



Universidade de Sorocaba

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
PIBIC/PROBIC/PROVIC

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA ADIÇÃO DE PREBIOTICO NA
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE CADELAS NO POS-PARTO
(EVALUATION OF PREBIOTIC EFFICACY IN IMMUNE RESPONSE
MODULATION BITCHES POSTPARTUM)**

Bolsista: Nathalia de Oliveira
Orientador: Ana Carolina Porto
Período relatado: agosto/2016 a julho/2017
Programa: [PROVIC]
Protocolo PROAC: [076/2016]

Relatório científico FINAL
apresentado à presidência dos
programas institucionais de bolsas de
Iniciação científica como parte dos
requisitos das atividades do bolsista

Sorocaba

10 de agosto de 2017



Universidade de Sorocaba

**Avaliação da eficácia da adição de prebiótico na modulação da
resposta imune de cadelas no pós-parto**

Relatório científico final entregue à presidência dos programas institucionais de bolsas de iniciação científica **PROVIC** como parte dos requisitos das atividades do bolsista.

(Nathalia de Oliveira)

Assinatura do (a) bolsista

(Ana Carolina Porto)

Assinatura do (a) orientador (a)

RESUMO

ANTECEDENTES: Deficiências na resposta imune são condições comuns no pós-parto de fêmeas de várias espécies, podendo predispor ao aparecimento de enfermidades infecciosas relacionadas a uma falha na resposta imune. O uso de aditivos prebióticos é cada vez mais comum por sua eficácia no incremento de resposta imune local e sistêmica. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia da adição de prebióticos na dieta de cadelas, na modulação da resposta imune no pós-parto. **MÉTODOS:** Se tratando de um estudo experimental com cães, 8 cadelas prenhes foram submetidas ou não à suplementação a partir do trigésimo dia de gestação. Foram realizadas avaliações hematológicas, citológicas e, para posterior análise de anticorpo específico, as fêmeas foram imunizadas com proteína de alto peso molecular no 45º dia de gestação. As coletas de sangue e citologia vaginal ocorriam até o quarto mês após o parto, contadas como D1(dia 1) até as primeiras 48h após ocorrido o parto, em seguida com intervalos de 7 dias (D8 e D15), aumentando progressivamente para 15 dias (D30, D45 e D60) e posteriormente 30 dias (D90 e D120), fazendo um total de 8 coletas por fêmea. **RESULTADOS FINAIS:** Notou-se aceitação do prebiótico pelas cadelas somente em forma de papinha (suplemento misturado com água). Nos hemogramas realizados, observou-se anemia discreta nas primeiras semanas após o parto, normalizando após 30 dias, e não houve alterações significativas na série branca, nas cadelas de ambos os grupos. Na citologia vaginal, houve variações quantitativas de leucócitos e bactérias entre as fêmeas, porém observou-se maior presença de bactéria no animais do grupo controle. Foi possível observar desenvolvimento de resposta imunológica pela produção de anticorpos frente à imunização com KHL nos dois grupos, porém com intensidade maior nos animais do grupo teste, sendo o D45 considerado o pico de maior concentração para ambos. Com esses resultados pode-se sugerir que a adição do prebiótico promove uma modulação positiva no sistema imune das cadelas no pós parto.

Palavras chave: Pós-parto de cadelas. Prebiótico. Resposta Imune.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivos gerais da pesquisa	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. DELINEAMENTO DE ESTUDO.....	7
4. MÉTODOS.....	7
4.1 Animais	7
4.2 Grupos experimentais	7
4.3 Suplementação	7
4.4 Imunização	8
4.5 Coletas de sangue	9
4.6 Coletas de amostras para citologia vaginal	10
4.7 Hemogramas	e
hematócritos.....	11
5. RESULTADOS	12
5.1 Suplementação	12
5.2 Análises hematológicas	13
5.3 Análises citológicas.....	14
5.4 Ensaio	imunológico
(ELISA).....	15
6. DISCUSSÃO.....	16
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
8. DETALHAMENTO DE ATIVIDADES CUMPRIDAS E NÃO CUMPRIDAS....	17
9. REFERÊNCIAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

Durante a gestação ocorrem importantes alterações no sistema imunológico materno para que este seja tolerante aos antígenos paternos (SMYTH; DEGLIESPOSTI, 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, 1988).

O puerpério é a fase imediatamente após o parto onde ocorre a involução uterina da cadela e a preparação do útero para uma nova gestação. Esse desenvolvimento pode ser dividido em duas fases: delivramento e puerpério (GRUNERT; BIRGEL, 1989) e leva cerca de 12 semanas para se completar. Após o parto, a diminuição 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 susceptibilidade 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. Tais fatores estão presentes com maior intensidade na fase estrogênica, já que o estrógeno promove vasodilatação, maior afluxo sanguíneo e assim maior presença de imunoglobulinas e maior contratilidade uterina. Já em fase progesterônica, como ocorre no diestro e na gestação, a resistência às infecções é muito reduzida pela diminuição da contratilidade uterina e da atividade leucocitária, pelo menor afluxo sanguíneo e pela imunossupressão durante a gestação (NASCIMENTO; SANTOS, 1997).

De acordo com estudos de Hansen (2013) com vacas leiteiras, alguns fatores de risco podem explicar variações individuais no desenvolvimento de doenças uterinas após o parto, como por exemplo, exposição a um desafio bacteriano superior a idoneidade do sistema imunológico, adaptações ocorridas para manter conceito durante a gestação podendo persistir e favorecer a presença de micro-organismos 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 uma 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).

O trato reprodutor das cadelas geralmente é acometido por diversas afecções após o parto, dentre elas a vaginite aguda e crônicas sendo frequentes infecções mistas (TEIXEIRA, 1993); endometrite subclínica; endometrite crônica podendo acumular pus com o fechamento da cérvix (OLSON,1984;FAYER-HOSKEN, 1994; COKCROFT,1995); complexo hiperplasia cística endometrial-piometrite; metrite aguda ou puerperal que ocorre após o parto devido a distocia, retenção de placenta e/ou manipulação obstétrica (ROSZEL, 1977; NELSON; FELDMAN, 1986); subinvolução dos locais placentários levando a quadros de piometrite (BURKE, 1977; AL-BASSAM,1982) e cistos de corpo lúteo e folículos luteinizados que tendem a aumentar a produção de progesterona levando a quadros de hiperplasia cística endometrial e piometrite (YOUNGQUIST, 1986).

O exame ginecológico completo nas cadelas é de extrema importância para o diagnóstico de patologias da reprodução, fazendo necessário a utilização de exames complementares para a conclusão correta da etiologia, como por exemplo a colpocitologia (GRANDI; BESERRA; COSTA, 2014) e hemograma. A colpocitologia permite a associação dos tipos celulares encontrados com achados clínicos, como o caso da presença de leucócitos não somente no diestro de cadelas sadias, mas também nas outras fases, como indicativo de infecções do trato reprodutivo (VICENTE; APPARICIO, 2015). Através do hemograma são obtidos valores quantitativos de leucócitos, o que pode auxiliar no diagnóstico de algumas doenças de caráter sistêmico (KERR, 2003).

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). 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 a humanos, mediante interações específicas com diferentes células imunocompetentes (GARCIA, 2008).

Os mananoligossacarídeos (MOS) são obtidos a partir da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), e algas marinhas calcárias (*Lithothamnium calcareum*) a qual consiste de uma estrutura complexa de manose fosforilada, glucose e proteína. Em estudos de Middelbos et al. (2007), observou-se redução significativa na concentração de *E. coli* em cães suplementados com parede de levedura e Swanson et al. (2002b), encontraram aumento de *Lactobacillus* no IG de cães adultos. De acordo com Gouveia et al. (2006) constatou-se a efetividade do MOS em cães com idade entre 2 e 6 meses com quadros de gastroenterite, havendo a eliminação da *Escherichia coli* patogênica em 85,71% dos animais, enquanto que, no grupo sem o MOS, apenas 25% não apresentaram o microrganismo. Neste estudo, o MOS foi efetivo no controle da *E. coli* patogênica, sendo indicado como tratamento adjuvante nas gastroenterites. Os MOS são capazes de induzir a ativação de macrófagos, saturando os receptores de manose das glicoproteínas da superfície celular, que se projetam da superfície da membrana celular dos macrófagos. Uma vez que três ou mais lugares tenham sido saturados, inicia-se uma reação em cadeia com a instalação de uma resposta imunológica adquirida (MACARI; MAIORKA, 2000). 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 (GOUVEIA et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais da pesquisa

Avaliar a eficácia da adição de prebiótico à base de MOS, na dieta de cadelas gestantes na modulação da resposta imune após o parto.

2.2 Objetivos específicos

Treinar o discente em práticas relacionadas à reprodução canina

Treinar o discente em práticas de patologia clínica, através da realização e interpretação de exames laboratoriais;

Avaliar a influência da suplementação com prebióticos nos parâmetros hematológicos de cadelas no pós parto;

Avaliar a influência da suplementação com prebióticos no perfil celular vaginal de cadelas no pós parto;

Avaliar a influência da suplementação com prebióticos na produção de anticorpos específicos por cadelas no pós parto.

3. DELINEAMENTO DE ESTUDO

Trata-se de estudo experimental com animais.

Os experimentos foram realizados 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.

4. MÉTODOS

4.1 Animais:

Foram utilizadas 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.

4.2 Grupos experimentais:

Os animais foram divididos em dois grupos: GT – grupo teste (com suplementação) e GC – grupo controle (sem suplementação). Todos os animais foram identificados pelos próprios nomes nos tubos das amostras de sangue, eppendorffs e nas lamínas de citologia de acordo com as datas de coletas.

4.3 Suplementação:

A suplementação 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 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 (Fig 1 e 2).



Fig. 1 Recipientes de vidro enumerados contendo o suplemento em pó



Fig. 2 Recipiente de vidro contendo 1,5g do suplemento em pó

4.4 Imunização:

Para avaliação da resposta imune humoral específica foi realizada a imunização com KHL (Keyhole limpet hemocyanin – KLH) das cadelas gestantes. A imunização ocorreu 30 e 23 dias antes da data prevista de parto pela via intramuscular, após avaliação ultrassonográfica dos fetos (Fig 3).



Fig. 3 - Ultrassonografia realizada em cadela prenhe com cerca de 35 dias de gestação

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 >10kg foram imunizadas com duas doses 0,25mg, (Fig 4).



Fig. 4 - Imunização com KHL em cadela prenhe no 45^a dia de gestação.

4.5 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 (13x0,38mm / 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 (Fig 5).

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 – 4mL 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.



Fig. 5 – Coleta de amostra sanguínea através da punção da veia jugular esquerda com auxílio de voluntária e proprietária na contenção

Todas as amostras contidas em tubo gel foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos para posterior retirada do soro. Este, foi colocado em eppendorff devidamente identificado e armazenado em congelador para posterior análise de anticorpos (Fig 6).



Fig. 6 – Amostra identificada e armazenada em eppendorff contendo soro sanguíneo.

4.6 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° e empurrados em direção ao arco esquiático com movimentos de rotação em sentido horário ou anti-horário (GRANDI; BESERRA; COSTA, 2014), em seguida sendo transpassadas em laminas (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 (Fig. 7). As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em porta laminas.



Fig. 7 – Coleta de amostra citológica vaginal

4.7 Hemogramas e hematócritos:

Amostras contidas no tubo de EDTA foram homogeneizadas e processadas no contador automático de células da marca Brasmed (Fig 8), além de centrifugadas em microcapilares por 5 minutos a 11.500 RPM para leitura dos hematócritos.

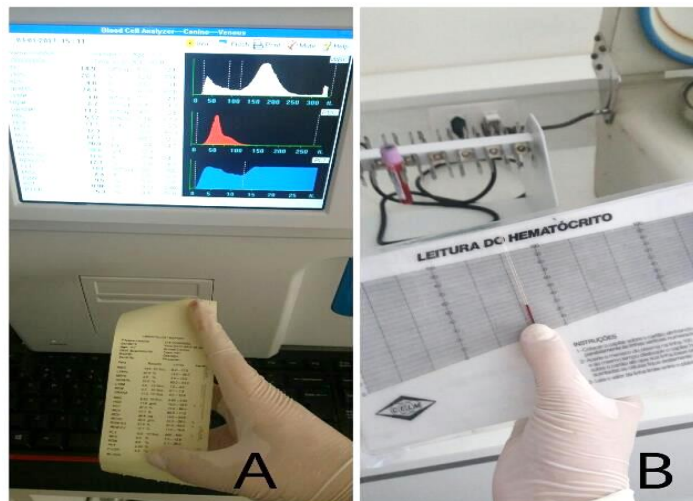


Fig. 8 – A: Exame realizado no contador automático de células da marca Brasmed. B: Leitura de hematócrito após centrifugação

5. RESULTADOS

5.1 Suplementação:

A suplementação com MOS a base de pó misturado à ração seca não foi bem aceita pelas fêmeas gestantes. Houve aceitação somente quando adicionado a um alimento úmido ou a água propriamente dita, formando uma espécie de papinha (Fig 9 e 10).



Fig. 9 - Preparação da proprietária do suplemento em forma de papinha



Fig. 10 - Aceitação da fêmea pela papinha

Observou-se também que uma das 5 fêmeas testadas, apresentou reação a suplementação, com sintomatologia clínica de vômito e diarreia, sendo necessário a retirada desta do estudo.

Dentre as 4 fêmeas restantes pertencentes ao grupo teste, 2 obtiveram aumento de peso (cerca de 100 gramas a mais) na sua ninhada se comparado com gestações anteriores, de acordo com relato do proprietário (Fig 11).



Fig. 11 – Filhote sendo pesado após relato de aumento de peso corporal da ninhada

5.2 Análises hematológicas:

Foi possível observar anemia discreta em grande parte das fêmeas de ambos os grupos, com variações no hematócrito e na porcentagem de hemoglobina total, mas com valores ainda assim abaixo da referência, sendo que a partir do D30, os valores da série vermelha se normalizaram (Tabela 1). Entretanto, não houve variação leucocitária significativa nas fêmeas de ambos os grupos, cuja média dos valores leucocitários totais se encontraram dentro dos valores normais de referência (Tabela 2). Nos esfregaços notou-se a presença de corpúsculos de Howel-Jully - fragmentos nucleares arredondados (micronúcleos) (KIRSCH-VOLDERS, 2003) - nas lamina de algumas fêmeas nas primeiras semanas após o parto.

Tabela 1: Valores médios do hematócrito dos animais dos grupos controle (GC) e teste (GT) em todos os períodos analisados

Grupos	D1	D8	D15	D30	D45	D60	D90	D120
GT	28,7%	31,5%	35,5%	37%	40,7%	45,2%	45%	41,5%
GC	31,2%	33,5%	34,7%	37,7%	38%	39,5%	42%	40,3%
Referência:	37,0	-	55,0%					

Elaboração própria

Tabela 2: Valores médios de leucócitos totais dos animais dos grupos controle (GC) e teste (GT) em todos os períodos analisados expressos em mm³

Grupos	D1	D8	D15	D30	D45	D60	D90	D120
GT	13.400	10.500	10.775	12.975	10.300	8.250	9.475	9.625
GC	10.475	14.600	12.450	9.850	10.575	9.950	11.750	10.600
Referência:	6.000	17.000mm ³						
	-							

Elaboração própria

5.3 Análises citológicas:

As análises citológicas foram baseadas segundo estudos de Allen (1985) e Santos (2006), quantificando as estruturas observadas em nulas/quase nulas (-), raras (+), frequentes (++) , abundantes (+++) e incontáveis (++++). Pode-se observar presença de bactérias em todas as fêmeas em todos os momentos experimentais, exceto na fêmea 1 do grupo teste no primeiro dia coletado. Observou-se que as fêmeas do grupo controle mostraram maior presença de bactérias em todos os momentos analisados (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 – Presença estimada de leucócitos e bactérias das fêmeas pertencentes ao GT.

Coletas	Fêmea 1		Fêmea 2		Fêmea 3		Fêmea 4	
	Leucócitos	Bactérias	Leucócitos	Bactérias	Leucócitos	Bactérias	Leucócitos	Bactérias
D1	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++
D15	++	++	+++	++	++	++	+	+
D30	+++	+++	+	+	+	++	+	+
D60	++	++	+++	++	+++	+++	++	++

Elaboração

própria

Tabela 4 – Presença estimada de leucócitos e bactérias das fêmeas pertencentes ao GC.

Coletas	Fêmea 1		Fêmea 2		Fêmea 3		Fêmea 4	
	Leucócitos	Bactérias	Leucócitos	Bactérias	Leucócitos	Bactérias	Leucócitos	Bactérias
D1	+++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++
D15	+++	+++	++	++	++	++	-	+
D30	++	++	+	++	+++	+++	-	++
D60	+++	+++	+++	++	++	++	++	++

Elaboração própria

5.4 Ensaio imunológico (ELISA)

Foi possível observar desenvolvimento de resposta imunológica, caracterizada por produção de anticorpos frente à imunização com KHL nos animais de ambos os grupos em todos os momentos coletados (Fig. 12). Os níveis de anticorpo foram superiores nos animais do Grupo teste em todos os momentos analisados, sendo a coleta com maior concentração de anticorpo a do D45 nos animais de ambos os grupos (Fig. 13).

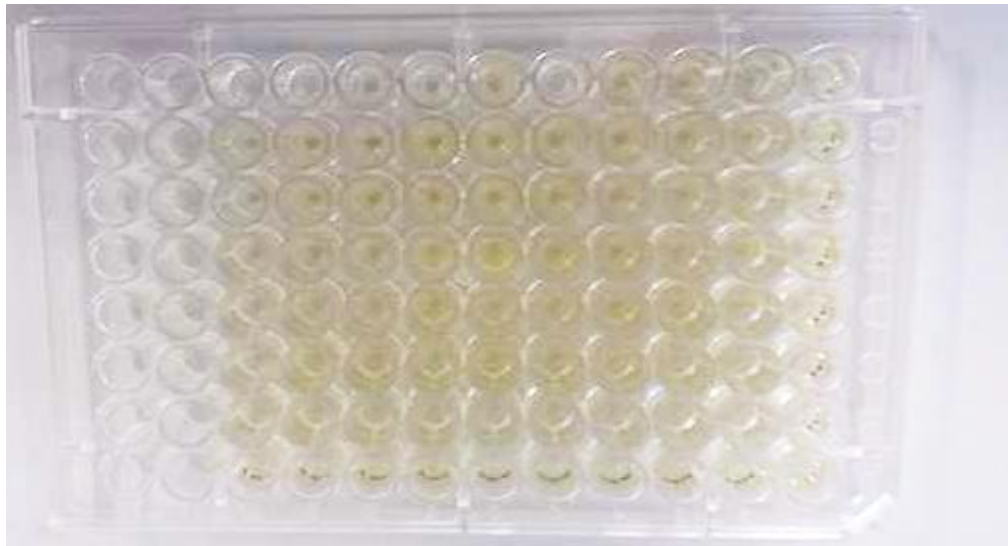


Fig. 12 - ELISA positivo contra KLH em todas as amostras

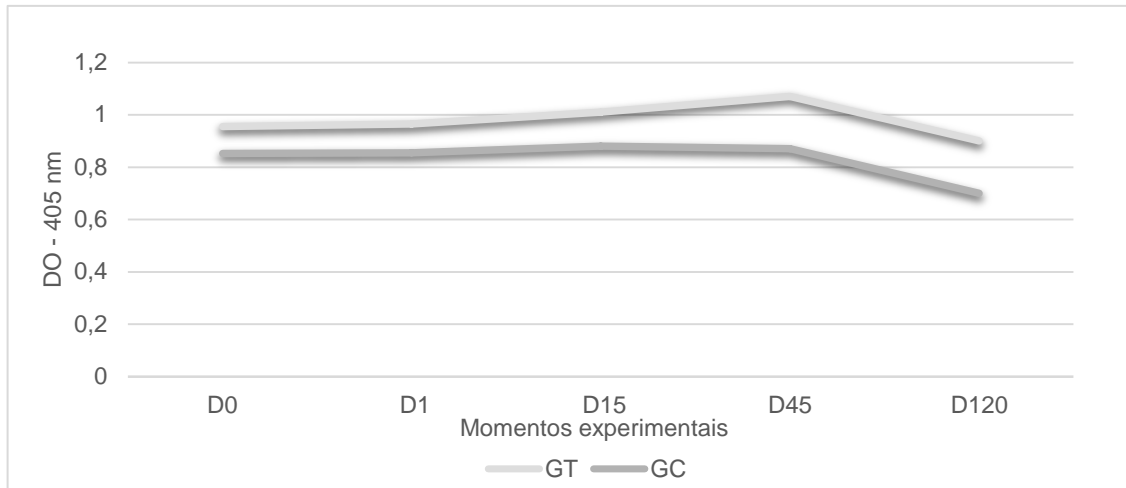


Fig. 13 - Representação esquemática da média das dosagens de anticorpos expressa em densidade óptica nos animais dos grupos experimentais (GT- grupo teste; GC – grupo controle) coletados nos diferentes momentos experimentais.

6. DISCUSSÃO

A suplementação a base de MOS em forma de pó misturado a ração seca não foi bem aceita, sendo necessário a homogeneização com alimento úmido ou água para aceitação das fêmeas em grupo teste.

Foi notado aumento de aproximadamente 100g no peso dos filhotes quando comparado com gestações anteriores de acordo com o proprietário. Em contrapartida, não influenciou de forma significativa nos valores totais celulares através de hemograma, surtindo apenas efeito nutritivo e sem relevância para levantamento estatístico.

Se tratando de fêmeas saudáveis, sem quaisquer sinais clínicos ou achados em esfregaço, a presença do corpúsculo Howell-Jolly pode ser justificada pelos efeitos de coloração e/ou pela anemia aparente das primeiras semanas no pós-parto (KIRSCH-VOLDERS, 2003).

Os achados em citologia vaginal apresentaram variações entre as fêmeas de ambos os grupos, sendo notado somente maior presença de bactérias nas amostras do GC. A presença de grande número de neutrófilos nas primeiras semanas 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 (ETTINGER e FELDMAN, 1997; ALLEN,1995; SANTOS, 2006). 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, podem 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 amostras coletadas. Os níveis de anticorpo foram superiores nos animais do GT em todos os momentos analisados, sendo a coleta com maior concentração de anticorpo a do D45 nos animais dos dois grupos. Tal fato condiz com outra vertente de estudo, em que Gouveia et al. (2006) 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.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados coletados, não houve alterações significativas entre os grupos frente aos resultados de hemograma e citologia vaginal, sendo necessário maiores estudos relacionados. Entretanto, o grupo testado com suplemento em questão obteve maiores títulos de anticorpos específicos contra a proteína utilizada, o que sugere a influência do suplemento no incremento da resposta imunológica dessas fêmeas.

8. DETALHAMENTO DE ATIVIDADES CUMPRIDAS E NÃO CUMPRIDAS

Mês	Semana	Atividades/Orientações	Realizadas		Observações Adicionais
			Sim	Não	
Mês: fevereiro Ano: 2017	1ª. Semana	Aquisição de fêmeas	X		
	2ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	3ª. Semana	Aquisição de fêmeas	X		
	4ª. Semana	Aquisição de fêmeas	X		

Mês: março Ano: 2017	1ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	2ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	3ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	4ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
Mês: abril Ano: 2017	1ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	2ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	3ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	4ª. Semana	Análises citológicas	X		
Mês: maio Ano: 2017	1ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
	2ª. Semana	Análises citológicas	X		
	3ª. Semana	Análises citológicas	X		
	4ª. Semana	Coleta e processamento de amostras	X		
Mês: junho Ano: 2017	1ª. Semana	ELISA	X		
	2ª. Semana	ELISA	X		
	3ª. Semana	ELISA	X		
	4ª. Semana	ELISA	X		

Mês: julho Ano: 2017	1ª. Semana	Redação relatório final	X		
	2ª. Semana	Redação relatório final	X		
	3ª. Semana	Redação relatório final	X		
	4ª. Semana	Redação relatório final	X		

9. REFERÊNCIAS

ALLEN, W. E. Abnormal vaginal cytology in a fertile bitch. **Journal Small Animal Practice**, v. 26, P. 333-335, 1985.

AL-BASSAM, M.A.; THOMSON,R.G. & O'DONNELL,L. Involution Abnormalities in the Postpartum Uterus of the Bitch. **Veterinary Pathology**, n. 18, p. 208-218, 1981.

BURKE, T.J. Postparturient problems in the bitch. **Veterinary Clinics of North America**, n.7: 695,1977.

COCKCROFT, P.D. Focal Cystic Endometrial Hyperplasia in a Bitch. **Journal of Small Animal Practice**, n.36, p.77-78, 1995.

ETTINGER, S. J. ; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do cão e do gato**. São Paulo: Ed. Manole LTDA, 4º ed., v. 2, 1997, 1650p.

FAYER-HOSKEN,R.; CAUDLE,A . & MILLER-LIEBI. Evaluating the Infertile Breeding Bitch. **Veterinary Medicine** , p. 1026-1038, nov.1994.

GARCIA, F. Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede. 2008. 100f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GOUVEIA, E.M.F. et al. Uso de mannanoligossacarídeos fosforilados (Bio-MOS(R))como adjuvante em doenças gastrointestinais em cães. **Revista Pet South América**, jan-fev, 2006.

GRANDI, F.; BESERRA, H.E.O.; COSTA, L.D. **Citologia Veterinária Diagnóstica**. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2014.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. **Obstetrícia veterinária**. Porto Alegre: Sulina. 1989, p. 129-135.

HANSEN, P.J. Maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: is there a prepartum-postpartum nexus?. **Science**, v.91, p.1639-1649, 2013.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6 ed. São Paulo:Manole, 2000. 1514p.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003.

KIRSCH-VOLDERS, Micheline et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003.

LEWIS, G.S. Uterine health and disorders. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.984-994, 1997.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO'2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000. **Anais...** Campinas: FACTA, v.2, p.161-174, 2000.

MOTTA, E. V.; FONSECA, A. M.; BAGNOLI, V. R.; RAMOS, L. O.; PINOTTI, J. A. Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. **Veterinary Association Medical Brazilian**, v. 47, n. 4, p. 302-310, 2001.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Patologias do útero. In:-. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997. Cap.5, p.43-52.

OLSON, P.N.; THRALL, M.A . ; WYKES, P.M. & NETT, T.M. Vagynal Cytology. Part I. A Useful Toll for Staging the Canine Estrous Cycle. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian - North American Edition**, vol. 6 , n. 5 , 288-298,1984.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Diagnosis Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.

ROSZEL, J.F. Cytology of the Bitch. **Vet.Scope**, vol. 19, n. 1, p. 2-15, 1977.

SANTOS, A.G. **Avaliação da microbiota vaginal de cadelas usando como diagnóstico o isolamento microbiológico e a colpocitologia**. Fevereiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Instituto de Veterinária Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

- SMYTH, M.J.; DEGLI-ESPOSTI, M.A. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, p112-124, fev. 2005.
- SWANSON, K.S. et al. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.980-989, 2002b.
- TIZARD, IR. Hipersensibilidade do tipo IV: rejeição de transplantes. In: Tizard IR. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Roca, 1998. p.408-419.
- VICENTE, W.R.R.; APPARICIO, M. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2015.
- YOUNGQUIST, R.S. Cysticfollicular degeneration in the cow. Philadelphia: **W.B.Saunders**, 1986, 326.