



**PAULA CAIXETA BORGES**

**EFEITO DO MANANOLIGOSSACARÍDEO (MOS) SOBRE  
DESEMPENHO, SAÚDE INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE  
EM LEITÕES PÓS-DESMAME DESAFIADOS POR *Escherichia  
coli***

**LAVRAS-MG**

**2018**

**PAULA CAIXETA BORGES**

**EFEITO DO MANANOLIGOSSACARÍDEO (MOS) SOBRE DESEMPENHO, SAÚDE  
INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE EM LEITÕES PÓS-DESMAME DESAFIADOS  
POR *Escherichia coli***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo

Orientador

Prof. Dr. Vinícius de Souza Cantarelli

Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Borges, Paula Caixeta.

Efeito do mananoligossacarídeo (MOS) sobre desempenho,  
saúde intestinal e resposta imune em leitões pós-desmame  
desafiados por *Escherichia coli* / Paula Caixeta Borges. - 2018.

51 p. : il.

Orientador(a): Djeison Lutier Raymundo.

Coorientador(a): Vinícius de Souza Cantarelli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Suinocultura. 2. Resposta Imune Celular. 3. Imuno-  
histoquímica. I. Raymundo, Djeison Lutier. II. Cantarelli, Vinícius  
de Souza. III. Título.

**PAULA CAIXETA BORGES**

**EFEITO DO MANANOLIGOSSACARÍDEO (MOS) SOBRE DESEMPENHO, SAÚDE  
INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE EM LEITÕES PÓS-DESMAME DESAFIADOS  
POR *Escherichia coli***

**EFFECT OF MANANOLIGOSACCHARIDE (MOS) ON PERFORMANCE,  
INTESTINAL HEALTH AND IMMUNE RESPONSE IN PIGLETS POSTWEANING  
CHALLENGES BY *Escherichia coli***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de julho de 2018.

Dr. Djeison Lutier Raymundo

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli UFLA

Dra. Lidiane Orlandi UNILAVRAS

Dra. Mary Suzan Varaschin UFLA

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2018**

*A vida e suas infinitas oportunidades,*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A fé que de alguma forma me dá força para persistir, mesmo quando os caminhos se tornam difíceis.

Aos meus pais e ao meu irmão, por me ensinarem a amar todos os animais e por serem os maiores incentivadores dos meus sonhos.

Ao meu companheiro Carlos, pelo suporte e engrandecimento pessoal. Quero ler todos os livros que temos em casa.

À Universidade Federal de Lavras, por ser minha segunda casa desde 2011. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Setor de Patologia Veterinária, que sempre me recebeu de portas abertas.

Ao meu orientador Djeison Lutier Raymundo, por acreditar em mim e me proporcionar enriquecimentos diários.

Aos demais professores da patologia, Angélica T.B. Wouters, Flademir Wouters e Mary Suzan Varaschin, é uma honra aprender com vocês a cada dia.

Ao Vinícius de Souza Cantarelli, co-orientador, pela paciência em me ensinar sobre assuntos até então desconhecidos.

A todos os envolvidos diretamente no projeto; obrigada Fernanda, Vanessa, Flávio, Kássia, Maíra, Sudário, Ruan e aos outros contribuintes. Não conseguiria sem vocês.

Aos pós-graduandos e estagiários do setor, obrigado pela amizade de sempre, não citarei nomes porque amo todos.

*O homem que vai mais longe é  
geralmente aquele que está  
disposto a fazer e ousar. O barco  
da segurança nunca vai muito  
além da margem.*

*Dale Carnegie*

## RESUMO

Leitões no pós-desmame estão susceptíveis a quedas de desempenho, saúde intestinal e imunidade devido a alterações fisiológicas que ocorrem nesta fase de criação, concomitante com a ocorrência de infecções patogênicas por *Escherichia coli*. A fim de minimizar as perdas diretas e indiretas causadas por esta soma de fatores, o mananoligossacarídeo (MOS), prebiótico advindo de parede celular de levedura, é utilizado. Este trabalho teve por objetivo analisar o desempenho, saúde intestinal e resposta imunológica de leitões no pós-desmame em delineamento experimental inteiramente casualizado, com e sem inclusão de 0,1% MOS comercial (HyperGen<sup>®</sup>, Biorigin) na dieta e com e sem inoculação via oral de *Escherichia coli* K88+ enterotoxigênica. No cultivo microbiológico houve crescimento de *E. coli* em todos os tratamentos, o tratamento controle negativo (DC-INO) apresentou o menor crescimento e os tratamentos com desafio (DC+INO e MOS+INO) apresentaram os maiores crescimentos, mostrando que a inoculação foi eficaz devido a maior proliferação de *E. coli* no intestino dos animais com inoculação, além de maior formação de ácidos graxos voláteis (AGV) no ceco destes animais, devido a possível disbiose provocada pela ação do patógeno. Os animais que receberam MOS, independente de desafio sanitário (MOS+INO e MOS-INO), tiveram maior quantidade de células em proliferação nos tecidos linfóides de íleo e linfonodo mesentérico, com vilosidades intestinais maiores, além de melhores índices de desempenho, comparado ao tratamento controle negativo DC-INO. Isso comprova que a inclusão de MOS na concentração de 0,1% foi capaz de modular o sistema imune, principalmente frente a desafio sanitário, de forma controlada e eficaz, contribuindo com os resultados finais de desempenho. A ação da *E. coli* causou um desequilíbrio da microbiota intestinal, mas não prejudicou no desempenho de animais tratados com MOS. O tratamento com MOS+INO obteve mais ganhos e melhor desempenho, pela ação do MOS sob a saúde intestinal e a contribuição dos AGV, produzidos em maior quantidade devido a disbiose, que mesmo sendo uma alteração maléfica, aumentou a fonte de energia dos enterócitos, que aumentou o tamanho das vilosidades, o que contribuiu com os ganhos finais.

**Palavras-chave:** Imuno-histoquímica. Resposta imune celular. Mananoligossacarídeo. Suíno.



## ABSTRACT

Piglets in postweaning are susceptible to performance declines, intestinal health and immunity due to physiological changes occurring during this breeding phase, concomitant with the occurrence of pathogenic *Escherichia coli* infections. In order to minimize the direct and indirect losses caused by this sum of factors, the prebiotic mannanoligosaccharide (MOS), from yeast cell wall, is used. The objective of this study was to analyze the performance, intestinal health and immune response of piglets in postweaning in a completely randomized experimental design, with and without inclusion of 0.1% commercial MOS (HyperGen®, Biorigin) in the diet and with and without inoculation via oral *Escherichia coli* K88 + enterotoxigenic. In the microbiological culture there was growth of *E. coli* in all treatments, the negative control treatment (DC-INO) showed the lowest growth and the treatments with challenge (DC + INO and MOS + INO) showed the highest growth, showing that inoculation was effective due to the greater proliferation of *E. coli* in the gut of the inoculated animals, as well as a higher formation of volatile fatty acids (VFA) in these animals due to possible dysbiosis caused by the pathogen. Animals that received MOS, regardless of health challenge (MOS + INO and MOS-INO), had higher numbers of proliferating cells in the lymphoid tissues of ileum and mesenteric lymph node, with larger intestinal villi, and better performance indices compared to treatment negative control DC-INO. This proves that the inclusion of MOS in the concentration of 0.1% was able to modulate the immune system, mainly against sanitary challenge, in a controlled and effective way, contributing to the final results of performance. The action of *E. coli* caused an imbalance of the intestinal microbiota, but did not impair the performance of animals treated with MOS. The treatment with MOS + INO obtained more gains and better performance, due to the action of MOS under intestinal health and the contribution of the VFA, produced in greater quantity due to dysbiosis, that even being a malefic alteration, it increased the energy source of enterocytes, which increased the size of the villi, which contributed to the final gains.

**Keywords:** Immunohistochemistry. Cellular immune response. Mannanoligosaccharide. Swine.

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Agronegócio: Panorama mundial e nacional da suinocultura .....	3
2.2 Cadeia produtiva: Pós-desmame .....	4
2.3 <i>Escherichia coli</i> : um desafio sanitário .....	5
2.4 Desafios na suinocultura .....	6
2.5 Prebióticos .....	7
2.6 Mananligossacarídeo e seus mecanismos de ação .....	8
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	10
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	11
SEGUNDA PARTE .....	14
ARTIGO 1 .....	14
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	19
2.1 Local e período experimental .....	19
2.2 Comitê de ética .....	19
2.3 Animais utilizados .....	19
2.4 Instalações .....	19
2.5 Delineamento experimental e tratamentos administrados .....	19
2.6 Desafio sanitário .....	19
2.7 Manejo .....	20
2.8 Coleta de dados de desempenho .....	21
2.9 Abate .....	21
2.10 Microbiologia .....	21
2.11 Ácidos graxos voláteis .....	22
2.12 Morfometria intestinal .....	22
2.13 Coleta e processamento de amostras para histologia e imuno-histoquímica .....	22
2.13.1 Histologia .....	23
2.13.2 Imuno-histoquímica anti-PCNA .....	23
2.14 Análises estatísticas .....	24
3 RESULTADOS .....	25
3.1 Microbiologia .....	25
3.2 Ácidos graxos voláteis .....	25
3.3 Morfometria intestinal .....	26
3.4 Imuno-histoquímica .....	26
3.5 Histologia .....	28
3.6 Desempenho .....	30
4 DISCUSSÃO .....	32
5 CONCLUSÕES .....	37
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
7 ANEXO 1 .....	41

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade que movimenta boa parte da economia brasileira, através da utilização de grãos produzidos no país, utilização de mão de obra para produção, geração de emprego nas indústrias e comercialização de carne e produtos processados. Neste segmento de mercado, o Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína. Este quadro se manteve crescente em 2017, devido a inovações tecnológicas e investimentos constantes no setor. Mas dentre os maiores desafios para a suinocultura do Brasil frente ao mercado externo e interno, a própria cadeia de produção se torna um entrave, devido à criação dos animais em galpões em sistema confinado e a utilização de antimicrobianos, em uma sociedade em que o consumidor busca cada dia mais produtos certificados, principalmente, em relação a bem-estar dos animais e segurança sanitária dos alimentos produzidos. Uma das fases de produção que mais é questionada, neste quesito, é a fase pós-desmame.

A fase pós-desmame é determinante para o desenvolvimento dos animais, pois é uma época em que os leitões estão mais vulneráveis devido a mudanças na dieta, estresse no transporte, realocação nas baias, alterações na climatização do ambiente, dentre outros fatores diversos que deprimem o sistema imunológico. Além disso, a fase corresponde ao período no qual a imunidade passiva dos animais começa a declinar. Assim, esta fase é propícia para a infecção por patógenos oportunistas, como a *E. coli*, principal causadora de doenças entéricas em suínos nesta fase e que causam grandes prejuízos econômicos na produção mundial.

Na tentativa de minimizar infecções como a colibacilose nas granjas de criação, os pesquisadores de desenvolvimento tecnológico encontraram compostos naturais, como os prebióticos, que melhoram a saúde intestinal, modulam o sistema imunológico e contribuem para o desempenho dos animais. Prebióticos como o mananoligossacarídeo (MOS) é um oligossacarídeo derivado de um processo industrial de fermentação da parede celular de leveduras, que se fraciona em porção interna e externa, sendo a porção externa composta de manose fosforilada e glicoproteína. Eles são carboidratos complexos não digestíveis que não sofrem processo de hidrólise ao serem ingeridos e, portanto, não são absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI).

O MOS atua por vários mecanismos de ação, agindo principalmente no intestino grosso, nas regiões de ceco e cólon, onde serve de substrato seletivo para a microbiota benéfica, principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estas bactérias fermentam o MOS

e produzem ácido lático e AGV, como o acetato, propionato e butirato, que acidificam o meio e diminuem a proliferação de bactérias patogênicas como *E. coli*, que crescem mal em ambiente ácido. O butirato é utilizado como energia para os enterócitos, os quais são estimulados a proliferar, mantendo a integridade da mucosa e o tamanho das vilosidades e, desta forma, a superfície de absorção dos nutrientes, que auxilia no melhor desenvolvimento e desempenho dos leitões.

O MOS age como ligante de alta afinidade, por meio de aglutinação competitiva, que bloqueia as fímbrias das bactérias patogênicas e impedem que estas se liguem a receptores nos enterócitos. Este prebiótico também é capaz de se ligar aos enterócitos, que reveste a superfície mucosa e bloqueia a adesão de bactérias patogênicas. Através disso o MOS pode entrar em contato direto com células imunes e desencadear reações moleculares. Estas levam à secreção de citocinas, com mobilização e ativação de outras células de defesa, que pode atuar de maneira pró-inflamatória ou anti-inflamatória na resposta imunológica. Ele ainda influencia indiretamente o sistema imune, em que a microbiota nativa benéfica tem capacidade de produzir substâncias imunoestimulantes, que desencadeiam várias reações, como a proliferação de macrófagos e linfócitos, produção de citocinas diversas e até a indução de síntese de imunoglobulinas, principalmente IgA, mais presentes em região de mucosa.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da inclusão de 0,1% de MOS comercial (HyperGen<sup>®</sup>, Biorigin), frente ao desafio sanitário por *E. coli* K88+ enterotoxigênica, em leitões em fase pós-desmame em relação ao desempenho, saúde intestinal e resposta imune celular.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Agronegócio: Panorama mundial e nacional da suinocultura**

O agronegócio representa atualmente 22% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, equivalente a 918 bilhões de reais, que representa uma das mais importantes fontes de renda do país. Ele coloca o Brasil entre as nações mais competitivas do mundo, com enormes possibilidades de expansão, relacionados à transformação de incontáveis recursos em produtos de consumo interno e exportação. Com isso, hoje há um investimento forte em pesquisas e tecnologia para aumentar a produtividade dos mais diversos setores, dentre eles o da suinocultura (LIMA et al., 2017; TALAMINI & SANTOS FILHO, 2017).

Segundo dados lançados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a China foi a maior produtora de carne suína em 2017 (GUIMARÃES et al., 2017), com produção de 53,400 milhões de toneladas, que representa aproximadamente 50% da produção mundial, seguida da União Europeia (23,675) e dos Estados Unidos (11,610), com o Brasil em quarto lugar, produzindo 3,725 milhões de toneladas. Na exportação a União Europeia esteve em primeiro lugar (2,857 milhões de toneladas) em 2017, em segundo e terceiro vem os Estados Unidos e Canadá com 2,555 e 1,324 milhões de tonelada, respectivamente, e em quarto lugar o Brasil, com 786 mil toneladas de carne suína exportada (TALAMINI & SANTOS FILHO, 2017).

No Brasil a suinocultura é uma atividade amplamente difundida, praticada por pequenos produtores e grandes empresas, que representa um ramo de mercado que ganha cada dia mais espaço no agronegócio brasileiro. Sua escala crescente no aumento da qualidade e índices de produtividade, melhora no manejo dos animais e automatização nos processos produtivos, são os pontos-chave que contribuem para o aumento da oferta interna e externa (TALAMINI & SANTOS FILHO, 2017). De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, estudos e investimentos constantes na suinocultura são os grandes responsáveis por posicionar o Brasil em quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína, colocando o país em destaque no cenário mundial (MORAES, 2017; LIMA et al., 2017; EMBRAPA, 2018).

Competir no mercado internacional é um desafio constante que requer posicionamento estratégico (TALAMINI & SANTOS FILHO, 2017). Em um mundo globalizado todos os países buscam vantagens mercadológicas, econômicas e sociais (JUNQUEIRA et al., 2009). Para a sustentabilidade da suinocultura brasileira diante da realidade da produção nacional, é preciso entender toda a cadeia de produção e priorizar questões que envolvem a

biossegurança, a sanidade, o investimento em mão de obra, o bem-estar animal e o uso racional de antibióticos (SILVA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2017; KRITAS, 2018).

## **2.2 Cadeia produtiva: Pós-desmame**

Na cadeia de produção da suinocultura, a fase de criação que mais oferece desafios e causa perdas econômicas é o pós-desmame. Nesta etapa os animais estão suscetíveis a infecções por patógenos oportunistas como *E. coli*, frequente causadora de doença entérica nos galpões de criação de suínos (ALMEIDA et al., 2007; SILVA et al., 2012; TRAN et al., 2016; KRITAS, 2018).

Estudos mostram que *E. coli* é encontrada no TGI em até duas horas após o nascimento, em que os leitões se infectam logo ao passarem pelo canal vaginal da mãe (DUTRA, 2011). Um fator fisiológico que facilita a infecção via oral é que, durante as primeiras horas após o nascimento, os animais monogástricos não possuem secreção eficiente de ácido clorídrico pelas células parietais do estômago (ATTIA et al., 2013), que cria um ambiente com pH mais elevado, ideal para essa bactéria, que permite a sua passagem e a proliferação no intestino (MENIN et al., 2008; TREVISI et al., 2015; TRAN et al., 2016).

Na fase pós-desmame ocorre interrupção súbita no fornecimento de leite, com retirada deste substrato importante para bactérias benéficas como *Lactobacillus* sp. (DUTRA, 2011). Consequentemente, diminui a produção de ácido láctico, que contribui para o aumento do pH gastrintestinal. A baixa secreção de ácido clorídrico, que deixa o ambiente mais alcalino, e de algumas enzimas digestivas, é responsável por dificultar a digestão e absorção das dietas de concentrado recebidas neste período, que representam a única fonte de nutrientes para os leitões (VONDRUSKOVA et al., 2010; ATTIA et al., 2013; TRAN et al., 2016). Ainda, frente a todas essas condições, há atrofia das vilosidades intestinais e aumento das criptas, causadas por diminuição da renovação celular nesta fase. Isso faz com que os animais aumentem a conversão alimentar e diminuam o desempenho (PEREIRA et al., 2016; TRAN et al., 2016).

Junto a isso, o sistema imune dos animais está mais desafiado devido a estímulos estressores relacionados a mudanças na dieta, realocação dos animais em baias, com leitegadas diferentes, alterações na climatização do ambiente, dentre outros fatores que causam imunodepressão (DUTRA, 2011; GOUVEIA et al., 2012; OSO et al., 2015). Ainda, a imunidade passiva adquirida pelos filhotes, em que há aquisição de anticorpos maternos pela colostragem, começa a declinar, além do sistema imunológico não estar totalmente maduro, levando a situações propícias para a colonização do intestino por agentes patogênicos

(COSTA et al., 2006; MENIN et al., 2008; PEREIRA et al., 2016; TRAN et al., 2016; KRITAS, 2018).

Desse modo, doenças entéricas causadas por *E. coli* estão relacionadas ao manejo sanitário da granja (ALMEIDA et al., 2007; STELLA, 2009), à fisiologia da espécie, assim como o desafio sanitário relacionado ao número de bactérias e sua patogenicidade, à condição de desmama, a fatores estressantes do período, que alteram o estado imunológico e a morfologia intestinal (SIMIONATTO et al., 2005; VONDRUSKOVA et al., 2010, TRAN et al., 2016; KRITAS, 2018).

Esses fatores afetam a saúde dos animais, com prejuízos diretos na produção e morte de leitões acometidos por doença clínica; e de forma indireta, devido à queda no desempenho e custos com tratamentos (ZANELLA et al., 2016). Alternativas que melhoram a saúde intestinal, que proporcionam equilíbrio da microbiota, melhorias da digestibilidade e da absorção de nutrientes, redução da colonização por microrganismos indesejáveis e modulação do sistema imunológico, assim como alguns aditivos, incluindo os prebióticos, contribuem para a saúde e o bem-estar dos animais (SILVA et al., 2010; MORÉS, 2014; SANTOS et al., 2016, KRITAS, 2018).

### **2.3 *Escherichia coli*: um desafio sanitário**

*E. coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa, que pertence ao reino Monera, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família *Enterobacteriaceae*, gênero *Escherichia* (STELLA, 2009). São aeróbias e anaeróbias facultativas e compõem uma pequena parcela da microbiota residente do TGI de animais endotérmicos. Além dos sorotipos de *E. coli* naturais do intestino, existem sorotipos patogênicos capazes de colonizar o TGI, que representam um dos agentes mais comumente encontrados no intestino de animais com doenças entéricas (KRITAS, 2018).

A colonização pode ocorrer por vários mecanismos. Essa bactéria possui centenas de projeções da membrana plasmática compostas de proteínas, as quais são denominadas fímbrias e possuem a função de apêndice de aderência destes microrganismos aos enterócitos do hospedeiro. As fímbrias se ligam à superfície das microvilosidades intestinais e alteram a estrutura das células, que causam lesões que diminuem a superfície de absorção e levam a desnutrição e queda do desempenho dos leitões. Além disso, essas bactérias podem se agregar, que formam biofilmes na parede intestinal, o que também diminui a área de absorção e dificulta a eliminação dessas bactérias por meio de mecanismos de defesa do animal ou de medicamentos administrados (TRAN et al., 2016; ZANELLA et al., 2016).

Outro mecanismo patológico é a capacidade de *E. coli* em quebrar as junções de oclusão entre os enterócitos, por meio de proteínas que levam ao rompimento destas ligações, o que gera perda da resistência elétrica transintestinal, com aumento da saída de água e eletrólitos para o lúmen e a permeabilidade intestinal, que causa desidratação, além de infecção local e sistêmica (TRAN et al., 2016).

Através da quebra das junções, algumas bactérias podem penetrar até a lâmina própria e ser reconhecidas pelas células de defesa. Entretanto estas não conseguem ser ativadas devido a fatores de virulência, por meio de proteínas bacterianas que impedem a expressão antigênica, que bloqueiam a apresentação de antígeno e a secreção de citocinas. Conseqüentemente inibem a proliferação e diferenciação celular, com modulação negativa da resposta imune inata e celular do hospedeiro (STELLA, 2009; ZANELLA et al., 2016; KRITAS, 2018).

Quando o sistema imune consegue conter e destruir a bactéria, ela libera outro fator de virulência, o lipopolissacarídeo (LPS), componente estrutural da parede de bactérias Gram-negativas, que serve como envoltório de proteção contra agentes químicos do TGI. O LPS é uma endotoxina, que em contato com o organismo causa um desequilíbrio da homeostase (BAUHO, 2007).

Além de estimular a hipersecreção de água, que causa mais desidratação, o LPS também aumenta a concentração de cálcio dentro dos enterócitos, que aumenta pressão osmótica e causando lise celular. Esta substância diminui a produção de mucina, o que predispõe à maior agregação de bactérias patogênicas à mucosa, com aumento da infecção. As endotoxinas em grandes quantidades geram sinais clínicos como dores abdominais, hiporexia e diarreia líquida profusa, com desidratação e ainda pode atingir a corrente sanguínea, que leva a quadro de choque anafilático e morte dos animais (ALMEIDA et al., 2007; PEREIRA et al., 2016; TRAN et al., 2016).

#### **2.4 Desafios na suinocultura**

A princípio, para minimizar a ocorrência de doenças em leitões na fase de creche, os produtores de suínos começaram a investir em melhorias do manejo sanitário nas granjas, mas a contaminação por patógenos ainda continuava a ser um desafio (BUDIÑO et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007; MENIN et al., 2008). Eles começaram a utilizar os antibióticos em subdosagens, na tentativa de minimizar as perdas de produção. Por meio de diversos estudos, descobriu-se que os antibióticos equilibram a microbiota do trato intestinal, diminuem a competição por nutrientes, que melhora a digestibilidade, a conversão alimentar e,



consequentemente, proporciona melhor desempenho zootécnico, sendo denominados antibióticos promotores de crescimento. Devido a isso, a utilização destes produtos começou a ser amplamente praticada, muitas vezes de forma indiscriminada, que culminou com o aumento da resistência das bactérias a estes compostos (GONZALES et al., 2012; KRITAS, 2018).

Ao serem ingeridos os antibióticos não são totalmente metabolizados, gerando acúmulo de resíduos químicos em produtos de origem animal, além de contaminação ambiental, devido ao contato das excretas dos animais com solo, pastagens, águas superficiais e lençóis freáticos (MORÉS, 2014; PEREIRA et al., 2016).

Neste âmbito, a demanda por alimentos seguros, advindos de animais saudáveis e livres de contaminação, tem se mostrado uma tendência crescente, principalmente no mercado externo, que afeta os sistemas de produção, uma vez que exige a redução ou retirada de antibióticos. Assim, esses antibióticos foram gradativamente substituídos por aditivos alternativos que atuam de maneira equivalente eficiente, como no caso dos prebióticos (PEREIRA et al., 2016; TRAN et al.). Os compostos prebióticos têm a finalidade de melhorar o estado sanitário dos animais, que dão condições ao organismo de minimizar o estabelecimento de infecções entéricas graves (COSTA et al., 2006; 2016; KRITAS, 2018).

## **2.5 Prebióticos**

Os prebióticos são compostos inorgânicos de carboidratos complexos de várias origens, que servem de substrato para a microbiota intestinal benéfica (TRAN et al, 2016; KRITAS, 2018). Eles podem ser considerados aditivos promotores de crescimento, já que estimulam um equilíbrio dos microrganismos que melhoram a saúde intestinal, inibem o sítio de adesão de patógenos nos enterócitos por aglutinação competitiva e modulam a resposta imunológica de forma benéfica (VONDRUSKOVA et al., 2010; BLATCHFORD, et al., 2013).

Estudos mostram que animais em ambiente controlado e estéril, com menor quantidade de microbiota intestinal, possuem menor quantidade de células do sistema imune nestas regiões, como células de origem linfocitária e, consequentemente, ficam mais suscetíveis a infecções, já que a via intestinal é um importante meio de comunicação com o ambiente externo (DUTRA, 2011). Na natureza existem várias fontes de prebióticos, uma delas são os oligossacarídeos, compostos que existem naturalmente e que sofrem processos de quebra parcial de compostos maiores, os polissacarídeos. Dentre eles, o MOS é um dos mais estudados na suinocultura (BAUHO, 2007; GOUVEIA et al., 2012; TRAN et al, 2016).

## 2.6 Mananoligossacarídeo e seus mecanismos de ação

O MOS é um oligossacarídeo derivado de um processo industrial de fermentação da parede celular de leveduras, que se fraciona em porção interna e externa, com porção externa composta de manose fosforilada e glicoproteína. É um carboidrato complexo não digestível, que não sofre hidrólise ao ser ingerido e, portanto, não é absorvidos pelo TGI (BUDIÑO et al., 2006; BAUHO, 2007; GOUVEIA et al., 2012; SILVA et al., 2012; GERON et al., 2013).

Dutra (2011) e Silva et al. (2012) discutem um dos mecanismos de ação do MOS, mostra que ele age principalmente no intestino grosso, nas regiões de ceco e cólon e serve de substrato seletivo para a microbiota benéfica, principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estas bactérias fermentam o MOS e produzem ácido láctico e AGV, como o acetato, propionato e butirato, que acidificam o meio e diminuem a proliferação de bactérias patogênicas como *E. coli* (VONDRUSKOVA et al., 2010; ROODPOSHTI & DABIRI, 2012; ATTIA, 2013; OSO et al., 2015; KRITAS et al., 2018).

Os AGV servem de nutrientes para o organismo. No intestino o acetato e o propionato são absorvidos e caem diretamente na corrente sanguínea. Já o butirato é utilizado como fonte de energia para os enterócitos, os quais são estimulados a proliferar, mantendo a integridade da mucosa (JUNQUEIRA et al., 2009; KRITAS et al., 2018). Assim, há desenvolvimento das células intestinais, que aumentam o tamanho das vilosidades e, desta forma, a superfície de absorção dos nutrientes, que auxilia no melhor desenvolvimento e desempenho dos leitões (VONDRUSKOVA et al., 2010; DUTRA, 2011; ATTIA, 2013; OSO et al., 2015).

Junto a isso, um número maior de microrganismos nativos compete diretamente pelo sítio de ligação nos enterócitos. O MOS também age como ligante de alta afinidade, por meio de aglutinação competitiva, que bloqueia as fímbrias das bactérias patogênicas. Estas possuem sítios de adesão de lectinas sensíveis a manose, que causam ligações fortes a algumas bactérias Gram-negativas, e impedem que estas se liguem a receptores nos enterócitos. Além disso, o MOS também pode ser capaz de remover patógenos recentemente aderidos à mucosa intestinal (DUTRA, 2011, BLATCHFORD et al., 2013., TRAN et al., 2016).

O MOS pode atuar no TGI de forma semelhante a *E. coli*, sendo também capaz de se ligar aos enterócitos, que reveste a superfície mucosa e bloqueia a adesão de bactérias patogênicas. Através disso o MOS pode entrar em contato direto com células imunes, por meio de receptores de manose na superfície de algumas destas células, que atua como um “antígeno não-patogênico” e desencadeia reações moleculares. Estas levam à secreção de

citocinas, com mobilização e ativação de outras células de defesa, que pode atuar de maneira pró-inflamatória ou anti-inflamatória na resposta imunológica (BUDIÑO et al., 2006; DUTRA, 2011; BLATCHFORD et al., 2013; TRAN et al., 2016). Além disso, o MOS influencia indiretamente o sistema imune, em que a microbiota nativa benéfica tem capacidade de produzir substâncias imunoestimulantes, que desencadeiam várias reações, como a proliferação de macrófagos e linfócitos, produção de citocinas diversas e até a indução de síntese de imunoglobulinas, principalmente IgA, mais presentes em região de mucosa (KRITAS, 2018).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suinocultura brasileira contribui muito para o agronegócio. O país é um importante produtor e exportador de carne suína, que ocupa o quarto lugar no ranking mundial. Cada dia mais, os consumidores estão preocupados em comprar alimentos seguros e livres de resíduos químicos, o que propicia a maior concorrência de mercado e embargos de produtos. Assim, os prebióticos, como o MOS, vem como alternativa ao uso de antibióticos, que causam efeitos extremamente benéficos para a saúde dos animais e o estado sanitário geral das granjas. Este aditivo atua como substrato para bactérias nativas, minimiza a ligação de bactérias patogênicas como *E. coli* aos enterócitos e, de forma indireta, estimula a renovação das células intestinais, com aumento das vilosidades. Isso, por sua vez, aumenta a absorção de nutrientes, com melhora do desempenho, a saúde intestinal e ainda modula o sistema imune, que fica mais apto a debelar infecções de forma controlada. Até então, não se sabe ao certo quais os efeitos do uso do MOS sobre a proliferação de células de defesa a nível histológico e se esta variação na resposta imunológica celular se associa aos resultados de microbiologia, AGV, morfometria intestinal e desempenho. Através deste trabalho foi possível observar a ação dos MOS em animais no pós-desmame com e sem desafio sanitário, sobre o desempenho dos leitões, a saúde intestinal e a resposta imune celular.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. S.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; MALUTA, R. P.; ÁVILA, F. A. Diarreia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Ars Veterinaria**. Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 151-157, 2007.
- ATTIA, Y. A.; EL-HANOUN, A. M.; BOVERA, F.; MONASTRA, G.; EL-TAHAWY, W. S.; HABIBA, H. I. Growth performance, carcass quality, biochemical and haematological traits and immune response of growing rabbits as affected by different growth promoters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. Italy, p. 1-12, 2013.
- BARROSO, D. C.; VIEIRA, A. A.; LIMA, C. A. R.; TRINDADE, B. S.; GOMES, A. V. C.; SOUZA, M. M. S.; CORRÊA, G. S. S. Adição da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1139-1148, 2013.
- BAUHO B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C. A. Cecal populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* populations after in vivo *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**. Quebec, Canada, 86, p. 2509–2516, 2007.
- BLATCHFORD, R.; ANSELL, J.; MEGODOY, M. R. C.; FAHEY, G.; GARDAMAZCORRO, J. F.; GIBSON, G. R.; GOH, Y. J.; HOTCHKISS, A. T.; HUTKINS, R.; LACROIX, C.; RASTALL, R. A.; REIMER, R. A.; SCHOTENNAN, M.; VANSINDEIEN, D.; VENEMA, K.; WHELAN, K. Probiotic mechanisms, functions and applications: A review. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**. New Zealand, v.8, n.4, p.109-132, 2013.
- BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; TUCCI, F. M.; FRAGA, A. L.; SCANDOLERA, A. J.; HUAYNATE, R. A. R.; NADAI, A.; CORREIA, R. C. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho, incidência de diarréia e contagem de coliformes totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 43, Suplemento, p. 59-67, 2006.
- COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.
- DUTRA, D. R. Prebiótico e probiótico para leitões experimentalmente desafiados com *Escherichia coli* K88+. 2011. 94 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- EMBRAPA. Central de Inteligência de Aves e Suínos. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/brasil>> Acesso em: 16/05/2018, 2018.
- GERON, L. J. V. et al. Aditivos promotores de crescimento (antibióticos, ionóforos, probióticos, prebióticos e própolis) utilizados na alimentação animal. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 14, ed. 237, art. 1563, 2013.

GONZALES, E.; MELLO, H. H. C. M.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG** (Universidade Federal de Goiás). v. 8, n. 13, 2012.

GOUVEIA, E. M. M. F.; SILVA, I. S.; NAKAZATO, G.; ONSELEM, V. J. V.; CORRÊA, R. A. C.; ARAUJO, F. R.; CHANG, M. R. Action of phosphorylated mannanoligosaccharides on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 499-504, 2013.

GUIMARÃES, D.; AMARAL, G.; MAIA, G.; LEMOS, M.; ITO, M.; CUSTODIO, S. Suinocultura: Estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **Agroindústria BNDES Setorial**, p. 85-136, 2017.

JUNQUEIRA, O. M.; BARBOSA, L. C. G. S.; PEREIRA, A. A.; ARAÚJO, L. F.; NETO, M. G.; PINTO, M. F. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2394-2400, 2009.

KRITAS, S. K. Probiotics and Prebiotics for the Health of Pigs and Horses. In: GIOIA, D. & BIAVAT, B. **Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety**. Switzerland: Springer International Publishing, 2018. p. 109-126.

LIMA, J. G.; POZO, O. V. C.; FREITAS, R. R.; MAURI, G. N. STARTUPS NO agronegócio brasileiro: Uma revisão sobre as potencialidades do setor. **Brazilian Journal of Production Engineering**, v. 3, n. 1, p.107-121, 2017.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.

MORAES, R. E. Suinocultura e o Meio-ambiente. Revisão de Literatura. **Revista eletrônica de Veterinária**. Pelotas, Rio Grande do Sul, v. 18, n. 10, 2017.

MORÉS, N. É possível produzir suínos sem o uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho?. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, VI, 2014. Estância de São Pedro, SP. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal.

OSO, A. O.; ERINLE, O. Y.; WILLIAM, G. A.; OGUNADE, A. C. Interaction effect of whole wheat feeding and mannanoligosaccharides supplementation on growth performance, haematological indices and caecal microbiota of cockerel chicks. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. Nigeria, 99, p. 919–923, 2015.

PEREIRA, D. A.; VIDOTTO, M. C.; NASCIMENTO, K. A.; SANTOS, A. C. R.; MECHLER, M. L.; OLIVEIRA, L. G. Virulence factors of *Escherichia coli* in relation to the importance of vaccination in pigs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 8, p. 1430-1437, 2016.

ROODPOSHTI, P. M & DABIRI, N. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia coli*, and immune system status in newborn female calves. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Iran, 25, p. 1255-1261, 2012.

- SANTOS, A. V.; FIALHO, E. T.; ZANGERÔNIMO, M. G.; CANTARELLI, V. S.; TEOFILO, T. S.; MOLINO, J. P. Aditivos antibiótico, probiótico e prebiótico em rações para leitões desmamados precocemente. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2016.
- SILVA, M. L. F.; LIMA, J. A. F.; CANTARELLI, V. S.; AMARAL, N. O.; ZANGERÔNIMO, M. G.; FIALHO, E. T. Probiotics and antibiotics as additives for sows and piglets during nursery phase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 11, p. 2453-2459, 2010.
- SILVA, S. Z.; THOMAZ, M. C.; WATANABE, P. H.; ROBLES HUAYNATE, R. A.; RUIZ, U. S.; PASCOAL, L. A. F.; SANTOS, V. M.; MASSON, G. C. I. H. Mananoligossacarídeo em dietas para leitões desmamados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 102-110, 2012.
- SILVA, C. V. O.; OLIVEIRA, A. M. A.; BEZERRA, P. P. N.; EVANGELISTA, J. N. B. *Escherichia coli* na suinocultura. Aspectos clínicos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 288-293, 2015.
- SIMIONATTO, S.; VAZ, E. K.; MICHELON, A.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A. Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 25, n. 2, p. 84-90, 2005.
- STELLA, A. E. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. 2009. 83 f. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2009.
- TALAMINI, D. J. D. & SANTOS FILHO, J. I. **Anuário 2018 da suinocultura industrial**. n. 6, ed. 279, 2017.
- TRAN, T. H. T.; EVERAERT, N.; BINDELLE, J. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. University of Liege, Belgium, v. 102, p. 1-16, 2016.
- VONDRUSKOVA, H.; SLAMOVA, R.; TRCKOVA, M.; ZRALY, Z.; PAVLIK, I. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 5, p. 199-224, 2010.
- ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 443-453, 2016.

## **SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO 1 (Formatação de acordo com as normas da Universidade Federal de Lavras)**

**EFEITO DO MANANOLIGOSSACARÍDEO (MOS) SOBRE DESEMPENHO, SAÚDE INTESTINAL E RESPOSTA IMUNE EM LEITÕES PÓS-DESMAME DESAFIADOS POR *Escherichia coli***

**EFFECT OF MANANOLIGOSACCHARIDE (MOS) ON PERFORMANCE, INTESTINAL HEALTH AND IMMUNE RESPONSE IN PIGLETS POSTWEANING CHALLENGES BY *Escherichia coli***



## RESUMO

O pós-desmame é uma das etapas de produção com maiores perdas econômicas na suinocultura, principalmente decorrentes de infecções por patógenos como *E. coli*. Este trabalho teve por objetivo principal caracterizar o desempenho, saúde intestinal e resposta imune de leitões na fase pós-desmame tratados com inclusão de 0,1% de prebiótico mananoligossacarídeo (MOS) comercial (HyperGen<sup>®</sup>, Biorigin), com e sem desafio sanitário, analisando os resultados quantitativos de microbiologia, os ácidos graxos voláteis (AGV), morfometria intestinal, proliferação celular, tamanhos de folículos linfóides e ganhos de peso, consumo de ração e conversão alimentar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizados com tratamentos com e sem MOS e com e sem inoculação de *E. coli* K88+ enterotoxigênica. Maiores quantidades de colônias bacterianas foram detectadas nos animais inoculados com *E. coli*, o que gerou uma disbiose intestinal e aumentou a quantidade de AGV cecais destes animais. Em relação à morfometria intestinal, houve uma tendência da variável vilosidade em que os tratamentos com MOS tiveram vilosidades maiores comparados à dieta controle. A análise de imuno-histoquímica anti-PCNA, mostraram que o MOS aumenta a proliferação de células linfóides, o que indica a modulação do sistema imune, também frente ao desafio sanitário, mas sem exacerbação da resposta imune celular. Em relação ao desempenho, o MOS atuou de maneira benéfica em animais desafiados (MOS+INO), já que não houve gasto energético acentuado devido ao controle da resposta imunológica, além da maior quantidade de AGV, neste caso, ter gerado uma hiperplasia dos enterócitos, aumentando a área de absorção intestinal, sendo este tratamento com menor conversão alimentar e melhores resultados. Assim, pode se observar a ação de *E. coli* e suas consequências no intestino dos animais e a capacidade imunomoduladora do MOS, com preparo do organismo para infecções e controle da resposta imune celular frente a desafio sanitário e os resultados de desempenho, sendo este aditivo interessante para o uso na fase pós-desmame.

**Palavras-chave:** Imuno-histoquímica. Resposta imune celular. Mananoligossacarídeo. Suíno.

## ABSTRACT

Post-weaning is one of the production stages with greater economic losses in swine, mainly due to infections by pathogens such as *E. coli*. The objective of this study was to characterize the performance, intestinal health and immune response of piglets in the post-weaning phase treated with inclusion of 0.1% prebiotic commercially available mannanigosaccharide (HyperGen®, Biorigin), with and without sanitary challenge, analyzing the quantitative results of microbiology, volatile fatty acids (VFA), intestinal morphometry, cell proliferation, lymphoid follicle sizes and weight gain, feed intake and feed conversion. The experimental design was completely randomized with treatments with and without MOS and with and without inoculation of *E. coli* K88 + enterotoxigenic. Higher amounts of bacterial colonies were detected in animals inoculated with *E. coli*, which generated intestinal dysbiosis and increased the amount of cecal VFA of these animals. In relation to intestinal morphometry, there was a tendency of the variable villus in which MOS treatments had larger villi compared to the control diet. The anti-PCNA immunohistochemistry analysis showed that MOS increases the proliferation of lymphoid cells, which indicates modulation of the immune system, also in face of the sanitary challenge, but without exacerbation of the cellular immune response. Regarding performance, the MOS performed a beneficial effect on challenged animals (MOS + INO), since there was no significant energy expenditure due to the control of the immune response, besides the greater amount of VFA, in this case, to have generated an enterocyte hyperplasia, increasing the area of intestinal absorption, being this treatment with lower feed conversion and better results. Thus, we can observe the action of *E. coli* and its consequences in the intestines of the animals and the immunomodulatory capacity of the MOS, with preparation of the organism for infections and control of the cellular immune response against sanitary challenge and the performance results, being this additive interesting for use in the post-weaning phase.

**Keywords:** Immunohistochemistry. Cellular immune response. Mannanligosaccharide. Swine.

## 1 INTRODUÇÃO

A suinocultura movimenta boa parte da economia brasileira, uma vez que, o Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína. Na cadeia produtiva, a fase de pós-desmame é uma das determinantes para o desenvolvimento dos suínos, pois é uma época em que os leitões estão mais sensibilizados devido a alterações fisiológicas e estresse, que prejudicam a saúde dos animais e o estado imunológico. Assim, esta fase se torna propícia para a infecção por patógenos oportunistas, como *Escherichia coli*, causadora de doença entérica e vascular em suínos nesta fase, com prejuízos econômicos diretos e indiretos na produção mundial.

A fim de minimizar a ocorrência dessas infecções, surgiu uma nova perspectiva para o uso de antibióticos como composto profilático. A comprovação de suas funções como promotores de crescimento fez com que esses aditivos fossem utilizados amplamente. Por outro lado, o uso crescente de antibióticos se tornou um desafio para a suinocultura frente ao mercado externo e interno, já que o consumidor passou a se preocupar mais com sua alimentação e exigir alimentos seguros, livres de contaminação por resíduos desses compostos. Desta maneira, alternativas para a utilização dos antibióticos promotores de crescimento foram desenvolvidas, sendo encontrados alguns aditivos prebióticos semelhantemente eficientes.

Prebióticos são compostos derivados de carboidratos complexos que não são digestíveis e nem absorvíveis pelo TGI, sendo utilizados como substrato para bactérias fermentadoras naturais benéficas no intestino. Um desses prebióticos é o mananoligossacarídeo (MOS), um oligossacarídeo derivado de um processo industrial de fermentação da parede celular de leveduras, que se fraciona em porção interna e externa, sendo a porção externa composta de manose fosforilada e glicoproteína.

O MOS atua por vários mecanismos de ação, agindo principalmente no intestino grosso, nas regiões de ceco e cólon, onde serve de substrato seletivo para a microbiota benéfica, principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estas bactérias fermentam o MOS e produzem ácido lático e ácidos graxos voláteis (AGV), como o acetato, propionato e butirato, que acidificam o meio e diminuem a proliferação de bactérias patogênicas como *E. coli*, que crescem mal em ambiente ácido. O butirato é utilizado como energia para os enterócitos, os quais são estimulados a proliferar, mantendo a integridade da mucosa e o tamanho das vilosidades e, desta forma, a superfície de absorção dos nutrientes, que auxilia no melhor desenvolvimento e desempenho dos leitões.

O MOS age como ligante de alta afinidade, por meio de aglutinação competitiva, que bloqueia as fímbrias das bactérias patogênicas e impedem que estas se liguem a receptores nos enterócitos. Este prebiótico também é capaz de se ligar aos enterócitos, que reveste a superfície mucosa e bloqueia a adesão de bactérias patogênicas. Através disso o MOS pode entrar em contato direto com células imunes e desencadear reações moleculares. Estas levam à secreção de citocinas, com mobilização e ativação de outras células de defesa, que pode atuar de maneira pró-inflamatória ou anti-inflamatória na resposta imunológica. Ele ainda influencia indiretamente o sistema imune, em que a microbiota nativa benéfica tem capacidade de produzir substâncias imunoestimulantes, que desencadeiam várias reações, como a proliferação de macrófagos e linfócitos, produção de citocinas diversas e até a indução de síntese de imunoglobulinas, principalmente IgA, mais presentes em região de mucosa.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da inclusão de 0,1% de MOS comercial (HyperGen<sup>®</sup>, Biorigin), frente ao desafio sanitário por *E. coli* K88+ enterotoxigênica, em leitões em fase pós-desmame em relação ao desempenho, saúde intestinal e resposta imune celular.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local e período experimental**

O presente estudo foi conduzido no Centro Experimental de Suínos (CES) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, no estado de Minas Gerais.

### **2.2 Comitê de ética**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA – UFLA) em 24 de maio de 2017, com protocolo número 012/17.

### **2.3 Animais utilizados**

Foram usados 20 leitões machos castrados, provenientes de uma granja comercial de suínos. Os leitões foram desmamados na granja aos 24 dias de idade, com média 6,5 kg de peso vivo. Foram transportados ao CES, onde foram alojados na unidade de creche.

### **2.4 Instalações**

Os galpões da unidade de creche possuem janelas ao fundo e uma porta na frente. Os animais foram alojados em baias suspensas, com piso ripado, comedouros semiautomáticos e bebedores tipo chupeta.

### **2.5 Delineamento experimental e tratamentos administrados**

Os leitões foram distribuídos de maneira inteiramente casualizada, com e sem utilização de parede celular de levedura com 0,1% de MOS comercial (HyperGen<sup>®</sup>, Biorigin) e com e sem desafio sanitário. O tratamento DC+INO consistiu de dieta controle com desafio sanitário; o tratamento DC-INO de dieta controle e sem desafio sanitário; o tratamento MOS+INO de dieta com inclusão de 0,1% de MOS e com desafio sanitário; o tratamento MOS-INO de dieta com inclusão de 0,1% de MOS e sem desafio sanitário.

### **2.6 Desafio sanitário**

Os leitões submetidos a desafio sanitário receberam, no quarto e no quinto dia de experimento, 1 mL de solução contendo  $10^8$  UFC/mL de *E. coli* k88<sup>+</sup> enterotoxigênica por via oral, através do auxílio de uma seringa acoplada a um escalpo para quantificar a dosagem, sendo o inóculo colocado na entrada do esôfago. A solução foi preparada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Zootecnia da UFLA. A cepa cresceu em cultura por 16 horas a 37°C e depois lavada sequencialmente em PBS três vezes até a concentração de  $10^8$  UFC/ml, de acordo com a metodologia de Halas et al. (2009). A bactéria foi isolada pelo Laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP).

## 2.7 Manejo

Ao chegar à unidade de creche do CES os leitões passaram por três dias de adaptação às instalações, manejo e dieta Pré-inicial 1, sem prebiótico, detalhada na Tabela 1, para então iniciarem a fase experimental, com duração de 11 dias. Do dia 0 ao dia 4 os animais receberam dieta Pré-inicial 1, com ou sem MOS, e do dia 5 ao dia 11 ingeriram a dieta Pré-inicial 2, com ou sem MOS. Para a utilização do prebiótico na dieta, o aditivo Caulim foi substituído pela inclusão de 0,1% de MOS (HyperGen<sup>®</sup>, Biorigin).

A ração foi fornecida duas vezes ao dia. Durante todo o experimento era feita higienização das baias, limpeza dos comedouros para cálculo de desempenho, além de manutenção da temperatura adequada para a fase de desenvolvimento dos animais pelo manejo de cortinas e lâmpadas de aquecimento. Fornecimento de água *ad libitum*.

Para o controle de doenças respiratórias, os animais receberam no primeiro dia de adaptação uma dose intramuscular (0,15 mL) de antibiótico à base de tulatromicina (Draxxin<sup>®</sup>, Zoetis). Por concentrar-se nos pulmões, a tulatromicina não tem ação sobre o desafio intestinal, dando confiabilidade aos resultados do estudo.

**Tabela 1-** Dieta controle formulada para as fases pré-experimental (Pré-inicial 1 sem prebiótico) e experimental Pré-inicial 1 ( dia 0 ao dia 4) e Pré-inicial 2 (dia 5 a 11).

<b>Descrição</b>	<b>Pré-inicial 1</b>	<b>Pré-inicial 2</b>
Milho 7,88%	42,284	56,916
Soja integral micronizada	20,356	9,012
Farelo de soja. 45%	14,000	18,000
Plasma AP920	5,000	3,000
Leite Prius L70	14,286	7,143
Óleo de soja		1,426
Premix	0,500	0,500
Fosfato bicálcico	1,039	1,195
Calcário calcítico	1,010	0,952
Sal comum	0,445	0,549
Óxido de zinco	0,278	0,209
Lisina-HCL	0,291	0,473
DL-Metionina	0,149	0,174
Treonina	0,062	0,118
Triptofano		0,013
Valina		0,019
Caulim	0,300	0,300
<b>Níveis nutricionais</b>	<b>Pré-inicial 1</b>	<b>Pré-inicial 2</b>
Energia Metabolizável Suínos	3490,172	3400,000
Gordura	6,614	5,979
Proteína bruta (PB)	23,417	19,869
Lisina	1,655	1,481
Metionina	0,435	0,431
Met + Cis	0,933	0,828
Treonina	1,047	0,924

Triptofano	0,303	0,257
Lisina digestível	1,500	1,350
Metionina digestível	0,430	0,420
Metionina + cistina digestível	0,820	0,740
Treonina digestível	0,880	0,790
Triptofano digestível	0,252	0,220
Arginina digestível	1,414	1,165
Valina digestível	1,021	0,860
Isoleucina digestível	0,854	0,709
Leucina digestível	1,775	1,546
Histidina digestível	0,594	0,493
Fenilalanina digestível	1,010	0,852
Fenilalanina + tirosina digestível	1,380	1,250
Amido	29,592	38,496
Fibra Bruta (FB)	1,765	2,070
Lactose	10,000	5,000
Cálcio total	0,850	0,800
Fósforo Total	0,665	0,611
Fósforo disponível	0,450	0,400
Sódio	0,400	0,350
Cobre	6,080	5,504
Zinco	2024,947	1529,097

## 2.8 Coleta de dados de desempenho

Os animais foram pesados no dia 0 de experimento, no dia 4 (antes da inoculação); e no dia 11 (antes do abate), para verificação de ganho de peso diário (GPD). As sobras foram pesadas e avaliadas duas vezes ao dia, para cálculo do consumo de ração diário (CRD) e da conversão alimentar (CA).

## 2.9 Abate

Os 20 animais foram abatidos em um frigorífico comercial no município de Lavras, MG e seguiu as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com realização de eletronarcolese para insensibilização dos leitões, seguida de exsanguinação.

## 2.10 Microbiologia

Para análise microbiológica foi utilizado amostras do conteúdo cecal ao abate, para realizar cultura em meio seletivo específico para *E. coli* e *Lactobacillus* spp. A análise foi realizada no laboratório de microbiologia do DZO-UFLA. As amostras coletadas foram homogeneizadas e retiradas 1 grama para o teste. Em seguida, foram adicionados 9 ml de PBS estéril (solução tampão fosfato). Diluições seriadas (1:10) foram preparadas em PBS e as amostras diluídas foram semeadas em meio Rogosa (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas em aerobiose a 37 ° C por 24 h para contagem de *Lactobacillus* spp., e no meio

BSM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubado em anaerobiose a 37 ° C por 24 h para contagens de *E. coli* de acordo com os métodos descritos por Huang et al. (2004).

As contagens das colônias (UFC/g) foram submetidas à transformação logarítmica (log10) antes da análise estatística.

### **2.11 Ácidos graxos voláteis**

A análise dos ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico) foi realizada em amostras de conteúdo cecal, coletadas após abate. Em cada amostra de 2 g do conteúdo foram adicionados 4 mL de ácido fórmico (17%) para extrair e conservar os ácidos graxos. Foi realizada centrifugação a 2500 rpm e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C até a realização da análise por cromatografia gasosa, seguindo a metodologia descrita por Playne (1985).

### **2.12 Morfometria intestinal**

Amostras de jejuno foram coletadas para análise morfológica. Essas amostras tinham 5 cm de extensão e foram colhidas em segmento 2 m posterior ao esfíncter pilórico. Após cuidadosa remoção do conteúdo e lavagem com solução salina, as amostras foram fixadas em formol 10% por 24 horas, transferidas para solução de álcool 70°, submetidas ao processamento de rotina para histologia, emblocadas em parafina, seccionadas a 4µm e coradas com hematoxilina e eosina, (Luna, 1968). Imagens foram capturadas em microscópio trinocular (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, SP) com câmera de captura de imagens digitais (SC30, Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, SP). A altura das vilosidades e a profundidade das criptas foram medidas através do programa AxionVision SE64 4.9.1, utilizando 10 vilosidades e criptas bem orientadas. A relação vilo:cripta foi calculada. Essas análises foram realizadas por uma única pessoa.

### **2.13 Coleta e processamento de amostras para histologia e imuno-histoquímica**

No frigorífico foram também coletadas amostras de íleo, tonsila, linfonodo mesentérico e baço em formol a 10% tamponado, para análise histológica e imuno-histoquímica.

Após 24 h de fixação as amostras foram clivadas em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de espessura, acondicionadas em cassetes histológicos, processadas para histologia e emblocados em parafina. Todo o processo de coleta até o emblocamento foi realizado em menos de 48 horas. Após isso foram cortados fragmentos de 4µm de tecido para confecção das lâminas, que foram coradas em hematoxilina e eosina.



### 2.13.1 Histologia

As lâminas foram avaliadas na histologia para verificação da presença ou ausência de *E. coli*, principalmente na mucosa dos órgãos gastrointestinais, além de possíveis lesões causadas pela bactéria. Nestas lâminas foram realizadas medições do diâmetro dos folículos linfoides de baço, linfonodo mesentérico, tonsila e íleo cólon utilizando o programa computacional Image-Pro Express, nos quais foram medidas as distâncias verticais (D1) e distâncias horizontais (D2) dos folículos, pegando as maiores distâncias visuais entre uma extremidade e outra, de forma perpendicular entre D1 e D2, fazendo uma média destes dois resultados para obter valores de diâmetro médio para comparação entre os tratamentos. Os órgãos com menos de três folículos linfoides tiveram todos seus folículos mensurados e os órgãos que tinham mais de três folículos linfoides tiveram três folículos linfoides escolhidos aleatoriamente e mensurados. Após isso, realizou-se uma média simples das distâncias dos folículos mensurados, para comparar o tamanho dos folículos entre os órgãos e os tratamentos.

### 2.13.2 Imuno-histoquímica anti-PCNA

Esta técnica foi realizada pela marcação de molécula específica que indica atividade celular de antígenos nucleares de células em proliferação. A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular englobando uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada. O início do ciclo celular é controlado por diversos estímulos como liberação de hormônios, resposta do sistema imunológico, fatores nutricionais e de crescimento, que induzem a proliferação celular através da ligação com receptores específicos que emitem um sinal de transdução para a célula (ARISAWA *et al.*, 1999).

A técnica de imuno-histoquímica anti-PCNA (Anexo 1) foi aplicada em amostras de baço, linfonodo mesentérico, tonsila e íleo. Para recuperação antigênica foi utilizado o tampão citrato pH 6,0 aquecido em micro-ondas por 6 minutos, para bloqueio das reações inespecíficas utilizou-se leite em pó desnatado Molico, diluído à 5% em PBS. O anticorpo monoclonal anti-PCNA Dako foi diluído em PBS. As lâminas com anticorpo primário foram incubadas em uma câmara úmida durante 12 h (*overnight*) a 4°C. O anticorpo secundário utilizado foi o Envision, durante 1 h e o cromógeno utilizado foi o 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

Após este processo foi utilizado o programa computacional Image-Pro Express para captura de imagens. Para cada órgão foram obtidas imagens de três folículos linfoides aleatórios e três campos diferentes de imagem para cada folículo. As células marcadas pelo anticorpo anti-PCNA foram contadas manualmente e somadas, realizando-se uma média

simples do número de células dos folículos linfóides de cada órgão, com intuito de comparar a proliferação das células entre os órgãos pesquisados e entre os tratamentos. Esta comparação teve como finalidade identificar diferenças estatísticas quantitativas entre os tratamentos, visto que poucos estudos mostrando estas alterações a nível histológico.

#### **2.14 Análises estatísticas:**

Os dados foram analisados de forma inteiramente casualizada, considerando a baía como unidade experimental para as todas as variáveis estudadas. As análises foram realizadas usando o PROC MIXED do pacote estatístico SAS (SAS Inst.Inc., Cary, NC). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e, quando estes não apresentaram essa distribuição, foi realizada a transformação usando PROC RANK (SAS INSTITUTE INC, 2009). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância. Quando houve diferença estatística pelo teste F ( $F < 0,05$ ), foi adotado o teste de Tukey para comparação das médias, considerando diferença significativa o P-valor  $< 0,05$  e tendência  $0,05 \leq \text{P-valor} < 0,10$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Microbiologia

Os resultados do cultivo microbiológico estão apresentados na Tabela 2, na qual houve diferença significativa para o p-valor de inóculo de *E. coli* K88+ enterotoxigênica, em que se observa maior quantidade de colônias bacterianas em DC+INO e MOS+INO comparado aos tratamentos sem inoculação.

Não foi possível contar a quantidade de colônias bacterianas de *Lactobacillus* spp. nos quatro tratamentos devido a grande quantidade de colônias proliferadas nas placas durante o cultivo.

**Tabela 2-** Cultivo bacteriano dos tratamentos DC+INO, DC-INO, MOS+INO e MOS-INO.

Variável	Tratamento				CV, %	P-valor		
	DC+INO	DC-INO	MOS+INO	MOS-INO		Trat	Inóculo	Trat*Inóculo
Coli	5,155	4,2625	5,155	4,550	13,740	0,510	0,020	0,613

DC+INO - dieta controle e com desafio sanitário; DC-INO - dieta controle e sem desafio sanitário; MOS+INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de leveduras (MOS) e com desafio sanitário; MOS-INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS) e sem desafio sanitário; CV- Coeficiente de Variação; Trat- Tratamento com a inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS); Inoculo- Inoculado com *E. coli* enterotoxigênica K88+; Trat\*Inoculo- Interação entre os tratados com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura(MOS) e inoculados com *E. coli* K88+ enterotoxigênica.

#### 3.2 Ácidos graxos voláteis

Os dados do AGV estão demonstrados na Tabela 3.

Assim como nos resultados microbiológicos, houve diferença significativa para o inóculo, em que o desafio com *E. coli* K88+ enterotoxigênica aumentou os níveis de AGV para as variáveis respostas analisadas nos tratamentos DC+INO e MOS+INO em relação aos tratamentos DC-INO e MOS-INO.

**Tabela 3-** Ácidos graxos voláteis dos tratamentos DC+INO, DC-INO, MOS+INO e MOS-INO.

Variável	Tratamento				CV, %	P-valor		
	DC+INO	DC-INO	MOS+INO	MOS-INO		Trat	Inóculo	Trat*Inóculo
Ácido Acético	1047,850	430,781	978,146	426,315	61,902	0,906	0,002	0,928
Ácido Propiônico	610,445	201,553	688,023	250,713	72,618	0,550	0,001	0,893
Ácido Butírico	268,629	127,994	270,421	106,225	63,309	0,841	0,006	0,803
Total	1926,920	760,328	1793,930	783,252	62,072	0,927	0,002	0,865

DC+INO - dieta controle e com desafio sanitário; DC-INO - dieta controle e sem desafio sanitário; MOS+INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de leveduras (MOS) e com desafio sanitário; MOS-INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS) e sem desafio sanitário; CV- Coeficiente de Variação; Trat- Tratamento com a inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS); Inoculo- Inoculado com *E. coli* enterotoxigênica K88+; Trat\*Inoculo- Interação entre os tratados com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura(MOS) e inoculados com *E. coli* K88+ enterotoxigênica.

### 3.3 Morfometria intestinal

Não houve diferença significativa para nenhum dos valores de p, entretanto observa-se uma tendência ( $0,05 \leq P\text{-valor} < 0,1$ ) de resposta entre os tratamentos com MOS e com DC, em que MOS+INO e MOS-INO apresentaram os maiores valores para variável resposta de vilosidade.

**Tabela 4-** Morfologia intestinal do jejuno dos tratamentos DC+INO, DC-INO, MOS+INO e MOS-INO.

Variável	Tratamento				CV, %	P-valor		
	DC+INO	DC-INO	MOS+INO	MOS-INO		Trat	Inóculo	Trat*Inóculo
<b>Vilosidade</b>	342,504	429,828	469,270	446,737	23,476	0,088	0,645	0,256
<b>Cripta</b>	324,034	330,325	341,070	334,567	9,175	0,481	0,658	0,733
<b>Relação</b>	1,090	1,306	1,413	1,370	24,083	0,177	0,752	0,433

DC+INO - dieta controle e com desafio sanitário; DC-INO - dieta controle e sem desafio sanitário; MOS+INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de leveduras (MOS) e com desafio sanitário; MOS-INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS) e sem desafio sanitário; CV- Coeficiente de Variação; Trat- Tratamento com a inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS); Inoculo- Inoculado com *E. coli* K88+ enterotoxigênica; Trat\*Inoculo- Interação entre os tratados com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS) e inoculados com *E. coli* K88+ enterotoxigênica. \*Médias na linha, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com  $P < 0,05$ .

### 3.4 Imuno-histoquímica

Os resultados da análise imuno-histoquímica anti-PCNA estão detalhados na Tabela 5.

O íleo e o linfonodo mesentérico apresentaram diferença significativa para o p-valor de interação. No íleo (Figura 1), os tratamentos MOS+INO e MOS-INO tiveram maior quantidade de células em proliferação do que o DC-INO e não houve diferença significativa do DC+INO em relação aos tratamentos anteriores.

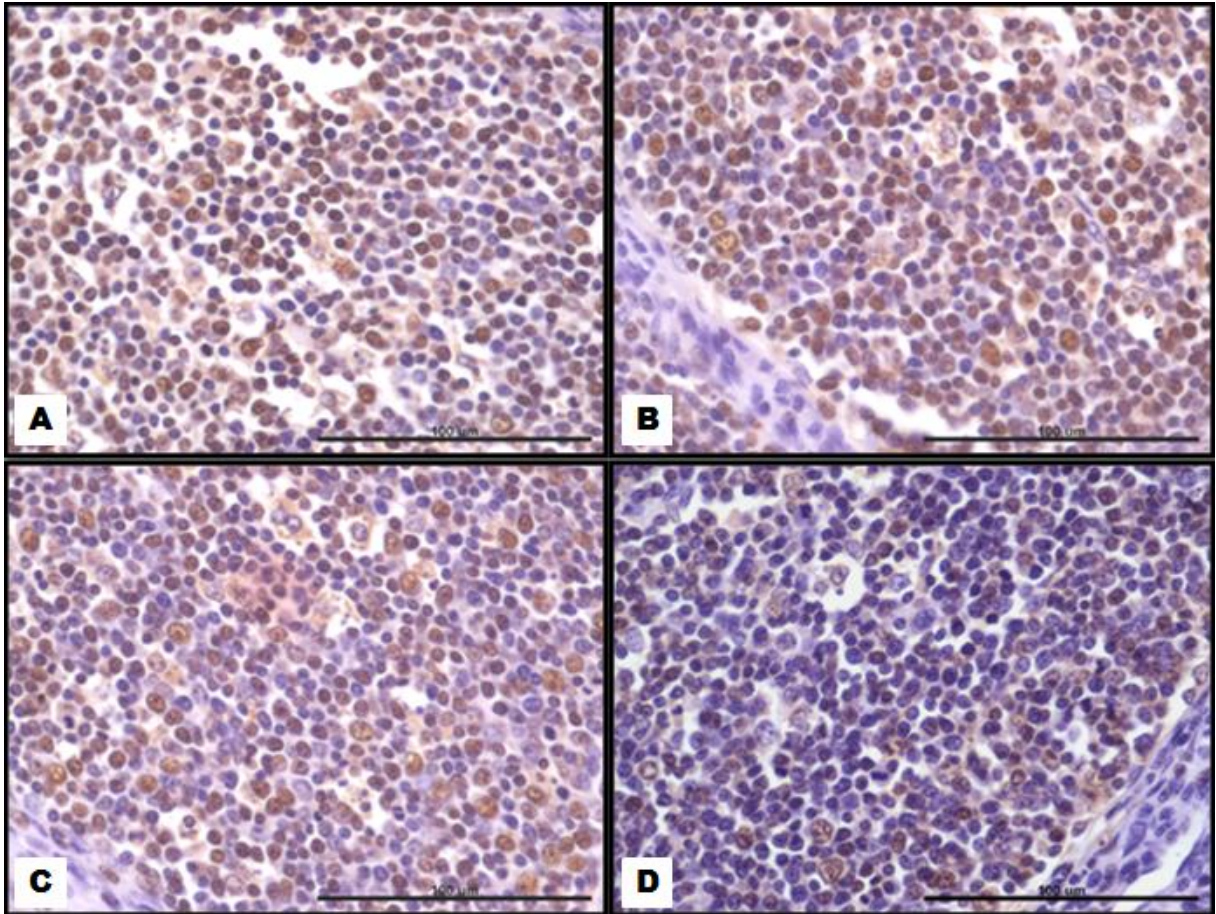
Na análise do linfonodo mesentérico (Figura 2) houve diferença significativa para os tratamentos DC-INO e MOS-INO, nos quais se encontrou menor e maior quantidade de células em proliferação, respectivamente. Os tratamentos com MOS são estatisticamente iguais, assim como os tratamentos com DC entre si.

**Tabela 5-** Imuno-histoquímica anti-PCNA de folículos linfoides de tecidos linfoides dos tratamentos DC+INO, DC-INO, MOS+INO e MOS-INO.

Variável	Tratamentos				CV, %	P-valor		
	DC+INO	DC-INO	MOS+INO	MOS-INO		Trat	Inoculo	Trat*Inoculo
<b>Baço</b>	305,831	137,435	335,417	360,382	49,908	0,032	0,216	0,190
<b>Íleo</b>	565,280 ab	275,720 b	637,160 a	709,706 a	36,109	0,001	0,111	0,042
<b>Linfonodo</b>	315,540 bc	167,193 c	407,763 ab	519,037 a	42,605	<.0001	0,678	0,033
<b>Tonsila</b>	439,232	426,167	489,983	645,103	24,069	0,008	0,135	0,168

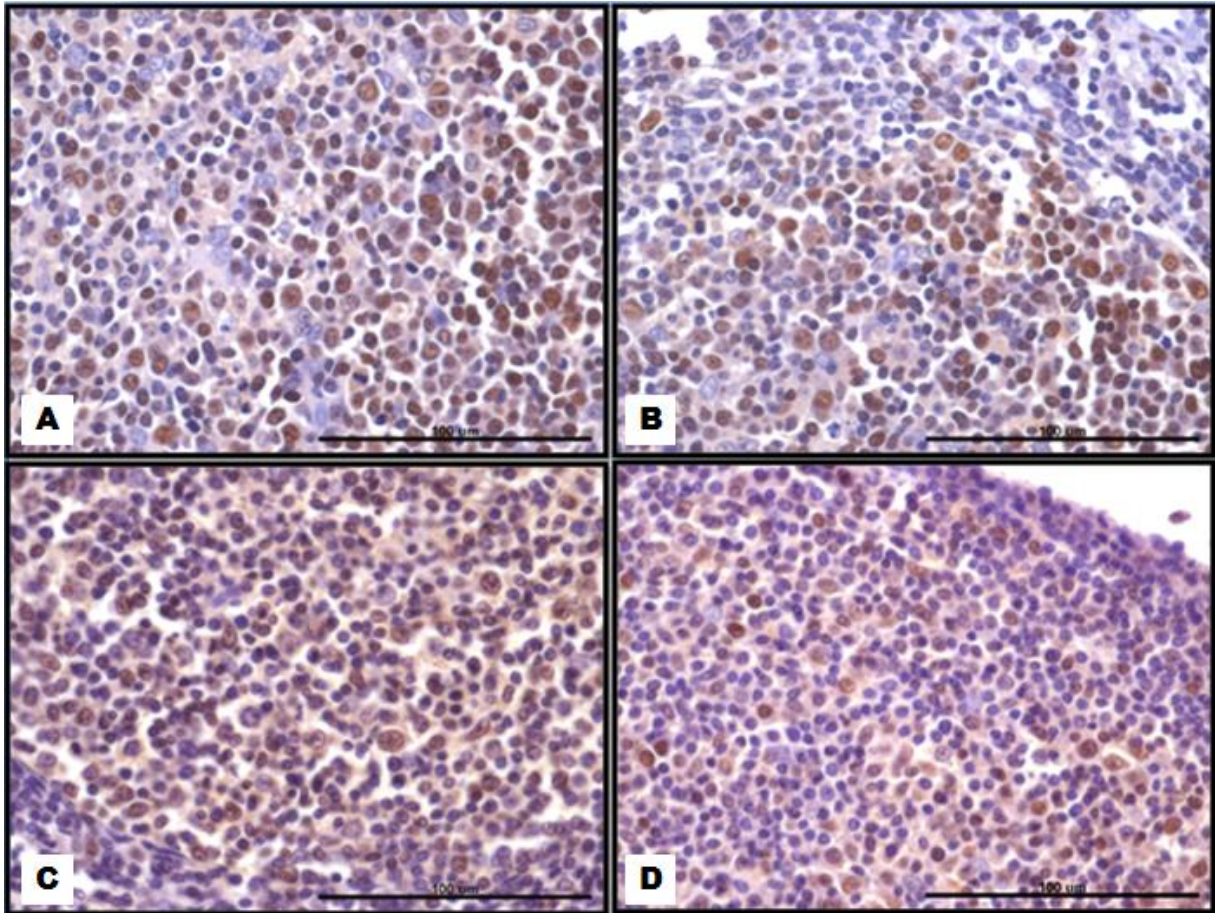
DC+INO - dieta controle e com desafio sanitário; DC-INO - dieta controle e sem desafio sanitário; MOS+INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de leveduras (MOS) e com desafio sanitário; MOS-INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS) e sem desafio sanitário; CV- Coeficiente de Variação; Trat- Tratamento com a inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS); Inoculo- Inoculado com *E. coli* enterotoxigênica K88+; Trat\*Inoculo- Interação entre os tratados com inclusão de 0,1% de parede

celular de levedura(MOS) e inoculados com *E. coli* K88+ enterotoxigênica. \*Médias na linha, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com  $P < 0,05$ .



**Figura 1-** Suíno, íleo. A) Tratamento MOS+INO; B) Tratamento MOS-INO; C) Tratamento DC+INO; D) Tratamento DC-INO. Evidenciando células em proliferação na imunomarcação anti-PCNA, anticorpo secundário Envision, cromógeno DAB, obj. 40x.





**Figura 2-** Suíno, linfonodo mesentérico. A) Tratamento DC+INO; B) Tratamento DC-INO; C) Tratamento MOS-INO; D) Tratamento MOS+INO. Evidenciando células em proliferação na imunomarcção anti-PCNA, anticorpo secundário Envision, cromógeno DAB, obj. 40x.

### 3.5 Histologia

Nas análises histológicas da superfície mucosa dos intestinos para averiguar a presença de *E. coli*, não foram observadas bactérias aderidas à mucosa. Também não foram observadas quaisquer lesões microscópicas decorrentes da inoculação de *E. coli* K88+ enterotoxigênica.

Os resultados das mensurações do diâmetro dos folículos linfoides dos tecidos linfoides estão apresentados na Tabela 6.

Na tonsila (Figura 3) houve interação significativa (P-valor <0,05) entre os tratamentos, o que não ocorreu em outros órgãos analisados. Foi observado que o diâmetro dos folículos linfoides foi estatisticamente igual entre os tratamentos DC-INO e MOS+INO. Ainda, DC+INO teve menor diâmetro de folículos linfoides do que os outros dois tratamentos, enquanto o MOS-INO não apresentou diferença em relação aos outros três tratamentos, sendo estatisticamente igual.

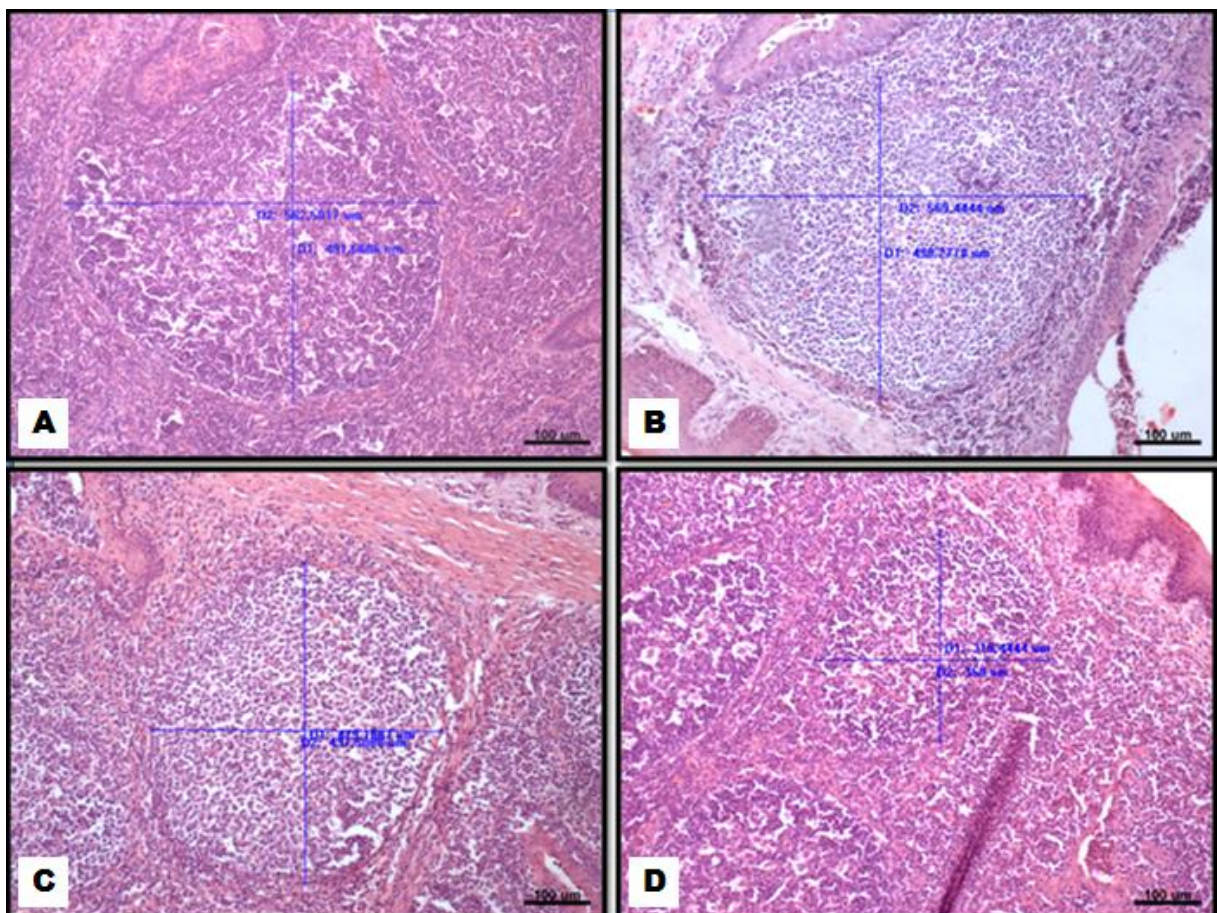


No linfonodo mesentérico houve uma tendência dos resultados, sugerindo que os tratamentos MOS+INO e MOS-INO também tiveram maior diâmetro de folículos linfoides do que os tratamentos DC+INO e DC-INO.

**Tabela 6-** Diâmetro médio dos folículos linfoides dos tecidos linfoides dos tratamentos DC+INO, DC-INO, MOS+INO e MOS-INO.

Variável	Tratamento				CV, %	P-valor		
	DC+INO	DC-INO	MOS+INO	MOS-INO		Trat	Inóculo	Trat*Inóculo
<b>Tonsila</b>	286,560 b	375,000 a	442,330 a	359,220 ab	22,478	0,030	0,928	0,010
<b>Linfonodo</b>	318,550	301,000	318,930	393,300	17,884	0,069	0,248	0,071
<b>Íleo</b>	1076,420	834,190	1087,320	1171,680	10,066	0,217	0,839	0,197
<b>Baço</b>	218,206	202,394	234,229	250,162	18,457	0,125	0,959	0,421

DC+INO - dieta controle e com desafio sanitário; DC-INO - dieta controle e sem desafio sanitário; MOS+INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de leveduras (MOS) e com desafio sanitário; MOS-INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS) e sem desafio sanitário; CV- Coeficiente de Variação; Trat- Tratamento com a inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS); Inoculo- Inoculado com *E. coli* enterotoxigênica K88+; Trat\*Inoculo- Interação entre os tratados com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura(MOS) e inoculados com *E. coli* K88+ enterotoxigênica. \*Médias na linha, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com  $P < 0,05$ .



**Figura 3-** Suíno, tonsila. A) Tratamento DC-INO; B) Tratamento MOS+INO; C) Tratamento MOS-INO; D) Tratamento DC+INO. Medição de diâmetro de folículo linfoide. HE, obj. 10x.

### 3.6 Desempenho

Na Tabela 7 estão os resultados do peso final (PF), ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), consumo de ração total (CRT), consumo de ração médio diário (CRMD) e conversão alimentar (CA).

As análises das variáveis citadas foram realizadas em dois períodos; início do tratamento até a inoculação (dia 0 ao dia 4); e do início do tratamento até o dia de abate, (dia 0 ao dia 11) do experimento. Observou-se que no primeiro período não houve diferença significativa para nenhum p-valor, já no segundo período, correspondente a toda fase experimental, houve diferença significativa para todas as análises, exceto a CA, em que ocorreu tendência.

Do dia 0 ao dia 11, as variáveis PF, GP e GPD apresentaram os mesmos resultados, havendo diferença significativa para o p-valor de interação, em que o tratamento DC+INO resultou em menores valores, enquanto o MOS+INO obteve o maior ganho. Além disso, os resultados foram estatisticamente iguais aos tratamentos em que os animais não foram desafiados (DC-INO e MOS-INO).

O CRT e o CRMD apresentaram os mesmos resultados, mostrando que o consumo de ração, no geral, foi maior em DC-INO e menor em DC+INO. Os dados de MOS+INO e MOS-INO foram estatisticamente iguais aos primeiros já citados.

Por fim, há uma tendência dos valores da CA em que se pode aferir, numericamente, que o MOS+INO foi o que apresentou menor valor.

**Tabela 7-** Peso final (PF), ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), consumo de ração total (CRT), consumo de ração médio diário (CRMD) e conversão alimentar (CA) dos tratamentos DC+INO, DC-INO, MOS+INO e MOS-INO.

Variável	Tratamento				CV, %	P valor		
	DC+INO	DC-INO	MOS+INO	MOS-INO		Trat	Inoculo	Trat*Inoculo
<b>Peso inicial</b>	7,568	7,571	7,639	7,463	8,844	0,950	0,940	0,940
<b>0 a 4 dias</b>								
<b>PF, kg</b>	7,881	8,079	8,286	7,993	7,704	0,243	0,777	0,108
<b>GP, kg</b>	0,313	0,508	0,647	0,558	51,860	0,142	0,472	0,243
<b>GPD, kg</b>	0,078	0,127	0,162	0,139	51,860	0,142	0,472	0,243
<b>CRT, kg</b>	0,703	0,878	0,785	0,852	13,102	0,664	0,134	0,398
<b>CRMD, kg</b>	0,176	0,220	0,196	0,213	13,115	0,941	0,308	0,584
<b>CA</b>	1,809	1,824	1,198	1,786	42,238	0,386	0,521	0,440
<b>0 a 11 dias</b>								
<b>PF, kg</b>	9,475 b	10,322 ab	10,968 a	10,385 ab	12,053	0,007	0,002	0,002
<b>GP, kg</b>	1,977 b	2,824 ab	3,470 a	2,887 ab	29,644	0,017	0,347	0,020
<b>GPD, kg</b>	0,179 b	0,256 ab	0,315 a	0,262 ab	29,646	0,017	0,350	0,020



<b>CRT, kg</b>	2,813 b	4,970 a	3,832 ab	4,197 ab	22,061	0,659	0,014	0,047
<b>CRMD, kg</b>	0,255 b	0,452 a	0,348 ab	0,381 ab	22,054	0,664	0,014	0,046
<b>CA</b>	1,597	1,634	1,135	1,537	18,642	0,017	0,032	0,082

DC+INO - dieta controle e com desafio sanitário; DC-INO - dieta controle e sem desafio sanitário; MOS+INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de leveduras (MOS) e com desafio sanitário; MOS-INO - dieta com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS) e sem desafio sanitário; EPM- Erro Padrão da Média; CV- Coeficiente de Variação; Trat- Tratamento com a inclusão de 0,1% de parede celular de levedura (MOS); Inoculo- Inoculado com *E. coli* enterotoxigênica K88+; Trat\*Inoculo- Interação entre os tratados com inclusão de 0,1% de parede celular de levedura(MOS) e inoculados com *E. coli* K88+ enterotoxigênica; PF- Peso final; GP- Ganho de peso; GPD- Ganho de peso diário; CRT- Consumo de ração total; CRMD- Consumo de ração médio diário; CA- Conversão alimentar. \*Médias na linha, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com  $P < 0,05$ .

#### 4 DISCUSSÃO

Independente da inoculação experimental de *E. coli* K88+ enterotoxigênica, houve crescimento de *E. coli* em todos tratamentos, o que comprova a presença de variáveis cepas dessa bactéria no TGI dos leitões, que pode ocorrer logo no nascimento, no canal vaginal da fêmea. Nos tratamentos DC+INO e MOS+INO, a análise microbiológica resultou na maior contagem de *E. coli*, com diferença significativa para os animais inoculados, mostrando que a inoculação experimental foi eficiente. Estudos realizados por Menin et al. (2008) em Santa Catarina, mostraram que na necropsia de 330 leitões com diarreia na fase de creche, 177 (59%) animais tiveram análise microbiológica com crescimento de *E. coli* enterotoxigênica, número semelhante ao encontrado por Almeida et al. (2007), em que a cepa K88+ era a mais frequente. Isto demonstra que a bactéria utilizada como desafio sanitário para os animais deste estudo é uma das causas mais comuns na doença entérica em animais na fase de creche.

Estudos usando infecções experimentais em animais de produção são importantes para constatação de como o organismo dos animais reage frente a desafios sanitários, que ocorrem comumente nas granjas de criação. Baurhoo (2007), ao trabalhar com frangos de corte jovens, inoculou 1ml de *E. coli* enterotoxigênica via oral, na concentração de  $1 \times 10^7$  UFC/mL em todas as aves. Esses animais receberam tratamentos com dieta controle, dieta com inclusão de 0,2% de MOS, além de dieta com a utilização de antibiótico (virginiamicina) e com inclusão de lignina. O autor observou que, independente da dieta, *E. coli* foi detectada na análise do conteúdo cecal de todos os animais, com maior quantidade de colônias bacterianas na dieta controle e estatisticamente menor quantidade nos tratamentos com MOS e antibiótico, sendo estes últimos estatisticamente iguais entre si.

Isso indica a importância do uso de aditivos na criação de animais de produção. Além disso, este estudo mostra a semelhança da eficiência do uso de antibiótico e prebiótico, sendo este último um bom substituto para os antimicrobianos, que foram e ainda são utilizados na suinocultura e que contribuem para a ocorrência de resistência bacteriana a estes compostos. Além disso, alguns países embargam a comercialização de produtos advindos de locais sem certificado de alimentos livres de resíduos químicos, já que estes não são totalmente metabolizados pelo organismo quando utilizados, podendo haver acúmulo de moléculas na carne produzida.

Ainda no trabalho de Baurhoo (2007), *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* cresceram em maior quantidade no tratamento com MOS e em menor quantidade no tratamento com antibiótico, mostrando que este pode prejudicar o crescimento de bactérias benéficas, podendo

ser um fator limitante para a utilização de antimicrobianos na fase de creche. No presente estudo, essas bactérias foram incontáveis pelo seu grande crescimento em todos os tratamentos. Isto indica a ação benéfica que a microbiota natural exerce na saúde intestinal, independente do desafio sanitário e do tratamento administrado neste experimento.

Além da maior quantidade de coliformes nos experimentos com inoculação, a verificação da eficiência da infecção experimental realizada pode ser confirmada por meio da medição de AGV, em que o P-valor para o inóculo foi significativo nos tratamentos DC+INO e MOS+INO, que tiveram maiores níveis de AGV, tanto para ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, comparados aos não inoculados. Isto indica que a maior proliferação de *E. coli* nos animais dos tratamentos com inoculação pode ter gerado disbiose intestinal, causando danos na mucosa, como visto nos trabalhos citados na revisão de Tran et al. (2016) e/ou mesmo a inclusão do MOS, substrato para bactérias naturais benéficas, também pode ter contribuído com o aumento dos metabólitos destas bactérias, como o AGV.

Segundo Barroso (2011), disbiose é um desequilíbrio na microbiota, que ocorre devido a fatores de estresse, jejum hídrico e alimentar e também infecções virais e bacterianas, que alteram a população intestinal natural. Neste caso, a microbiota patogênica pode gerar alterações intestinais decorrentes de vários mecanismos, como a agregação de bactérias na superfície intestinal, alterações e até rompimento da estrutura celular, com diminuição da superfície de absorção, gerando maior velocidade de passagem de substrato até o intestino grosso. Isso aumenta a fermentação de conteúdo alimentar no ceco dos leitões, em que bactérias intestinais estão presentes em maior quantidade, com consequente aumento dos valores de AGV produzidos (TRAN et al., 2016; ZANELLA et al., 2016).

Mesmo com a acidificação do meio intestinal pelo aumento de AGV, desfavorável para a proliferação de patógenos, os tratamentos inoculados ainda apresentaram maior quantidade de microbiota patogênica, pois o aumento de AGV foi uma consequência da disbiose, como proposto por Vondruskova et al. (2010), Roodposhti & Dabiri (2012), Attia (2013), Oso et al. (2015) e Kritas et al. (2018) e verificado nos resultados presentes neste trabalho.

Neste estudo não houve diferença significativa de inóculo para os resultados de morfologia intestinal do jejuno. Mas em relação aos grupos tratados, houve tendência estatística ( $0,05 \leq P\text{-valor} < 0,1$ ), em que os animais que receberam MOS, independente da inoculação de *E. coli* K88+ enterotoxigênica, tiveram maiores tamanhos de vilosidades do que os leitões que receberam DC. Isso mostra os variados mecanismos de ação dos MOS como

substrato seletivo para microbiota benéfica, estimulando sua proliferação e protegendo a mucosa intestinal, ação de ligação aos receptores dos enterócitos, além de competir com os patógenos e minimizar a aderência de *E. coli* nas células através da aglutinação competitiva por ligações de alta afinidade. , Assim é mantida a integridade das vilosidades intestinais, além de induzir hiperplasia celular, com aumento da área de absorção, do tamanho das vilosidades e, conseqüentemente, melhor desempenho dos animais.

Os resultados semelhantes foram encontrados por Attia et al. (2013) em coelhos machos jovens (35 a 91 dias de idade), em que a inclusão de 35mg/kg de MOS na dieta levou ao aumento do tamanho das vilosidade intestinais, principalmente quando associado a inulina, composto vegetal de ação também prebiótica. Neste trabalho constatou-se que o MOS também foi capaz de induzir hiperplasia da polpa branca do baço, além de gerar linfopoiese, com aumento da resposta imune celular. Outros trabalhos citados por este pesquisador descrevem ainda a proliferação de células da imunidade inata, como neutrófilos e macrófagos. Carbone e Faggio (2016) através de testes em peixes, animais com resposta adaptativa limitada, observaram, pelas medições de anticorpos, principalmente imunoglobulinas G (IgG) e A (IgA), no sangue, que houve expansão clonal com recrutamento de linfócitos e da imunidade humoral Oso et al. (2015) também observaram aumento de células do sistema imune celular em pintinhos suplementados com 1g/kg de MOS.

Na marcação anti-PCNA a proliferação do tecido linfoide do íleo e do linfonodo mesentérico apresentou diferença significativa para o p-valor de interação. Estes resultados eram esperados nestes órgãos devido à proximidade deles com a área de ação do MOS.

A proliferação celular nos folículos linfoides do íleo foi maior nos dois tratamentos com MOS. Em relação ao linfonodo o tratamento MOS-INO teve maior quantidade de células em proliferação, mas foi estatisticamente igual ao MOS+INO, mostrando a ação imunomoduladora deste prebiótico no TGI, capaz de se ligar aos enterócitos e possibilidade de interagir com células imunes, por meio de receptores de manose de glicoproteínas de superfície de algumas dessas células, de forma a atuar como um “antígeno não-patogênico”, que desencadeia reações moleculares que levam a secreção de citocinas, mobilizando e ativando outras células de defesa, com ação pró-inflamatória ou anti-inflamatória na resposta imunológica (BUDIÑO et al., 2006; DUTRA, 2011; BLATCHFORD, et al., 2013; TRAN et al, 2016).

O MOS consegue atuar indiretamente sobre o sistema imune, em que a microbiota nativa benéfica tem capacidade de produzir substâncias imunoestimulantes, que desencadeiam

várias reações, como a proliferação de macrófagos e linfócitos, produção de citocinas diversas e até a indução de síntese de imunoglobulinas, principalmente IgA, que estão mais presentes em região de mucosa (KRITAS, 2018).

Isso confirma a atuação do MOS sobre a imunidade celular, que prepara previamente o organismo pelo recrutamento de células de defesa, impede uma resposta exacerbada frente a infecções, visto que o MOS minimiza a colonização por bactérias patogênicas e, assim, a apresentação de antígenos ao sistema imune, como discutido por Gouveia et al. (2012), o que resultaria em maior gasto energético pelo organismo dos leitões para debelar a infecção. Nos dois órgãos citados, a menor quantidade de células marcadas pela IHQ foi do tratamento DC-INO, evidenciando o repouso do sistema imune quando o organismo não é estimulado.

Os resultados da histologia foram significativos apenas para tonsila, e mostraram que, frente ao desafio sanitário, os animais que receberam MOS responderam da mesma maneira que os não inoculados e que não há diferença do uso do aditivo quando os animais não são desafiados. Além disso, *E. coli* K88+ enterotoxigênica influenciou no tratamento com dieta basal, tratamento no qual houve o menor diâmetro dos folículos linfoides, devido a impossibilidade da resposta das células de defesa, que não conseguem ser ativadas devido a fatores de virulência, por meio de proteínas bacterianas que impedem a expressão antigênica,. Isso bloqueia a apresentação de antígeno e a secreção de citocinas, as quais, conseqüentemente, inibem a proliferação e diferenciação celular, fazendo com que ocorra uma modulação negativa da resposta imune inata e celular do hospedeiro (STELLA, 2009, TRAN et al., 2016; ZANELLA et al., 2016; KRITAS, 2018).

Na a análise histologia do linfonodo não houve diferença significativa entre os resultados de interação, mas houve uma tendência, em que se pode observar numericamente que os animais que tiveram inclusão de MOS na dieta tiveram maiores diâmetros de folículos linfoides, comparados aos tratamentos com dieta basal, independente da presença ou ausência de desafio sanitário.

Em relação à análise de desempenho dos animais, o tratamento MOS+INO apresentou os maiores ganhos de PF, GP e GPD ao final do experimento, mesmo com o CRT e o CRMD não representando os maiores valores de consumo neste tratamento e ainda menor CA, o que gerou os melhores resultados finais, comprovando a eficiência do MOS frente a desafio sanitário através da estimulação da microbiota benéfica, da ação competitiva pelos sítios de ligação nos enterócitos e da aglutinação e expulsão de patógenos da mucosa intestinal, além de seu efeito imunomodulador já discutido (DUTRA, 2011; BLATCHFORD, et al., 2013;

TRAN et al, 2016). Oso et al. (2015) ao adicionarem 1g/kg de MOS na dieta de pintinhos dos 7 aos 56 dias de idade, também constataram os mesmos resultados, , mostrando que o MOS melhora o desempenho não só dos suínos, mas também de outras espécies.

Ainda em relação a essas variáveis, os animais do tratamento DC+INO apresentaram os menores valores de PF, GP, GPD, CRT e CRMD, indicando que a inoculação experimental sem o uso do prebiótico afetou enormemente os animais, devido à ação de *E. coli* sobre a saúde intestinal, com alteração da estrutura celular, lesão dos enterócitos, diminuição da superfície de absorção, como mostrado por Zanella et al. (2016), e também pela perda de água e eletrólitos, devida à quebra das junções oclusivas das células da mucosa, que levam a quadros de subnutrição e desidratação, além de menor ingestão de ração devida a apatia e anorexia decorrentes da infecção, com resultante queda no desempenho dos leitões (BUDIÑO et al., 2006; TRAN et al., 2016).

O aumento das vilosidades intestinais atribuída à ação do MOS, que estimula as bactérias benéficas e protege a mucosa, também contribui para o desempenho, já que os animais conseguem absorver os nutrientes de forma mais eficiente, resultando na menor CA. Attia (2013), em seus estudos com coelhos, concluiu que a morfologia intestinal nem sempre tem a ver com os resultados de desempenho, já que fatores estressantes e ambientais também influenciam a saúde dos animais, mas o presente estudo mostra que os animais que tiveram os melhores resultados, tanto de morfologia intestinal, proliferação de células do sistema imune e desempenho, foram os tratados com prebióticos. Nos tratamento com MOS e inoculação de *E. coli* K88+ enterotoxigênica, o aumento dos AGV pode ter contribuído para o aumento das vilosidade intestinais, levando em conta o consumo do butirato no metabolismo dos enterócitos, com estímulo do crescimento destas células e aumento da área de absorção de nutrientes do TGI.

## **5 CONCLUSÕES**

A inclusão de MOS na concentração de 0,1% foi capaz de modular o sistema imune, principalmente frente a desafio sanitário, contribuindo com os resultados finais de desempenho. A imunomarcção anti-PCNA de células imunitárias ocorreu em maior proporção de células nos tratamentos com o prebiótico, independente do desafio sanitário, e em tecidos linfoides de íleo e linfonodo mesentérico, devido a área de atuação intestinal deste aditivo. O MOS, em nível de resposta imune celular, provavelmente atua preparando as células imunes por expansão clonal, mas impede que a reação seja exacerbada.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. S.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; MALUTA, R. P.; ÁVILA, F. A. Diarreia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Ars Veterinaria**. Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 151-157, 2007.
- ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; ROCHA, R. F.; ALMEIDA, J. D. PCNA and Ki-67 cell-cycle makers: A brief review. *Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos*. São José dos Campos, v. 2, n. 1, p. 54-60, 1999.
- ATTIA, Y. A.; EL-HANOUN, A. M.; BOVERA, F.; MONASTRA, G.; EL-TAHAWY, W. S.; HABIBA, H. I. Growth performance, carcass quality, biochemical and haematological traits and immune response of growing rabbits as affected by different growth promoters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. Italy, p. 1-12, 2013.
- BARROSO, D. C.; VIEIRA, A. A.; LIMA, C. A. R.; TRINDADE, B. S.; GOMES, A. V. C.; SOUZA, M. M. S.; CORRÊA, G. S. S. Adição da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1139-1148, 2013.
- BAUHOO B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C. A. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and escherichia coli populations after in vivo escherichia coli challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**. Quebec, Canada, 86, p. 2509–2516, 2007.
- BLATCHFORD, R.; ANSELL, J.; MEGODOY, M. R. C.; FAHEY, G.; GARDA-MAZCORRO, J. F.; GIBSON, G. R.; GOH, Y. J.; HOTCHKISS, A. T.; HUTKINS, R.; LACROIX, C.; RASTALL, R. A.; REIMER, R. A.; SCHOTENNAN, M.; VANSINDEIEN, D.; VENEMA, K.; WHELAN, K. Prebiotic mechanisms, functions and applications: A review. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**. New Zealand, v.8, n.4, p.109-132, 2013.
- BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; TUCCI, F. M.; FRAGA, A. L.; SCANDOLERA, A. J.; HUAYNATE, R. A. R.; NADAI, A.; CORREIA, R. C. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho, incidência de diarréia e contagem de coliformes totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 43, Suplemento, p. 59-67, 2006.
- CARBONE, D. & FAGGIO, C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish and Shellfish Immunology**, Italy, 2016.
- COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.
- DUTRA, D. R. Prebiótico e probiótico para leitões experimentalmente desafiados com *Escherichia coli* K88+. 2011. 94 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.



GONZALES, E.; MELLO, H. H. C. M.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG** (Universidade Federal de Goiás). v. 8, n. 13, 2012.

GOUVEIA, E. M. M. F.; SILVA, I. S.; NAKAZATO, G.; ONSELEM, V. J. V.; CORRÊA, R. A. C.; ARAUJO, F. R.; CHANG, M. R. Action of phosphorylated mannanoligosaccharides on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 499-504, 2013.

GUIMARÃES, D.; AMARAL, G.; MAIA, G.; LEMOS, M.; ITO, M.; CUSTODIO, S. Suinocultura: Estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **Agroindústria BNDES Setorial**, p. 85-136, 2017.

HALAS, D. et al. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, p. 137-147, 2009.

HUANG, C. et al. Effects of Lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. **Science**, v.17, p. 401- 409, 2004.

JUNQUEIRA, O. M.; BARBOSA, L. C. G. S.; PEREIRA, A. A.; ARAÚJO, L. F.; NETO, M. G.; PINTO, M. F. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2394-2400, 2009.

KRITAS, S. K. Probiotics and Prebiotics for the Health of Pigs and Horses. In: GIOIA, D. & BIAVAT, B. **Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety**. Switzerland: Springer International Publishing, 2018. p. 109-126.

LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed. **McGraw-Hill Press**, New York. NY, 1968.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.

OSO, A. O.; ERINLE, O. Y.; WILLIAM, G. A.; OGUNADE, A. C. Interaction effect of whole wheat feeding and mannanoligosaccharides supplementation on growth performance, haematological indices and caecal microbiota of cockerel chicks. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. Nigeria, 99, p. 919–923, 2015.

PLAYNE, M. J. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic acid, and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, p. 638-644, 1985.

PEREIRA, D. A.; VIDOTTO, M. C.; NASCIMENTO, K. A.; SANTOS, A. C. R.; MECHLER, M. L.; OLIVEIRA, L. G. Virulence factors of *Escherichia coli* in relation to the importance of vaccination in pigs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 8, p. 1430-1437, 2016.

ROODPOSHTI, P. M & DABIRI, N. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia coli*, and immune system status in newborn female calves. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Iran, 25, p. 1255-1261, 2012.

SILVA, S. Z.; THOMAZ, M. C.; WATANABE, P. H.; ROBLES HUAYNATE, R. A.; RUIZ, U. S.; PASCOAL, L. A. F.; SANTOS, V. M.; MASSON, G. C. I. H. Mananoligossacarídeo em dietas para leitões desmamados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 102-110, 2012.

STELLA, A. E. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. 2009. 83 f. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2009.

TRAN, T. H. T.; EVERAERT, N. Everaert; BINDELLE, J. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens Salmonella and Escherichia coli in pig production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. University of Liege, Belgium, v. 102, p. 1-16, 2016.

VONDRUSKOVA, H.; SLAMOVA, R.; TRCKOVA, M.; ZRALY, Z.; PAVLIK, I. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 5, p. 199-224, 2010.

ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 443-453, 2016.

## 7 ANEXO 1

### IMUNO-HISTOQUÍMICA PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)

- 1) Desparafinar o tecido
- 2) Xilol 1 (5 minutos); Xilol 2 (5 minutos); Xilol 3 (10 minutos)
- 3) Álcool 100% por 2 minutos
- 4) Álcool 96% por 2 minutos
- 5) Álcool 80% por 2 minutos
- 6) Álcool 70% por 2 minutos
- 7) Água destilada (Reidratação do tecido)
  
- 8) **Peróxido de Hidrogênio 3%** (diluir 3 ml de peróxido de hidrogênio em metade de metanol (50ml) com metade de PBS (50 ml). Colocar lâminas em cubeta e imergir em peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos.
  
- 9) Lavar com TBS (PBS)
  
- 10) **Recuperação antigênica:** Escorrer o PBS e colocar as lâminas imersas em Tampão Citrato (pH 6). Colocar a cubeta em banho-maria. Deixar por 6 minutos no micro-ondas na potência máxima, fazendo um intervalo em 3 minutos para coferir o volume do tampão. Deixar esfriar.
  
- 11) **Bloqueio das reações inespecíficas:** Escorrer o tampão citrato e deixar as lâminas imersas em Leite desnatado 5% diluído em PBS (5g de leite em 100ml de PBS) por 1 hora no agitador.
  
- 12) Lavar em TBS (PBS)
  
- 13) **Anticorpo primário:** Diluição de 1 µl de anticorpo primário (DAKO) em 1000 µl de PBS (1: 1000), em ependorfe e misturar. Colocar as lâminas em cuba úmida e pipetar 100 µl em cada lâmina, no mínimo. Armazenar Over Night por 12 horas.
  
- 14) Lavar com TBS (PBS)
  
- 15) **Envision** (para anticorpo primário em rato ou coelho): 100 µL em cada lâmina. Deixar durante 1 hora em temperatura ambiente.
  
- 16) Lavar em TBS (PBS)
  
- 17) Cobrir com DAB (diluir 1 ml de Buffer com 1 gota de DAB em ependorfe e misturar). Deixar agir até a viragem, momento em que o tecido fica acastanhado. Descartar o DAB em água sanitária.
  
- 18) Lavar com TBS (PBS)
  
- 19) **Contra corar com hematoxilina** (até 1 minuto)  
Passar na água destilada
  
- 20) Desidratar em álcool 80%, 90%, 100%.
  
- 21) Xilol 3 e 4