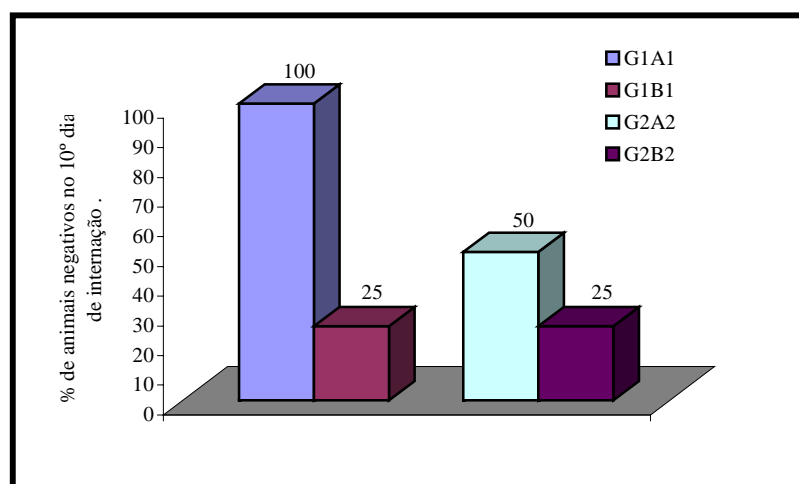


FIGURA 4 – Percentual de cães positivos para *E. coli* na coprocultura no 1º ou no 5º dia de internação e que não apresentaram o microorganismo no 10º dia de internação dos grupos G₁A₁ (gastroenterite e MOS), G₁B₁ (gastroenterite sem MOS), G₂A₂ (saudáveis e MOS) e G₂B₂ (saudáveis sem MOS).

Na análise estatística não se detectou diferença significativa ($p > 0,05$) na frequência de animais que se tornaram negativos para *E. coli* entre os tratamentos com e sem MOS, tanto no grupo com gastroenterite, como no grupo de cães saudáveis,

entretanto essa bactéria apareceu em todos animais do G₁ e desapareceu em todos os animais que receberam MOS.

O comportamento das outras bactérias não permitiu uma comparação devido à irregularidade de frequência do seu aparecimento nos resultados das coproculturas.

GIBSON & ROBERFROID (1995) introduziram o conceito de prebiótico que altera a população microbiana e isso, conseqüentemente, aumenta a saúde do hospedeiro. Seletivamente estimula o crescimento e/ou a atividade de uma bactéria ou o número limitado de bactérias no colon.

SPRING *et al.* (2000) usaram um modelo em pintos de corte para demonstrar que o MOS poderia reduzir significativamente a colonização por *Salmonella* e *E.coli*. OYOFO (1989) descreve que MOS diminui as bactérias patogênicas, pois oferece receptores ricos em monose que se ligam as bactérias.

Na Tabela 2, pode-se observar que, no grupo 1, os animais doentes eram inicialmente positivos na coprocultura para *E. coli* e, no grupo que recebeu MOS, todos ficaram negativos. Isso não ocorreu no grupo que não recebeu MOS, sendo que apenas um animal ficou negativo e os outros continuaram positivos para essa bactéria patogênica, demonstrando os efeitos benéficos do MOS na redução da concentração desses patógenos.

Segundo Newman (2004), percebeu-se que a glicolisilação dos componentes pode definir sua função ou atuar para estabilizá-los. A glicômica é definida como a caracterização dos açúcares que compõem a célula e de sua estrutura. Afirmou também que há um imenso potencial de aplicação da glicômica para melhorar a defesa contra patógenos em humanos e animais: açúcares específicos podem ser utilizados para fixar vitaminas e aminoácidos e fornecê-los exatamente onde queremos. Estes também podem remover fatores antinutricionais dos alimentos e aumentar a imunidade, como se pode supor neste estudo, em que ocorreu, com o uso do MOS, o desaparecimento de *E. coli* nas amostras coletadas.

Em SPRING (2004), do Swiss college of Agriculture, em Zollikofen, Suíça; está destacado:

Bio-MOS[®] é um aditivo nutricional que deveria ser colocado no alimento de pets que apresentam problema de fermentação intestinal, por exemplo, cães jovens, cães velhos e fêmeas grávidas ou em lactação. Cães que praticam esportes também apresentam uma microflora intestinal menos estável e se beneficiam enormemente com a inclusão de Bio- MOS[®] na dieta.

Além disso, muitos catabólicos protéicos que resultam em maior odor fecal, podem contribuir para a carcinogênese do cólon e exacerbar doenças intestinais (RAMAKRISHMA *et al.*, 1991).

Sugere-se desta forma novos ensaios, no sentido de verificar a real eficiência, bem como mecanismo de ação sobre os diversos microorganismos enteropatogênico, mediante infecção natural e ou produzida.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados em níveis hematológicos e coprológicos expostos neste trabalho, pode-se concluir que houve diminuição de bactérias enteropatogênicas, principalmente a *E. coli*, quando foi usado MOS no grupo com gastroenterite; nos animais doentes que receberam MOS houve uma diferença ($p < 0,05$) de leucócitos causada pelo controle das enterobactérias patogênicas pela ação do MOS, diminuindo o seu número, e, conseqüentemente, diminuindo o número de leucócitos, já que no grupo-controle não ocorreu esse resultado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considera-se finalmente que, apesar de não apresentarem significância estatística nos resultados dos neutrófilos e linfócitos, os animais que receberam MOS e estavam fora dos parâmetros fisiológicos, na terceira coleta, tiveram os resultados normalizados, o que podemos considerar como melhora do quadro.

Em pesquisas com ratos infectados por antraz que recebiam glucanos oriundos de leveduras, ficou comprovado que o período de sobrevivência desses animais dobrou em relação aos que não receberam esse tratamento. Com a evolução das pesquisas, esta seria uma opção de defesa contra um ataque de bioterrorismo por antraz. Já se pode afirmar que os monoligossacarídeos estão sendo usados para melhorar a saúde e aumentar a produtividade dos animais. Isso ocorre porque os patógenos têm afeição por açúcares e, em futuras pesquisas, outros açúcares poderão também ser utilizados para uma melhor qualidade de vida dos animais e, conseqüentemente, dos seres humanos.

No simpósio Nacional da Alltech, em Curitiba, recentemente, falou-se muito de biotecnologia Nutricional na Indústria de Alimentação Animal. Na ocasião, Dr. Lyons⁴ afirmou que estamos na guerra pelo talento, em que pessoas fazem a diferença, e são essas pessoas que irão auxiliar, num futuro muito próximo, no combate às patologias que acometem os pacientes. Para isso, é preciso continuar pesquisando e encontrando soluções, reimaginando a indústria de alimentação animal, como tem feito a Alltech.

4- Dr. Pearse Lyons, Presidente da Alltech Inc., Nicholasville, Ky, EUA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, F.M.O., NUMES, I.J.. Dietas Específicas para Pacientes Especiais. Simpósio de Nutrição de Pets Alltech/Escola de Veterinária UFMG, 2003.

CHEW, J. Dennis; Bareman W. Shene. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. Seção 1- Manejo do Paciente, Capítulo 5 – Fluidoterapia para Cães e Gatos, p. 69-85, São Paulo, 2003.

CONNOLLY, A.. Reagindo ao desafio da retirada dos antibióticos promotores de crescimento das rações e a forma como os oligossacarídeos específicos assumiram a dianteira. Feed Compounder. 2001. p.25.

DEVEGOWDA, G., ARVID, B.I.R., RAJENDRA, K., MORTON, M.G., BUBURANTHNA, A., SUDARSHAN, C. A Biological approach to counteact aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae* cultures added to feed. In: LYONS, T.P. & JAQUES, K.A. (eds.). Biotechnology in the feed industry: Proceedings of Alltech's 10th Anual Symposuim Nottingham University Press, Nottingham, U.K. 1994. p. 235-245.

GIBSON, G.R., BEATTY, E.R. WANG, X., ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, 125: p.1401-1412. 1995.

GRIESHOP, M.C. Diet may affect nutrition, immune system of pets. **Feedstuffs**. 75: (26). 2003.

LOPES, S. T. Dos Anjos; Cunha, C. M. S.; Biondo, A. W.; Fan, L. C.; **Patologia Clínica Veterinária**, Universidade Federal de Santa Maria, p.37, 1996.

MEYER, P.D., TUNGLAND, B.C., CAAUSEY, J.L., SALVIN, J.L. The immune effects of inulin in vitro and in vivo. **Agro. Food Industry Hi-Tech**. 11: p.18-20. 2000.

NEWMAN K., KOCHER A. 2004. Glicômica: carboidratos a serviço da saúde humana e animal. In: Anais do Simpósio Brasileiro Alltech, Biotecnologia Nutricional na Indústria de Alimentos Animal. 2004. p.28-33.

O'CARRA, R. Boosting immune response in dogs: A role for dietary mannan sugars. In: LYONS, T.P. & JAQUES, K.A. (eds.). *Biotechnology in the Feed Industry. Proceeding of Alltech's 14 th Annual Symposium*. Nottingham University Press, Nottingham, U. K. 1998. p. 563-572.

OSHIRO, E.T., DORVAL, M.E.M.C. Cartinha sobre Leishmaniose Visceral Canina, Campo Grande – MS. 2002.

OYOFO, B.A., DROLESKEY, R.E., NORMAN, J.O., MOLLENHAUER, H.H., ZIPRIN, R.L., CORRIER, D.E., DELOACH, J.R. Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. **Poult. Sci.** 68: p.1351-1356. 1989.

OYOFO, B.A., DeLoach, J.R., CORRIER, D.E., NORMAN, J.O., ZIPRIN, R.L., MOLLENHAUER, H.H. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. **Poult. Sci.** 68: p.1357-1360. 1989.

RAMAKRISHNA, B.S., ROBERTS-THOMAS, I.C., PANNALL, P.R., ROEDIGER, W.E.W. Impaired sulphation of phenol by the colonic mucosa in quiescent and active colitis. **Gut**. 32: p.46-49. 1991.

RASKIN E. Rose. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais; Seção 3 Hematologia/Oncologia, Capítulo 20 p.171-191, São Paulo, 2003.**

SAVAGE, T.F., COTTER, P.F., ZAKRZEWSKA, E.I. The effect of feeding a mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of Wrolstad MW male turkey. **Poult. Sci.** 75: (Suppl.1): 143 (abstr). 1996.

SHARON, N., Lis, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Amer.** 268: (1) p.82-89. 1993.

SPRING, P., WENK, C. DAWSON, K.A., NEWMAN K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poult. Sci.** 79: p.205-211. 2000.

SWANSON, K.S., GRIESHOP, C.M., FLICKINGER, E.A., BAUER, L.L., CHOW, J., WOLF, B.W., GARLEB, K.A., FAHEY JR, G.C. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial population, total tract nutrient digestibility and fecal protein catabolite concentration in healthy adult dogs. **J. Nutr.** 132: p.3721-3731. 2002a.

SWANSON, K.S., GRIESHOP, C.M., FLICKINGER, E.A., BAUER, L.L., CHOW, J., WOLF, B.W., GARLEB, K.A., FAHEY JR, G.C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and tract nutrient digestibilities microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **J. Nutr.** 132: p.980-989. 2002b.

SWANSON, K.S., GRIESHOP, C.M., FLICKINGER, E.A., BAUER, L.L., CHOW, J., WOLF, B.W., GARLEB, K.A., FAHEY JR, G.C. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on function and fecal microbial population in adult dogs. **Arch. Anim. Nutr.** 56: p.309-318. 2002c.