



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDUARDO RAELE DE OLIVEIRA

**QUITOOLIGOSSACARÍDEO COMO PREBIÓTICO PARA
LEITÕES DESMAMADOS**

Londrina
2016

EDUARDO RAELE DE OLIVEIRA

**QUITOOLIGOSSACARÍDEO COMO PREBIÓTICO PARA
LEITÕES DESMAMADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Caio Abércio da Silva

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48q	<p>Oliveria, Eduardo Rael de. Quitooligossacarídeo como prebiótico para leitões desmamados / Eduardo Rael de Oliveira - Londrina, 2016. 106 f. : il.</p> <p>Orientador: Caio Abércio da Silva. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Nutrição animal - Teses. 2. Leitão (Suíno) x Desempenho. - Teses. 3. Prebióticos. - Teses. 4. Saúde animal. - Teses. I. Silva, Caio Abércio da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 619.636.4</p>
------	---

EDUARDO RAELE DE OLIVEIRA

**QUITOOLIGOSSACARÍDEO COMO PREBIÓTICO PARA LEITÕES
DESMAMADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Caio Abércio da Silva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Edgard Hideaki Hoshi
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Prof. Dr. Arturo Pardo Lozano
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Prof. Dr. Marcos Augusto Alves da Silva
Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernán Castro-Gomez
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 25 de fevereiro de 2016.

...dedico

Aos meus pais Elcio de Oliveira e Silvia Rosa Rael de Oliveira,
pelos exemplos e pelo amor, carinho e apoio dispensado durante
toda minha vida, sem medir esforços nem sacrifícios para me dar
tudo o que precisei nesta caminhada.

Ao meu filho Lucca, pelas bênçãos que todos os dias a seu lado me
fazem viver.

À minha esposa Andreza, a pessoa mais importante da minha vida
e talvez a única que reconheça a loucura como um processo
criativo. Isso lhe requer muita paciência. É ela quem me faz
acreditar que eu realmente posso ser melhor. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda sua misericórdia.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina, por toda a caminhada nestes longos dezessete anos de trabalho como estudante. Ao Departamento de Zootecnia, e, em especial, ao meu orientador o Prof. Dr. Caio Abércio da Silva, pelos oito anos de convivência, sendo sempre um exemplo de profissional, pela amizade construída, paciência, incentivo, confiança e imagem de ser humano excepcional e que serve de espelho para todos que almejam sucesso na vida profissional e social.

Agradeço também ao laboratório de Tecnologia de Alimentos, em especial o professor Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez, pela produção do Quito oligossacarídeo.

Gostaria de agradecer à Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto.

Agradeço também a CAPES – pelo apoio parcial com uma bolsa de estudos.

Agradeço também especialmente a empresa De Heus, que acreditou em meu potencial e me incentivou a concluir o curso, principalmente, na figura de pessoas que são tão importantes para mim, Sr. Hermanus Wigman e Luis Silveira, e também a todos que são igualmente importantes em meu crescimento profissional.

Um agradecimento à parte para meus colegas da De Heus, Sérgio Guastale e Genécio Bacca, que têm sido meus anjos da guarda e mentores nesta minha dura caminhada e nas conquistas profissionais. Muito Obrigado!

Também um agradecimento especial à minha amiga Elisângela Olegário que me ajudou nos momentos mais difíceis da minha vida e da minha pesquisa. Muito Obrigado!

Não poderia deixar de agradecer ao colega David Gavioli, pela amizade de irmão e muita ajuda nos momentos necessários.

Do mesmo modo, agradeço ao meu grande amigo Arturo Pardo Lozano, que participou ativamente da execução deste projeto e é uma inspiração para todos que o conhecem.

Também aos colegas Marcino Pereira Junior, Aliny Novaes, Gabriela Nagi e Jéfferson Alves por todas as conversas e aprendizados mútuos.

Ao meu irmão Élcio de Oliveira Filho e a meus cunhados Edermir Ales dos Santos Filho e Marco Antônio dos Santos, além de seus pais Edemir Alves dos Santos e Suzana Hutter Santos, que são minha família londrinense!

À toda equipe e colegas da suinocultura, que, mais do que colegas, são verdadeiros amigos e parceiros, Cleandro Pazinato Dias, Roberta Abrami Monteiro Silva, Aline Alves da Silva, além dos meus grandes amigos e colaboradores na pesquisa Giovani Frederico, Carlos Melanda e Júlio Freitas, agradeço pelo empenho, dedicação, auxílio e participação, que foram essenciais para conclusão deste trabalho.

À professora Ana Paula Bracarense, agradeço pela contribuição e realização das análises morfométricas.

Ao professor Amauri Alcindo Alfieri e à técnica em nível superior e doutoranda Juliana Torres Tomazi Fritzen, pelas análises de imunoglobulinas séricas.

Muito obrigado a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que este verdadeiro sonho se tornasse realidade.

“Amar o perdido
Deixa confundido
Este coração
Nada pode o olvido
Contra o sem sentido
Apelo do NÃO
As coisas tangíveis
Tornam-se insensíveis
À palma da mão,
Mas a coisas findas
Muito mais que lindas,
Essas ficarão”

*Carlos Drummond de
Andrade*

OLIVEIRA, E. R. **Quitooligossacarídeo como prebiótico para leitões desmamados**. 2016. 106 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Uma dieta para leitões ao desmame deve promover a saúde intestinal, evitar distúrbios gastrintestinais e favorecer o consumo de ração e o ganho diário de peso. Hoje, estas necessidades estão baseadas no uso de antimicrobianos promotores de crescimento. As novas leis europeias de produção animal que almejam a uma produção sustentável têm levado à procura de alternativas para estes produtos, como os prebióticos. Objetivou-se com este trabalho avaliar um novo prebiótico, o quitooligossacarídeo (QOS), produzido pela Universidade Estadual de Londrina, e que tem, entre outras características, modular a flora intestinal e a resposta imune dos leitões, diminuindo a incidência de diarreia. Dois experimentos foram conduzidos para responder a duas propostas iniciais: encontrar o melhor nível de utilização como prebiótico do produto para leitões ao desmame e avaliar a resposta deste QOS frente a dois antibióticos, um Gram-positivo e outro Gram-negativo, sob o desafio de desmamar leitões aos 17 dias de idade. Os experimentos avaliaram desempenho, incidência de diarreia, peso de vísceras, morfometria, contagem de células somáticas na lâmina própria, escore de lesões e, somente no segundo experimento, concentração sérica das imunoglobulinas IgA, IgM e IgG. Para as características viscerais e a morfometria, foram abatidos 24 animais aos 31 e 35 dias de idade para os experimentos 1 e 2, respectivamente. No primeiro experimento, foram utilizados 72 leitões de genética Pen Ar Lan® com peso vivo inicial de $7,51 \pm 1,35$ kg, subdivididos em blocos casualizados por peso para os níveis de 0, 50, 100 e 150 ppm de QOS. Não houve efeito de regressão sobre o desempenho ou incidência de diarreia. Houve efeito de regressão polinomial positivo para peso do intestino grosso, altura de vilosidades de jejuno e profundidade de cripta no jejuno e íleo e regressão polinomial quadrática para a relação vilos/cripta deste último segmento e também para lesões no epitélio intestinal e contagem de linfócitos no duodeno e eosinófilos no duodeno e íleo. Não houve influência sobre a performance produtiva dos animais, provavelmente, porque estes não foram submetidos a condições entéricas adversas. Frente a todos os parâmetros estudados, os níveis crescentes de QOS mostram-se mais promissores na modulação da microbiota intestinal para as condições propostas por este experimento. Para o segundo experimento, foram utilizados 96 leitões de genética Pen Ar Lan® desmamados com idade média inicial de 17 dias e peso médio de $5,33 \pm 0,369$ kg. Os tratamentos consistiram em uma dieta basal acrescida de QOS (100 ppm), Colistina 40 ppm e Lincomicina 4,4 ppm. Para o desempenho, os antibióticos apresentaram melhor GPD dos 49 aos 63 dias de idade em relação ao QOS e a CA foi melhor para a Colistina, além deste também demonstrar uma menor incidência de diarreia aquosa. Aumento do peso relativo do baço, maior comprimento do intestino delgado e menor pH duodenal foram observados para o QOS em relação aos antibióticos. A morfometria indicou maior altura de vilosidades e melhor relação vilos/cripta para a Colistina em relação ao QOS e menor escore lesional em relação aos demais tratamentos. A concentração sérica de imunoglobulinas apontou uma maior concentração de IgA para o QOS aos 35 dias de idade. Frente aos resultados observados, o QOS não foi eficiente para substituir a Colistina como alternativa a este promotor de crescimento para leitões desafiados a um desmame de 17 dias de idade, mas a resposta observada de estímulo sobre o sistema imune indica um potencial promissor deste produto.

Palavras-chave: Saúde intestinal. Creche. Desempenho. Suínos.

OLIVEIRA, E. R. **Chitooligosaccharides used as a growth promoter to weaned piglets.** 2016. 106 p. Tesis (Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The goal of a weaning diet is to promote the intestinal health, to prevent gastrointestinal disturbs and to favor the feed intake and the weight gain. At the present time, these needs are based on the use of growth promoters. The new European animal production laws looking for a sustainable production that leads a search for new alternatives for these products like prebiotics. The purpose of this paper is to evaluate a new prebiotic, Chito-oligosaccharide (COS), produced by Universidade Estadual de Londrina, that has among other characteristics, influence over the gut and the immune answer of piglets, decreasing diarrhea frequency. Two trials were conducted to address two initial proposals: to define the best level of COS for piglets and to test it against two antibiotics, one Gram-positive and one Gram-negative, against the challenge to weaning piglets with 17 days of age. The trials evaluated the performance, diarrhea episodes, visceral weight, morphometry, CCS in lamina propria, lesion score and only in the second trial, immunoglobulins serum concentrations IgA, IgM e IgG. For the visceral characteristics and morphometry analysis, were slaughter 24 animals with 31 and 35 days of age, for the trial 1 and 2, respectively. In the first experiment, it was used 72 Pen Ar Lan® piglets with $7,51 \pm 1,35$ kg of BW, divided in casual blocks by BW and the treatments were four levels of COS (0, 50, 100 e 150 ppm). No regression effect was observed on performance or diarrhea episodes. Positive polynomial regression was observed for large intestine weight, villus height of jejunum and crypt depth of jejunum and ileum and quadratic polynomial regression was observed to villus/crypt relation of ileum, lesions in the intestinal epithelium, total amount of lymphocytes and eosinophils in the duodenum and also in the ileum. No influence on productive performance was observed probably because they were not submitted to gut adverse conditions. Face of all studied parameters, the higher levels of COS showed the best results on gut modulation for the conditions proposed for this trial. In the second trial, it was used 96 Pen Ar Lan® piglets weaned at 17 days of age with $5,33 \pm 0,369$ kg of BW. The treatments were a basic diet with COS (100 ppm), Colistin 40 ppm and Lincomycin 4,4 ppm. The antibiotics showed better ADG at 49 to 63 days of age compared to COS and the FCR was better for Colistin, and also with less diarrhea episodes for this antibiotic compared with COS. Increasing the relative spleen weight, greater length of the small intestine and lower pH in the duodenum were observed for COS compared with antibiotics. The morphometry indicated more villus height and better relation villus/crypt for Colistin against COS and less lesion score compared with other treatments. The immunoglobulins serum concentration showed more IgA for COS at 35 days of age. According to the observed results, COS was not efficient to replace Colistin as an alternative to this growth promoter for piglets that had the challenge to be weaned at 17 days, but the immune system answer showed by COS indicates the promising potential of this product for weaned piglets.

Keywords: Intestinal health. Nursery. Performance. Swine.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Conversão Alimentar
CDR	Consumo Diário de Ração
GPD	Ganho de Peso Diário
PB	Proteína Bruta
PF	Peso Final
PM	Peso Médio
PMI	Peso Médio Inicial
PMF	Peso Médio Final
PV	Peso Vivo
QOS	Quitooligossacarídeo
NO	Óxido Nítrico
TGI	Trato Gastrintestinal
TPN	Nutrição Parenteral Total
MCFA	Ácidos Graxos de Cadeia Média
PUFAs	Ácidos Graxos Poli-insaturados
SCFA	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGVCC	Ácidos Graxos Voláteis de Cadeia Curta
DCTA	Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES: DO NASCIMENTO À SUPERACÃO DOS DESAFIOS DO DESMAME COM E SEM O USO DE ANTIMICROBIANOS	13
2.1.1	Influência do Leite no Desenvolvimento Intestinal dos Leitões	13
2.1.2	Mudanças Fisiológicas no Desmame Precoce (18 a 23 dias)	19
2.1.3	População Microbiana Intestinal e o Sistema Imune do Leitão	23
2.1.4	A Realimentação de Leitões Desmamados e a Modulação da Microbiota	25
2.1.5	Antimicrobianos e a Redução da População Bacteriana “Indesejada”	27
2.1.6	A Composição da Dieta e a Prevenção de Desordens Intestinais em Leitões no Pós-Desmame	30
2.1.6.1	Proteínas	30
2.1.6.2	Fibras alimentares	33
2.2	ADITIVOS COMO ALTERNATIVAS AOS ANTIMICROBIANOS – PREBIÓTICOS.....	35
2.2.1	Quitooligossacarídeos e Suas Aplicações Como Prebióticos	36
2.2.2	Quitooligossacarídeo produzido em Londrina.....	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	42
4.1	ARTIGO 1	43
	Introdução	44
	Material e Métodos	45
	<i>Preparação do Inócuo</i>	45
	<i>Preparação do Fermentado rico em Quitooligossacarídeo</i>	45

	<i>Experimento</i>	45
	Resultados	48
	Discussão	49
	Conclusões	53
	Agradecimentos	53
	Referências	63
4.2	ARTIGO 2	67
	Introdução	68
	Material e Métodos	69
	<i>Preparação do inócuo</i>	69
	<i>Preparação do fermentado rico em Quitoooligossacarídeo</i>	69
	<i>Experimento</i>	69
	Resultados	72
	Discussão	73
	<i>Antimicrobianos</i>	73
	<i>Quitoooligossacarídeo</i>	75
	Conclusões	77
	Agradecimentos	77
	Referências	89
5	CONSIDERAÇÕES	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

O uso irrestrito e irresponsável de antibióticos em leitões tem sido a solução mais utilizada para o problema do pós-desmame imediato em granjas suínolas no Brasil. Seu mecanismo de ação apenas reduz o desafio sanitário por patógenos, mas não favorece e, em muitos casos, até prejudica a maturação intestinal pelo impacto sobre a microbiota local. Recentemente, tem-se adotado o uso de prebióticos como parte da estratégia para favorecer o desenvolvimento intestinal de leitões em estrutura e função, além de estimular o sistema imune desses animais, funcionando como alternativa ao uso desses antibióticos (ALVARENGA, 2016).

Diversas substâncias assumem o papel de prebióticos na alimentação de humanos, animais e também no preparo de alimentos, capazes de oferecer benefícios a saúde intestinal (PATEL; GOYAL, 2012). Os mananoligossacarídeos (MOS) e frutooligossacarídeos (FOS), têm sido largamente estudados e também comercialmente muito explorados. Já o Quitooligossacarídeo (QOS) tem seu uso relacionado a essa espécie animal muito recente, fazendo com que haja ainda um universo de possibilidades e descobertas das implicações e qualidades deste prebiótico.

A China é hoje o país que lidera as pesquisas com a quitosana, polissacarídeo abundante na natureza, e que está presente na parede celular de fungos e no exoesqueleto de artrópodes. No Brasil, entretanto, poucos são os estudos com a utilização deste produto para a alimentação animal (QUINTANA, 2009).

A Universidade Estadual de Londrina, desde 2006, estuda a produção de um QOS à base de um subproduto da indústria têxtil (ITANO, 2006) com possibilidade de uso na alimentação animal, propondo uma melhor maturação intestinal, por favorecer a resposta imune, minimizar o processo inflamatório do intestino e modular a colonização bacteriana do intestino (MA et al., 2014; XIAO et al., 2014; XIONG et al., 2015).

Dessa forma, através de um estudo de dose-resposta e de um estudo comparativo da ação do QOS frente a dois antibióticos largamente utilizados na suinocultura, avaliou-se a ação prebiótica do quitooligossacarídeo para leitões recém-desmamados quanto à performance, morfometria intestinal, presença e diferenciação de células somáticas na lâmina própria e estímulo sobre a produção de imunoglobulinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES: DO NASCIMENTO À SUPERAÇÃO DOS DESAFIOS DO DESMAME COM E SEM O USO DE ANTIMICROBIANOS

2.1.1 Influência do Leite no Desenvolvimento Intestinal dos Leitões

Para os mamíferos, onde se incluem os animais de produção, as doenças gastrintestinais são as principais causas de morbidade e mortalidade neonatais (UNITED STATES DEPARTMENT, 2008). Logo ao nascimento, há uma demanda imediata sobre a eficiência na digestão e absorção de nutrientes para manter a elevada taxa de crescimento dos neonatos. Entretanto, o trato gastrintestinal (TGI) tenta se manter estéril durante a gestação e sua colonização inicial se dá por bactérias comensais que não oferecem risco ao hospedeiro, mas, logo após um curto período pós-parto, o TGI tem que aceitar a presença de numerosas espécies de microorganismos que superam as bactérias presentes no hospedeiro em mais de 10 vezes. Dessa forma, o neonato tem que estabelecer e manter um balanço delicado entre o reconhecimento e exclusão dos patógenos e a tolerância às bactérias benéficas comensais (BUDDINGTON; SANGILD, 2011).

A estrutura que fornece proteção como barreira seletiva contra esse ambiente nocivo do lúmen intestinal são as células epiteliais intestinais que formam uma camada única de epitélio responsável pela secreção de fluidos, absorção de água, eletrólitos e nutrientes. A presença inicial destes patógenos ainda não comensais funciona como antígeno essencial para o desenvolvimento do sistema imune inato e para a programação do sistema imune adaptativo (NEU, 2007). Este desenvolvimento se inicia a partir de determinantes genéticos da resposta imune que desempenham papel central no reconhecimento e resposta do TGI para favorecer o crescimento das bactérias que de fato devem colonizar este órgão. Um leitão neonato tem pouca atividade de resposta imune de mucosa, com um nível baixo de linfócitos periféricos, linfonodos subdesenvolvidos, placas de *Payer* rudimentares e um baixo número de células imunes efetivas e de memória (BURKEY; SKJOLAAS; MINTON, 2009). As primeiras refeições, portanto, influenciam o desenvolvimento pós-natal do TGI e, embora, ainda seja menos entendido o potencial de influência nas interações entre o epitélio, as bactérias que o colonizam e o alimento ingerido devem ser considerados em conjunto para que se possa

entender o desenvolvimento saudável ou patológico do TGI (BUDDINGTON; SANGILD, 2011).

As células epiteliais do TGI são fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta imune e formação de uma barreira física contra a ação de patógenos e substâncias tóxicas. A eficiente colonização desse órgão em leitões neonatos, portanto, está associada à reatividade imune, à presença de receptores nos enterócitos, ao potencial oxidativo ou redutor das moléculas e, principalmente, para que esta integridade seja mantida em equilíbrio e a colonização seja benéfica ao organismo, ao aspecto nutricional, que é o principal ponto crítico para a manutenção desta homeostase (JACOBI; ODLE, 2012).

O primeiro desafio da nutrição dos neonatos é sua forma física, uma vez que os leitões em ambiente uterino são nutridos pelo cordão umbilical e pela ingestão do líquido amniótico nas últimas semanas antes do nascimento. Mas, é fundamental esclarecer que o leitão durante o desenvolvimento pré-natal adquire a capacidade de digestão de alimentos, defesa contra patógenos, tendência a osmorregularidade, secreção de hormônios e moléculas sinalizadoras e a detoxificação e eliminação de toxinas produzidas pelo próprio metabolismo ou por agentes externos. Estas características permitem que o feto consiga processar o líquido amniótico ingerido e permite que o animal recém-nascido já esteja adaptado ao consumo materno se este tiver seu desenvolvimento pré-natal completo (BUDDINGTON; SANGILD, 2011; BURRIN et al., 2000; DROZDOWSKI; CLANDININ; THOMSON, 2010).

O leitão neonato sadio está completamente adaptado ao primeiro alimento, o colostro, que é fundamental para o desenvolvimento intestinal, para sua maturação e saúde (AUMAITRE; SEVE, 1978). O colostro inclui imunoglobulinas que transmitem a imunidade passiva ao neonato, além de hormônios, citocinas e outras moléculas regulatórias que estimulam este desenvolvimento e, principalmente, as funções imunes (XU et al., 2002). Para suínos, devido às características placentárias da espécie, o colostro é fundamental para a imunidade passiva e sua ingestão adequada, em torno de 200 g, seria indispensável para determinar o desenvolvimento satisfatório do neonato (LE DIVIDICH et al., 2005).

O leite da fêmea suína é um alimento específico para o leitão totalmente adaptado à digestão do neonato (CAMPBELL; CRENSHAW; POLO, 2013) devido ao seu conteúdo de lactose, característica proteicas e perfil de ácidos graxos e aminoácidos, otimizando a digestão, a absorção e as funcionalidades destes nutrientes sobre o desenvolvimento imune e regulatório da população microbiana (VAN DIJK et al., 2002). O leite confere rápido crescimento pós-natal e manutenção da integridade epitelial, sobretudo das junções de oclusão

(*tight junctions*), que são altamente dependentes da nutrição enteral (KANSAGRA et al., 2003). A importância dos nutrientes no lúmen intestinal é fundamental para alavancar esse crescimento, evoluir o processo de maturação e reduzir os riscos de translocação bacteriana e, conseqüentemente, de sepse (CILIEBORG et al., 2011).

A composição da flora intestinal é influenciada pelo leite materno, na medida em que aumenta a densidade fecal e a população de bactérias ácido-láticas (especialmente as bifidobactérias e os lactobacilos). Neste processo, há uma redução na prevalência de bactérias que se aderem na mucosa e, conseqüentemente, a incidência de doenças entéricas (KORNEGAY; EVANS; RAVINDRAN, 1994; PENDERS et al., 2006; VAN HAVER et al., 2009). Dessa forma, quando se comparam leitões alimentados com leite materno ou com sucedâneos lácteos, percebe-se que os primeiros apresentam diferentes padrões de expressão gênica microbiana para as bifidobactérias e lactobacilos, o que suscita a ideia de que o leite materno pode afetar positivamente o estabelecimento e a dominância das bactérias comensais e remover patógenos indesejáveis (MOROWITZ et al., 2010).

A perfeita combinação entre o leite materno e a manutenção da homeostase e das funções protetoras e de desenvolvimento do TGI em conjunto com as bactérias comensais favorece a saúde animal e seu crescimento adequado. Dessa forma, cada componente da dieta tem papel singular nesta promoção de saúde intestinal e, mesmo quando se inicia a dieta sólida ainda durante a maternidade, estes componentes assumem papel fundamental como mantenedores deste equilíbrio. Isto fica evidenciado em pesquisas de nutrição humana que utilizam leitões como modelos experimentais para neonatos que não são alimentados com leite materno, mas com ingredientes nobres que não são de base láctea, como alguns prebióticos e probióticos, demonstrando que esses animais são capazes de apresentar inúmeros benefícios em seu desenvolvimento pela influência positiva destes produtos sobre a composição de microrganismos do TGI (SHERMAN et al., 2009).

Os aminoácidos, por exemplo, além do papel tradicional na síntese proteica, desempenham um papel crítico na regulação fisiológica do intestino, afetando funções mecânicas, hormonais e neuroendócrinas (RHOADS; WU, 2009). A arginina é um aminoácido essencial sintetizado pelos enterócitos nos neonatos para o crescimento, mas sua suplementação via dieta favorece a reparação tecidual pelos mecanismos de migração celular dose-dependente via óxido nítrico (NO) e adesão tecidual quinase-dependente (RHOADS et al., 2004a; RHOADS et al., 2004b), processos extremamente importantes quando há injúria tecidual e desnudamento das superfícies das vilosidades, promovendo rápida restauração da

solução de continuidade do epitélio (JACOBI; ODLE, 2012). A arginina também participa do desenvolvimento das células T e B, contribuindo para as respostas imunes inata e adaptativa em leitões (BAILEY et al., 2005).

A treonina tem papel fundamental na produção de mucina e grande parte de seu requerimento em neonatos está relacionado ao metabolismo das células secretoras de muco. A disponibilidade deste aminoácido para leitões afeta a produção proteica da mucosa intestinal, assim como a produção de mucina (NICHOLS; BERTOLO, 2008). É importante ressaltar que o muco exerce função de proteção física do epitélio intestinal, mas também com participação ativa na função de permeabilidade de difusão seletiva deste tecido para nutrientes e não para macromoléculas, uma vez que forma uma camada que recobre esta estrutura, protegendo contra patógenos e toxinas (proteases e acidez) (OSWALD, 2006). O muco pode ser considerado uma das estruturas primárias na defesa desse órgão e cuja ausência ou ineficiência, aliada ao desenvolvimento imaturo dos leitões, pode ser crítico para o desenvolvimento de patógenos e aparecimento de lesões teciduais (JACOBI; ODLE, 2012).

O glutamato é o maior combustível oxidativo do intestino de suínos e quando provém da dieta é largamente metabolizado já em sua primeira passagem pelo TGI. Possui papel importante no metabolismo da mucosa gástrica, uma vez que esta provavelmente pode absorver o glutamato também. A deficiência de glutamato para o leitão novo pode levar à oxidação de outros aminoácidos essenciais, como a leucina. Para leitões neonatos subdesenvolvidos, o glutamato também pode ser importante para a manutenção da replicação celular (BURRIN; STOLL, 2002). É importante compreender que o perfil de aminoácidos do colostro e do leite materno se modifica nas diferentes espécies de mamíferos. Em humanos, equídeos, suínos e bovinos, há um decréscimo de 75% na concentração total de aminoácidos, com redução no percentual de cisteína, glicina, serina, alanina e treonina (DAVIS et al., 1994).

Já os ácidos graxos de cadeia média (MCFAs), longa (PUFAs) e curta (SCFA) são componentes essenciais no fornecimento de energia e manutenção do crescimento do TGI e, conseqüentemente, no desenvolvimento dos neonatos (JACOBI; ODLE, 2012). Os ácidos graxos poli-insaturados LCn-3PUFAs (Ômega 3), por exemplo, estão relacionados a diferentes aspectos do metabolismo das proteínas reguladas pela insulina e que são capazes de promover a redução das perdas oxidativas dos aminoácidos corporais, com incorporação preferencial destes ácidos graxos à membrana fosfolipídica em detrimento dos lipídios musculares (BERGERON et al., 2007). O ácido aracdônico pode estimular a recuperação do

tecido epitelial intestinal pela ação de prostanóides e pelo estímulo à produção de prostaglandina E2 (BLIKSLAGER et al., 1997; JACOBI et al., 2012). Entretanto, os LCn-6PUFAs são pró-inflamatórios e, por isso, é fundamental se conhecer a melhor relação entre n-3/n6 PUFAs para os neonatos, uma vez que a habilidade do animal recém-nascido é pequena em regular processos inflamatórios intestinais constantes, o que pode levar a sérios problemas para a saúde intestinal (JACOBI; ODLE, 2012). Os ácidos de cadeia curta, diferentemente, servem de combustível intestino-específico para a mucosa e são produzidos pela fermentação de fibras dietéticas, possuem relativamente grande quantidade de energia, são rapidamente absorvidos pela mucosa, tem tropismo pela mucosa intestinal e são potentes estimuladores da absorção de sódio (Na) e água no cólon (BURRIN; STOLL, 2002).

O perfil de ácidos graxos do leite materno também pode ser influenciado pela dieta da fêmea durante a lactação, sobretudo, em relação ao nível e tipo de gordura que é ingerido pelo animal neste período (MENESES et al., 2015). Uma mudança na composição de ácidos graxos para um percentual maior de ômega 3 (n-3 PUFA) provoca reflexos positivos sobre os leitões lactentes, como o estímulo ao desenvolvimento do sistema imune, caracterizado por um aumento nas concentrações de linfócitos nos linfonodos mesentéricos e no baço com modificação na população inicial das células CD4+ e CD8+ (BINTER et al., 2011).

Dessa forma, com o desenvolvimento do leitão durante o período de maternidade e sua conseqüente adaptação e assimilação dos nutrientes da dieta, a resposta imune ativa da mucosa intestinal gradualmente passa a desenvolver a habilidade de gerar suas próprias moléculas de anticorpos na lâmina própria. Nas primeiras duas semanas de vida, o intestino rapidamente passa a ser colonizado pelas células linfoides (BLACHIER et al., 2013). Neste momento, uma alteração na composição da dieta, a partir da introdução de uma dieta sólida na maternidade, inicia o processo de mudanças na citocinética dos enterócitos e nos padrões de expressão gênica, que, ao desmame, coincide com as mudanças nas funções absorptivas e secretórias do TGI, assim como dos órgãos envolvidos com a digestão, como o pâncreas (DROZDOWSKI; CLANDININ; THOMSON, 2010).

De maneira similar, o crescimento do animal durante a maternidade implica em uma complexidade e diversidade maior da microbiota do TGI (INOUE et al., 2005), e de acordo com o processo evolutivo de formação da microbiota de um suíno adulto, é na fase final de maternidade que a modificação dessa microbiota é altamente influenciada pelo ambiente (THOMPSON; WANG; HOLMES, 2008). No período neonatal, em escala de população, a colonização é baseada em duas divisões bacterianas: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Entretanto,

quando a avaliação leva em conta a individualidade do organismo, as variações nas populações colonizadoras de cada leitão têm grande relação com a manutenção da saúde e uma melhor taxa de crescimento (BACKHED et al., 2004; ROBOSKY et al., 2005). Dessa forma, ao nascimento, a microbiota da mãe tem grande influência na formação da microbiota do neonato, mas durante a primeira semana, as diferenças individuais na microbiota independem da relação materna ou do ambiente, assumindo que neste período a resposta individual do leitão é mais distinta do que em qualquer outro período de sua vida, o que propõe uma certa individualidade na composição inicial da microbiota nos primeiros dias (THOMPSON; WANG; HOLMES, 2008).

Da segunda semana até a quarta semana de vida, a coabitação em grupos de leitões indica similaridade da microbiota dentro destes grupos, demonstrando que nesse período a grande influência sobre a microbiota está relacionada com o ambiente em que o animal está inserido. Neste momento, portanto, a suscetibilidade do animal a uma alteração na microbiota é maior, tornando-o mais vulnerável às mudanças ambientais, nutricionais e estressoras (THOMPSON; WANG; HOLMES, 2008).

Cabe ressaltar também que mesmo uma microbiota completamente adaptada ao animal requer um aporte nutricional que representa um custo efetivo para o leitão. Isto ocorre porque a microbiota compete com o animal pelos nutrientes da dieta, gera compostos tóxicos, estimula uma resposta maior de replicação celular e demanda maior secreção de muco pelas células caliciformes, estimula a reposta inflamatória e altera a morfologia intestinal (RICHARDS; GONG; LANGE, 2005). Este custo, entretanto, deve ser absorvido pela nutrição, sem que haja, no entanto, uma redução no desenvolvimento e crescimento do animal.

O leitão após o nascimento desenvolve seu TGI, que está pautado sobretudo na construção de uma microbiota estável e benéfica para seu desenvolvimento e na adaptação nutricional do leitão ao alimento que é oferecido. Considerando que estes dois aspectos são interdependentes, a saúde intestinal de um leitão durante o período de amamentação está condicionada ao seu crescimento aliado ao equilíbrio de sua função intestinal (THOMPSON; WANG; HOLMES, 2008). O maior problema na produção de leitões, entretanto, é o período de desmame. Nesta fase, o equilíbrio das funções intestinais é colocado em desafio, com a alteração total da dieta, da composição às características físicas, com a mudança de ambiente e, dessa forma, com grande impacto sobre a microbiota e com todos os fatores estressores que

envolvem a passagem de um animal lactente para o início da alimentação exclusivamente heteróloga (LALLÉS et al., 2004).

2.1.2 Mudanças Fisiológicas no Desmame Precoce (18 a 23 dias).

O desmame, entre o final da terceira e início da quarta semana de vida do leitão, onde este ainda está praticamente se alimentando apenas do leite materno em detrimento do consumo inicial do alimento seco (PUPPE; TUCHSCHERER, 2000), é um processo traumático, agudo, na qual modifica-se ou desafia-se um organismo adaptado ao ambiente, à microbiota e aos aspectos nutricionais. Para o leitão, os primeiros momentos do desmame provavelmente se relacionam a um período de jejum, que pode durar 24 horas, mas que pode ser prolongado para mais de 48 horas, dependendo do seu *status* sanitário, de sua idade ao desmame e de sua adaptação prévia ao alimento. Nestes primeiros dias de segregação, há um período de recuperação intestinal com consequente retorno ao consumo voluntário de ração. Este quadro leva, entre outros aspectos, ao aparecimento de desordens intestinais, suscetibilidade a infecções e, conseqüentemente, diarreia (LALLÉS et al., 2004).

O período prolongado de inapetência conduz ao efeito imediato do desmame que é uma redução drástica na ingestão de energia e cujo resultado é a estagnação do crescimento. Um leitão desmamado irá precisar de três dias após o desmame para recuperar o nível de consumo energético para a sua manutenção e de 8 a 14 dias para recuperar os mesmos níveis de ingestão energética do leitão pré-desmame (LE DIVIDICH; SÈVE, 2000).

O intestino delgado perde, em média, 20 a 30% do seu peso relativo durante esta fase de jejum alimentar, culminando com uma redução severa nas alturas de vilosidades, com alteração do seu formato, passando de “dedo de luva” para “folha” (SKRZYPEK et al., 2005). Em resposta, o organismo promove uma maior replicação celular caracterizada por atividades de mitose-migração-extrusão, visando manter a capacidade digestiva e absorviva do epitélio intestinal e levando a um aumento na taxa de replicação celular na base das vilosidades que resulta na redução na relação vilos/cripta (HU et al., 2012; MONTAGNE et al., 2003). Ressalta-se que mesmo esta taxa de replicação celular é dependente da disponibilidade tecidual de energia durante este período (PLUSKE; HAMPSON; WILLIANS, 1997).

A atividade secretória do intestino delgado proximal também fica reduzida em desmames precoces em virtude das alterações acima mencionadas, com uma pequena atividade das enzimas produzidas por células com bordas em escova, a lactase e a sucrase

(PÁCHA, 2000). A partir da adaptação do animal à dieta de desmame, a atividade secretória parece alterar o seu perfil, reduzindo a atividade da lactase e aumentando a atividade da maltase e da sucrase (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997). Observa-se também que o estímulo para esta alteração na atividade secretória corresponde mais fortemente, com exceção da maltase que é estimulada pela produção de mRNA, a um processo pós-transcricional de biossíntese enzimática (MARIÓN et al., 2005). A atividade das enzimas pancreáticas no lúmen intestinal também fica reduzida, especialmente naqueles leitões que demoram mais tempo para iniciar a realimentação. Inclusive, o suco pancreático também apresenta algumas alterações qualitativas após o período de desmame (LALLÉS et al., 2004).

Essa situação de severa desnutrição que pode ser provocada pelo desmame faz com que o metabolismo dos órgãos associados à digestão se adaptem para minimizar as agressões e continuem a se desenvolver, diferente do que acontece com o leitão neonato que tem poucas chances de adaptação a um período de não alimentação ou quando a alimentação enteral é substituída pela nutrição parenteral total (NPT) (BURRIN et al., 2007; JAIN et al., 2012). O leitão ao desmame mobiliza suas reservas energéticas e altera sua deposição proteica e utilização de aminoácidos para a manutenção ou recuperação do tecido epitelial intestinal. Embora, exista uma redução na composição proteica e na massa de DNA no intestino delgado, especialmente o proximal, durante o período de pós-desmame imediato, a realimentação do animal conduz o intestino a uma recuperação de peso e massa total que excede a recuperação da massa corporal e faz com que este órgão possa crescer e se recuperar. Isto se dá, especialmente, porque as mudanças no metabolismo intestinal incluem uma readequação do metabolismo dos aminoácidos, fazendo com que o estímulo à produção enzimática relacionada a esses nutrientes seja aumentado (LALLÉS et al., 2004).

Algumas moléculas exercem papel fundamental nesta modificação do metabolismo, como o óxido nítrico (ON) e as poliaminas (i.e putrescina, espermina e espermidina), que são essenciais para a sobrevivência celular, pois, tem papel fundamental nos processos de proliferação, diferenciação e migração (MOINARD; CYNOBER; DE BANDT, 2005). Neste mesmo processo, o papel dos aminoácidos arginina, glutamina e leucina é crucial na manutenção do crescimento, integridade e função do epitélio intestinal. Como moléculas sinalizadoras, estes nutrientes promovem a síntese proteica e inibem a degradação proteica autofágica no epitélio intestinal, além de estimularem a ativação da proteína quinase e da rapamicina quinase que têm função sobre a migração celular e a restituição tecidual respectivamente (arginina e glutamina). O papel da leucina, assim como da arginina, também

está relacionado com a molécula de NO, a primeira promovendo a migração celular na presença desta molécula e a segunda participando da produção dessa molécula (RHOADS; WU, 2009). Dessa forma, a taxa de síntese proteica após o desmame é reduzida para a deposição muscular, mas se eleva no intestino (SEVE et al., 1986). Entretanto, uma realimentação pós-desmame contendo baixos níveis de proteína, pode levar a uma redução severa no crescimento muscular, mas também pode influenciar negativamente a síntese proteica intestinal uma vez que os níveis de arginina e glutamina também possam estar severamente diminuídos (DENG et al., 2009).

Outro aspecto importante da inter-relação do período de desmame com a morfofisiologia do intestino decorre de suas características de permeabilidade, absorção e secreção. Após o desmame, o animal apresenta uma condição de desenvolvimento de maturidade do TGI, não no sentido de uma pré-imaturidade quando lactente, mas como uma readaptação fisiológica aos processos que envolvem as mudanças hormonais, metabólicas, físicas e sobre a microbiota. Nesse sentido, o amadurecimento da condição absorptiva e secretória do intestino ocorre em estágios, que a partir do desmame são caracterizados pelo jejum imediato, realimentação e adaptação. O primeiro estágio é marcadamente secretório para o jejuno e o cólon, enquanto que no íleo esta diminui em relação ao período pré-desmame, mas ambos tendem a retornar aos parâmetros pré-desmame após 5 dias (segundo estágio). A absorção de glicose Na⁺ dependente aumenta no primeiro estágio, retornando aos valores do pré-desmame no segundo estágio (BOUDRY et al., 2004).

Com relação a permeabilidade intestinal, é preciso entender a influência que um processo de alteração metabólico-fisiológico, como um jejum prolongado, pode exercer sobre a mucosa. Dentre os processos que podem impactar na alteração da função da barreira intestinal, destacam-se o aumento da permeabilidade paracelular derivada de fatores intrínsecos (neurotransmissores, proteases e citocinas) e extrínsecos (toxinas e xenobióticos), e a consequente abertura das junções de oclusão (*tight junctions*), redução do papel de difusor seletivo do muco, aumento do processo inflamatório (mediado por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina - 6), a ação do peróxido de hidrogênio e dos radicais superóxido, e também o crescimento exacerbado de microrganismos. Todos esses processos interferem na permeabilidade da membrana e permitem, em diferentes graus e formas, a translocação bacteriana e de toxinas enterogênicas (BALZAN et al., 2007; OSWALD, 2006; SALZEDAS-NETTO, 2006; WIEST; KRAG; GERBES, 2012).

Portanto, fisiologicamente, para o primeiro estágio (de jejum imediato pós desmame) tem-se um aumento da permeabilidade paracelular, com a resistência transmucosa diminuindo no período inicial para o jejuno proximal e retornando a valores pré-desmame após 5 dias. Entretanto, a mucosa ileal tem sua resistência aumentada em torno de 160% após 5 dias, mantendo-se estável conforme o animal envelhece. Já a permeabilidade para macromoléculas diminui no segmento jejunal para o primeiro e segundo momentos e não retornam mais aos níveis anteriores ao desmame, enquanto que para o íleo e o cólon a permeabilidade para estas moléculas não é afetada (BOUDRY et al., 2004).

A produção e a característica do muco também sofrem alterações no período de pós-desmame imediato com diferenciação no número de células caliciformes nos diversos segmentos intestinais e também mudanças nos diferentes perfis secretórios destas células (neutras, ácidas e ácidas sulfatadas). A mucina, que apresenta diversas formas de produção, é o principal constituinte do muco. Algumas são secretadas e outras estão ligadas à membrana celular e intrinsecamente relacionadas com a resposta inflamatória do epitélio (KIM; HO, 2010). As características de mudança de cada segmento, no entanto, são bastante controversas na literatura. Em ratos, por exemplo, uma estagnação no trânsito intestinal diminui o número de células naqueles segmentos sem trânsitos em um primeiro momento, mas com o decorrer do tempo de exclusão do alimento, este número tende a aumentar nos mesmos segmentos (MELLO et al., 2012).

As modificações metabólicas e estruturais decorrentes do desmame ocorrem por uma redução na quantidade de nutrientes no lúmen e não pelo tipo de dieta que está sendo oferecida ao leitão (MCCRACKEN et al., 1995; VERDONK et al., 2001). Por outro lado, a adaptação do leitão ao consumo de uma dieta similar à oferecida no momento do desmame durante o período de maternidade parece ser a chave para a redução do tempo de jejum do leitão (BRUININX et al., 2002; FRASER; PAJOR, E. A.; FEDDES, 1994). O desmame por si só é responsável por todas as alterações citadas e, nesse sentido, somadas às modificações dos grupos de animais e do ambiente durante o desmame há um impacto sobre os principais agentes relacionados com a manutenção ou com o desequilíbrio da microbiota. A influência da dieta no período pós-jejum imediato na saúde intestinal também é grande, mas o efeito da microbiota é ainda maior. Compreender como estes dois fatores se comportam frente aos desafios do desmame e como estes podem ser tratados é a chave para atender a saúde intestinal.

2.1.3 População Microbiana Intestinal e o Sistema Imune do Leite.

As microbiotas do TGI possuem um alto grau de adaptação interespecífica e de evolução entre espécies (XU et al., 2007). A adaptação das bactérias ao hospedeiro está relacionada não somente com a capacidade destas se manterem dentro do organismo, mas com as funções que as bactérias desempenham em conjunto com o organismo para o desenvolvimento e maturação de diversos processos fisiológicos e metabólicos do hospedeiro. A maioria das bactérias comensais presentes na mucosa dos animais são neutras ou benéficas, entretanto, no hospedeiro, formam pequenos microssistemas nos diferentes segmentos intestinais (ECKBURG et al., 2005). Isto faz mais sentido ainda quando se caracteriza o intestino como a maior área do organismo em contato com os antígenos do meio ambiente, somado ao fato que nessa região ocorre a apresentação da maioria dos microrganismos para as células do sistema imunológico (RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2008). Uma única camada de células epiteliais é o que separa toda a microbiota do lúmen intestinal de um grande órgão linfoide associado ao TGI, os GALT (Tecido Linfoide Associado ao Intestino), que inclui as placas de *Peyer*, folículos linfoides isolados e os linfonodos mesentéricos. Dessa forma, a capacidade de tolerância do organismo a todos estes agentes exógenos evita uma resposta inflamatória aguda ou crônica com gasto energético e nutricional quando não há um desafio verdadeiro (PINHO, 2008).

O sistema imune do TGI é uma grande parte independente do sistema imune do organismo, cuja resposta é dirigida pelas células dendríticas do epitélio, pelos macrófagos e pelas células T e B, que são programadas no intestino ou nos linfonodos mesentéricos (SWIATCZAK; RESCIGNO, 2012). Isto confere a este órgão a capacidade de determinar o grau de resposta antigênica necessário para cada situação, a partir da ação de uma imunidade inata e/ou adaptativa, que funcionam como um sistema de controle imune coordenado para o intestino, no qual os dendritos e os macrófagos funcionam como uma espécie de porta de entrada para a ativação deste sistema formado por três componentes principais (SELLERS; MORTON, 2013). O primeiro componente é o muco e seus fatores antimicrobianos que formam uma barreira entre o antígeno e a célula epitelial. O segundo é uma resposta imune inata rápida mediada por macrófagos como resposta às bactérias que invadem o epitélio. O terceiro é uma imunidade adquirida específica da mucosa intestinal. Os três permitem que a sinalização do epitélio intestinal para as células da lâmina própria promova uma resposta imune adequada, prevenindo desequilíbrios nas funções do intestino (HOOPER;

MACPHERSON, 2010). A resposta inata do intestino evita que haja uma grande manifestação pró-inflamatória no tecido intestinal quando este sofre qualquer injúria ou invasão. Isto é determinado pela ação dos macrófagos na lâmina própria que, silenciosamente, fagocitam os invasores, mas mediados pelos TGF- β (fatores de crescimento tumoral β), estes não secretam citocinas pró-inflamatórias (SMITH et al., 2011). A resposta inata é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão (PRR) existentes nas células epiteliais intestinais, células da lâmina própria, células endoteliais e fibroblastos. Estes PRRs no intestino são caracterizados principalmente pelas famílias *toll-Like* (TLR) e *nucleotídeos-Like* (NOD) (ABREU, 2010). Cada microrganismo é percebido de forma singular pelo intestino e, mais especificamente, para cada uma das células em que estes PRRs estão presentes, podendo inclusive apresentar diferentes respostas em cada célula. Na resposta adaptativa do TGI, os dentritos celulares agem em colaboração com as células epiteliais do intestino e com os macrófagos para modular a resposta e diferenciação das células T-regulatória (anti-inflamatórias) e T-efetoras (pró-inflamatórias) (SELLERS; MORTON, 2013). Em intestinos saudáveis, a resposta imune de tolerância é predominante e esta só é conseguida porque há uma supressão da resposta imune contra as bactérias comensais (HOOPER; MACPHERSON, 2010). Isto ocorre porque o intestino produz células T-regulatórias específicas que são as células T antígeno-específicas supressoras intestinais. Estas são produzidas a partir da diferenciação das células CD4+ e que interagem diretamente com as células dendríticas, a partir de células C103+ que expressam moduladores capazes de promover resposta de tolerância pela ação das T-regulatórias intestinais com consequente supressão das células T-efetoras e também a partir das células epiteliais intestinais e das próprias células dendríticas, que são capazes de promover uma resposta de tolerância. Entretanto, as células epiteliais parecem ter sua ação induzida pelas bactérias comensais (SELLERS; MORTON, 2013). O mecanismo de tolerância, portanto, é uma complexa relação de fatores que envolvem as respostas inata e adaptativa e, dessa forma, de maneira geral, são as bactérias comensais que tendem a ativar as células epiteliais do intestino para direcionar a resposta do organismo à imunotolerância (KINNEBREW; PAMER, 2012).

Antes do desmame, as bactérias comensais dominantes, em virtude do consumo de leite materno, são os lactobacilos e os estreptococos (CASTILLO-GÓMEZ; MARTÍN-ORÚE, 2006). Com o desmame e todas as mudanças que este processo acarreta, a microbiota intestinal passa por outra adaptação que, conforme foi discutido anteriormente, corresponde ao terceiro estágio de modulação da microbiota individual (THOMPSON; WANG;

HOLMES, 2008). Dessa forma, há uma mudança no perfil de bactérias, com a redução da população Gram-positiva anaeróbia e aumento da população Gram-negativa do gênero *Bacteroides*, que será o perfil dominante dos leitões para o resto da vida produtiva (SWORDS et al., 1993). O resultado é uma susceptibilidade maior para patógenos e, conseqüentemente, uma alteração na homeostase já desafiada por tudo o que foi visto anteriormente durante o processo de desmame (PLUSKE et al., 2003). Após este período, a microbiota do leitão, quando este atinge a maturidade, fica subdividida em dois grandes grupos, os *Lactobacilos-Bacilos-Estreptococos* e o segundo grupo, dominante, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, além de *Eubactérias* e *Clostridium*.

Após o período de realimentação dos leitões desmamados, a dieta tem um papel fundamental na modulação e dinâmica da microbiota. Neste sentido, as proteínas, carboidratos, fibras, ácidos orgânicos, macrominerais, enzimas, probióticos, prebióticos e também antibióticos são responsáveis por uma pressão de seleção sobre as bactérias comensais que, em última análise, reduzem a população total de bactérias específicas em benefício de outras e, para tornar esta questão ainda mais delicada, todos estes fatores se inter-relacionam sobre essa pressão de seleção, fazendo com que o estudo da dieta em si tenha uma importância fundamental (GARCÍA et al., 2014; HAN et al., 2007; RIST et al., 2013; WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001).

2.1.4 A Realimentação de Leitões Desmamados e a Modulação da Microbiota.

Após o desmame incide um jejum imediato. O leitão deve ser submetido a um período de realimentação na qual o consumo durante a primeira semana pós-desmame deve ganhar intensidade, garantindo um conseqüente ganho de peso diário (GPD). Quanto maior for esse parâmetro nesta semana, maior será a resposta de desempenho do animal em termos de peso ao abate e, dessa forma, menor será o tempo até o sacrifício (COLE; VARLEY, 2000). Para que o processo de realimentação seja efetivo e pouco traumático, o alimento oferecido deve identificar-se com a condição fisiológica do leitão. Leitões de pouco desenvolvimento durante o desmame, necessitam de uma dieta adaptada ao seu momento fisiológico e metabólico em relação a leitões de melhor desenvolvimento ou que já estejam adaptados à ração sólida e com uma grande variedade de ingredientes devido ao consumo na fase pré-desmame (BRUININX et al., 2002; DOUGLAS et al., 2014).

A composição do alimento, o tamanho das partículas presentes no lúmen e o perfil nutricional do que o leitão começa a ingerir provocam grande impacto sobre a modulação da microbiota e sobre o desenvolvimento enzimático e fisiológico do animal. O processo de realimentação, portanto, oferece substrato para a recuperação e desenvolvimento do leitão desmamado, mas permite também, e isso depende em grande parte do tipo de substrato presente no lúmen intestinal, uma proliferação de bactérias, comensais ou não, que passam a utilizar o excesso de substrato não aproveitado pelo animal para sua proliferação (PLUSKE et al., 2003).

Após o jejum, as bactérias Gram-negativas assumem um papel importante na microbiota intestinal (CASTILLO-GÓMEZ; MARTÍN ORÚE, 2006), o que para o leitão recém-desmamado constitui um novo desafio, uma vez que as condições propícias ao aparecimento deste tipo de microrganismo favorecem o aumento de bactérias não-comensais com alto potencial de patogenicidade no TGI ou mesmo pode levar a um aumento desordenado das Gram-negativas comensais, o que também é prejudicial para o equilíbrio simbiótico da microbiota (PLUSKE et al., 2003). Assim, a colibacilose é a doença entérica de maior impacto em animais neonatos e no pós-desmame, provocada por diferentes cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas e que promovem a colonização do intestino delgado a partir da adesão à mucosa intestinal, e a liberação de enterotoxinas termolábeis (LTI e LTII) e termoestáveis (STa e STb) que agem sobre as barreiras funcionais da mucosa, aumentando sua permeabilidade e levando à perda de fluidos para o lúmen intestinal, caracterizando o aparecimento da diarreia aquosa (GUIGNOT et al., 2007). Estas bactérias também são caracterizadas por suas diferentes fímbrias (K88, K99, 987P, F41, F18 e AINDA – Adesina Envolvida Em Aderência Difusa), que são responsáveis pela aderência a receptores específicos localizados na superfície dos enterócitos. Estas estruturas representam os fatores de virulência destas bactérias (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

Dessa forma, estratégias com objetivo de controlar a proliferação bacteriana no TGI, especialmente durante a primeira semana, podem ser efetivas e trazer resultados promissores para a manutenção da integridade intestinal. Dentre os mecanismos que podem ser utilizados para evitar esse crescimento desordenado de microrganismos nocivos durante o pós-desmame, os antimicrobianos têm figurado como principal estratégia adotada em todo mundo para a produção animal, em especial, a avícola e a suinícola (GILLESPIE; FLANDERS, 2009).

2.1.5 Antimicrobianos e a Redução da População Bacteriana “Indesejada”.

Os antimicrobianos têm papel importante na produção animal, quer sob a forma terapêutica de uso, o que na suinocultura significa a administração a um animal ou a um grupo de animais que claramente demonstram sinais de doenças clinicamente aparentes; quer no controle de doenças potencialmente perigosas, quando a morbidade excede os limites da mortalidade; quer na metafilaxia, quando sob a presença de alguns animais doentes no rebanho, trata-se todos os animais a fim de evitar a disseminação da doença; ou como promotores de crescimento, quando os antibióticos são utilizados em doses muito mais baixas do que a terapêutica para funcionar como um aditivo alimentar com respostas positivas de desempenho e saúde (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002; SILVA; ZOTTI, 2010).

Como promotores de crescimento, os antimicrobianos têm importância devido à sua ação no trato digestório sobre a microbiota intestinal, reduzindo a competição por nutrientes e a produção de metabólitos que deprimem o crescimento dos animais (GONZALES et al., 2012). A melhora na performance quando se utilizam antimicrobianos como promotores de crescimento está amplamente definida (PARTANEN, 2002; PALERMO NETO; ALMEIDA, 2006), no entanto, estas substâncias têm sido alvo de discussões pelo potencial de desenvolvimento de resistência microbiana para o homem, gerando seu banimento como promotores de crescimento na União Europeia (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003). Esta postura também se reflete no Brasil com a limitação de alguns princípios ativos e a manutenção de outros, como a Colistina e a Lincomicina. Além da resistência cruzada, é importante que a discussão do banimento e restrição do uso de antibióticos promotores de crescimento amplie o debate sobre o papel desses produtos na saúde e equilíbrio intestinal após o período de desmame, aspectos “muito importantes” na produção animal.

A utilização de antimicrobianos Gram-negativos específicos como o Sulfato de Colistina, tem sido uma das principais estratégias para reduzir o aparecimento da diarreia no período de realimentação dos animais. O Sulfato de Colistina é uma Polimixina E cujo espectro de ação é a seletividade sobre bacilos entéricos Gram-negativos, em especial sobre a *Escherichia coli*. O mecanismo de ação está relacionado com seu caráter anfipático, atuando como detergentes catiônicos simples sobre a membrana externa e citoplasmática. Dessa forma, as moléculas de Colistina ligam-se aos componentes fosfolípidos e lipopolissacarídeos do envelope celular das bactérias, alterando o balanço entre os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e

promovendo a ruptura das membranas, causando a morte celular da bactéria (MENDES; BURDMANN, 2009). A Colistina, portanto, tem ação bactericida sobre estes patógenos, reduzindo sua população na microbiota intestinal e favorecendo, dessa forma, a integridade de funcionamento das proteínas constituintes das junções de oclusão (*tight junctions*), as zônulas de oclusão, ocludinas e claudinas (SUZUKI, 2013), reduzindo a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, a incidência da diarreia aquosa.

Recentemente, um dos maiores problemas do uso da Colistina como antibiótico terapêutico foi o desenvolvimento de resistência bacteriana das cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas. Um estudo avaliando a resistência bacteriana das cepas de *Escherichia coli* encontradas em granjas comerciais de leitões com doença clínica na região de Minas Gerais (64 isolados) mostrou que o uso da Colistina teve uma resistência de 28,13% (COSTA et al, 2010). Outro estudo realizado com 144 amostras isoladas de *Escherichia coli* de leitões diarreicos, apontou que somente 55,26% das bactérias isoladas foram sensíveis ao uso de Colistina e, embora esse número seja muito superior, por exemplo, ao uso da Lincomicina (10,52%), foi muito inferior ao uso do Florfenicol (89,47%) e do Cefotiofur (84,21%) (MACÊDO et al., 2007). A dúvida quanto a crescente resistência bacteriana para o uso da Colistina se intensificou à medida que a mesma tem paralelamente um papel promotor de crescimento seletivo frente à esta resistência. A questão que fica em aberto é se um antimicrobiano utilizado em doses inferiores à terapêutica é eficiente na redução da pressão de desafio e modulação da presença desta bactéria no TGI dos leitões ao desmame e que coabitam em uma granja cuja resistência já é evidenciada ou, pior, se essa utilização em níveis de promotores deste antimicrobiano pode acelerar ou determinar o desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli* resistentes a esta substância, uma vez que o potencial de transposição e integração desta bactéria é comprovadamente elevado, assim como a resistência associada aos plasmídeos (COSTA et al., 2009).

Os antimicrobianos essencialmente Gram-positivos têm pouca ou nenhuma ação sobre as bactérias Gram-negativas. Por exemplo, a Lincomicina, que é uma lincosamida isolada de culturas de *Streptomyces lincolnensis*, embora sejam ativas contra bactérias Gram-positivas, micoplasmas e bactérias anaeróbicas, não tem atividade contra as Gram-negativas aeróbicas, como a *Escherichia coli*, não sendo indicada, portanto, para o período de pós-desmame. Um de seus efeitos adversos inclusive está relacionado com o desequilíbrio da microbiota intestinal, com conseqüente aumento das bactérias resistentes, como cepas de *Clostridium*, podendo causar diarreia aquosa a hemorrágica em animais mais sensíveis à ação

desta substância, como os equinos, as cobaias e o homem (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2006). Sua ação como promotor de crescimento, portanto, vai estar mais direcionada à redução da pressão de desafio das bactérias sensíveis a este antimicrobiano.

Já os antibióticos de amplo espectro quando usados terapêuticamente podem influenciar na dinâmica de exclusão competitiva das bactérias comensais do organismo, uma vez que suas ações se dão sob um grande número de microrganismos, podendo levar a um desequilíbrio da microbiota normal do animal, com depressão dos aspectos positivos da microbiota. Este é um dos efeitos indesejáveis de muitos dos antibióticos usados tanto na alimentação animal como em humanos, a ação sobre a microbiota normal do organismo, que pode ter um efeito mínimo e adequado sobre os patógenos ou um efeito incomum e deletério também sobre a microbiota. Efeito este que se torna mais comum quando não são respeitadas as doses de segurança ou o período total (máximo e mínimo) de tratamento (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2006). Neste ponto, cabe destacar a ação destes antibióticos de amplo espectro como responsáveis mais incisivos no desenvolvimento da resistência bacteriana do que os antibióticos seletivos como a Colistina (WHITE; FEDORKA-CRAY; CHILLER, 2006).

Os antimicrobianos como promotores de crescimento devem fornecer um meio no qual a microbiota consiga manter seu equilíbrio dinâmico, mesmo em momentos de situação de estresse, como o desmame, permitindo que se tenha uma redução da população de bactérias patogênicas e de suas toxinas, minimizando a utilização de nutrientes essenciais pelas bactérias, aumentando a síntese de vitaminas e de outros fatores para a manutenção do funcionamento regular do TGI, além da redução das perdas energéticas pela menor fermentação microbiana intestinal (DIBNER; RICHARDS, 2005). Com a proibição de sua utilização, grande parte das pesquisas envolvendo a nutrição e a sanidade de leitões na União Europeia começaram a se dedicar a alternativas para a manutenção do equilíbrio dinâmico da microbiota após o desmame. Para alcançar as mesmas condições proporcionadas pelos antimicrobianos, é preciso olhar para o que o animal está comendo neste período de realimentação e também para os períodos subsequentes, fazendo com que o TGI e a microbiota possam processar estes nutrientes sem causar um desequilíbrio fisiológico, metabólico ou na população microbiana, desfavorecendo o aparecimento e a proliferação de patógenos (BEDFORD, 2000; HEO et al., 2013; MATEOS; LÁZARO; MEDEL, 2000; STEIN, 2002).

2.1.6 A Composição da Dieta e a Prevenção de Desordens Intestinais em Leitões no Pós-Desmame

Um dos aspectos primordiais na produção de leitões sem a utilização de antimicrobianos promotores de crescimento corresponde às condições de ambiência e sanidade a que os animais são submetidos. O uso de substitutos aos antimicrobianos não devem sugerir simplesmente que uma troca de produtos moduladores da flora intestinal promova a ação destes na supressão do crescimento e presença de patógenos, pois, estes têm um poder notadamente inferior aos antimicrobianos para estes objetivos. Dessa forma, a produção de leitões sem o uso de antimicrobianos deve ser entendida como uma mudança no modo de produção suinícola, que envolve atribuir a importância devida a manejos simples, à nutrição e, também, ao uso de moduladores da microbiota, como os prebióticos (LALLÉS et al., 2007).

Manejos simples como a limpeza e desinfecção, “todos dentro todos fora” ou vazio sanitário que garante redução da pressão de desafio, vacinação eficiente e de qualidade, fornecimento de água limpa e potável, preservação do espaço mínimo requerido para o leitão, manutenção do ambiente limpo e seco e com qualidade do ar garantida, além de uma temperatura de conforto térmico de acordo com a idade e a condição fisiológica dos leitões, períodos de desmame que permitam uma redução do estresse e um menor período de jejum são as maneiras mais econômicas e eficientes para um desmame com menores desafios entéricos, sendo divisores para o sucesso ou não do processo (MADEC; ROSE-AFSSA, 2007; STEIN, 2002).

Nutricionalmente, as proteínas, fibras, energia, cálcio, fósforo, zinco, cobre e outros nutrientes podem representar o ponto de equilíbrio entre saúde intestinal e produção animal, pois, a composição alimentar tem interferência preponderante no perfil da microbiota do TGI, influenciando decisivamente a prevalência de desordens intestinais e a incidência de diarreia, garantindo que o leitão possa retomar seu crescimento efetivo após o jejum imediato (WU et al., 2015).

2.1.6.1 Proteínas

Talvez a maneira mais simples de reduzir a incidência de diarreia seja oferecer ao animal dietas com menor nível de proteína, em torno de 18%. As proteínas (e leia-se também

aminoácidos (AA), quando em excesso no lúmen intestinal, podem ser determinantes para a modulação indesejável da microbiota dos leitões (STEIN, 2002). Proteínas provenientes de fontes endógenas ou da dieta podem ser usadas como substrato para a fermentação bacteriana do TGI que ocorre no intestino grosso distantes das regiões intestinal onde a proporção de carboidratos fermentáveis é menor. Neste processo fermentativo, uma fração de AA e peptídeos também podem sofrer fermentação no intestino delgado. A fermentação proteica é realizada por bactérias proteolíticas e este processo gera, além de ácidos graxos, muitos compostos tóxicos, como a amônia e algumas aminas (WILLIAMS et al., 2005). A amônia produzida pode ser metabolizada pelo fígado ou ser utilizada como substrato para o crescimento bacteriano a partir da utilização de energia proveniente da fermentação de carboidratos. É um dos principais componentes do odor das fezes dos suínos e sua concentração no intestino delgado provém do balanço entre a desaminação dos AA e a síntese proteica bacteriana (OTTO et al., 2003). As aminas são produzidas pela descarboxilação dos AA por um grande número de bactérias e, quando produzidas desordenadamente, também podem ser responsáveis pelo aumento da incidência de diarreia (RIST et al., 2013).

O desmame desencadeia uma cascata de fatores que, em última análise, levam a uma modificação na população microbiana do TGI, que favorece o crescimento de bactérias Gram-negativas aeróbicas, como a *Escherichia coli*, em detrimento de bactérias produtoras de ácido láctico, como os Lactobacilos. As dietas de desmame geralmente possuem um percentual de proteína, AA e energia elevados como forma de compensar o baixo consumo dos animais. Entretanto, níveis mais elevados de nutrientes para leitões em fase de realimentação levam a perdas, uma vez que uma quantidade de proteína e aminoácidos não sofre processos enzimáticos e absorção, não sendo aproveitados pelo animal, servindo de substrato para as bactérias e desencadeando a formação de compostos tóxicos (LIBAO-MERCADO et al., 2009). Outra característica é a redução da presença dos Lactobacilos que favorece ainda mais o meio para a proliferação de bactérias patogênicas como as *Escherichia coli* enterotóxicas. As fontes proteicas quando são de elevada digestibilidade exercem uma influência positiva para os leitões. A caseína neste caso é um bom exemplo, sendo praticamente toda digerida e absorvida, não permanecendo no lúmen para o processo de fermentação (KOMURA et al., 2014). Em contrapartida, fontes proteicas de origem vegetal são menos digestíveis, uma vez que as enzimas digestivas para este tipo de substrato não estão sendo produzidas em quantidades suficientes, fazendo com que um excesso deste tipo de fonte proteica na dieta possa servir de substrato para a fermentação bacteriana (RIST et al., 2013).

Dessa forma, uma redução na fração proteica total da primeira ração oferecida ao leitão podem diminuir a contagem de coliformes e melhorar a relação lactobacilos/coliformes nas fezes e diminuir a incidência de diarreia nos primeiros dias pós desmame (GARCÍA et al., 2014; HEO et al., 2008; NYACHOTI et al., 2006; PIEPER et al., 2012). Mas, para que essa redução tenha o efeito desejado sobre a microbiota e as características fecais, esta ração deve ser suplementada com aminoácidos sintéticos a fim de oferecer ao leitão o substrato necessário para seu completo desenvolvimento, não só intestinal, mas também muscular (PLUSKE, 2013). Esta redução também não pode ser tão severa a ponto do animal não conseguir demonstrar seu potencial de crescimento, já que o leitão modifica seu metabolismo de aminoácidos para o desenvolvimento do TGI, podendo levar à uma redução em seu crescimento muscular caso a redução proteica ou a oferta de aminoácidos essenciais (e não essenciais) seja reduzida drasticamente (DENG et al., 2009; YUE; QIAO, 2008).

Outro aspecto que envolve a utilização de proteína para a promoção da saúde intestinal são as chamadas “proteínas funcionais”, que além de fornecer aminoácidos para o crescimento do animal, também desempenham funções específicas sobre seu metabolismo. No caso das proteínas funcionais para leitões ao desmame, o principal expoente é o plasma sanguíneo desidratado, composto por imunoglobulinas, peptídeos e fatores de crescimento com funções reconhecidamente imunes e de estímulo de consumo para os leitões. A fração proteica do plasma é de alta digestibilidade, evitando que o mesmo seja utilizado como substrato para fermentação. Ainda em relação à ação sobre a microbiota, o uso do plasma é capaz de proteger contra infecção induzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica, por seu papel como colaborador para a manutenção da mucosa intestinal, ativador do sistema imune (principalmente de mucosa) e redução da expressão de mediadores inflamatórios causados pela *Escherichia coli* no intestino. Em ratos, ficou demonstrado que o plasma é capaz de modular a função e a estrutura das funções de barreira da mucosa intestinal de animais desafiados com enterotoxina estafilocócica (MORETÓ; PÉREZ-BOSQUE, 2009). Mesmo fontes alternativas de plasma, como de frango, parecem ter excelente resposta sobre a estimulação do sistema imune, preservação da mucosa intestinal e modulação da microbiota (ZHANG et al., 2015). O plasma também favorece o consumo sob as condições de estresse do desmame, fazendo com que a realimentação seja mais vigorosa (ABREU et al., 2010), mesmo que estes leitões estejam sob condições de desafio (VAN DIJK et al., 2002) ou que sejam desmamados precocemente (14 dias) (GATTÁS et al., 2008).

2.1.6.2 Fibras Alimentares

No Brasil, o uso de fibras dietéticas para leitões ainda é bastante insipiente, sobretudo, porque a base das rações para monogástricos em geral é composta de milho e farelo de soja. Para leitões, essas matérias primas sofrem processamentos, como a gelatinização do milho e a extrusão, a micromoagem, ou a purificação da soja. Também são usados o leite de vaca e seus derivados, como o soro, a lactose e subprodutos oriundos da fabricação de bolacha. Neste sentido, o percentual de fibra bruta em uma ração para leitões ao desmame é baixo, geralmente em torno de 2 a 3%. Na maioria dos países da União Europeia, esta situação é diferente, sendo a base das rações para monogástricos compostas por trigo, sorgo, cevada, arroz, aveia e outros cereais, o que para leitões, quando passam por seleções específicas e processamentos, tem sua digestibilidade e palatabilidade melhoradas. Da mesma forma, são usados o leite e seus derivados e algumas proteínas vegetais de alta digestibilidade, como a da batata. A porção de cereais utilizadas na elaboração destas rações confere um percentual de fibra bruta em torno de 3,5 a 5% nestas dietas.

Entretanto, é preciso diferenciar a fibra bruta obtida quimicamente por tratamento ácido e alcali das fibras dietéticas ou alimentares, que correspondem a qualquer substância, fibrosa ou não, que não são hidrolisadas pelas enzimas do TGI, mas podem sofrer ação fermentativa das bactérias parcial ou total no intestino grosso. Neste sentido, compõe o conceito de fibras alimentares os polissacarídeos não amiláceos e a lignina, mas também algumas substâncias que são fisiologicamente semelhantes às fibras, os amidos resistentes, a inulina e também alguns prebióticos. Os PNAs, apesar de serem polissacarídeos, diferem do amido pelas ligações químicas entre seus açúcares, evitando a digestão normal pelas enzimas do TGI dos mamíferos, são constituídos pela pectina, celulose, hemicelulose, goma e mucilagem; A lignina não é um polissacarídeo, mas um polímero de fenilpropil álcool e ácidos. Dessa forma, as fibras se classificam em insolúveis ou não fermentáveis, que são a lignina, hemicelulose e celulose, e que tem como principais características aumentar o bolo fecal e reduzir o tempo de passagem da digesta; e solúveis, fermentáveis ou viscosas, compostas pela pectina, goma, mucilagem e alguns tipos de hemicelulose, e que tem como principais características retardar o esvaziamento gástrico e desacelerar a absorção da glicose. Estas últimas são prontamente fermentáveis pelas bactérias do intestino grosso (BRITO et al., 2009).

Quando se trabalha com a alimentação de leitões, a composição dos ingredientes, especialmente os não totalmente digeríveis, como as fibras alimentares têm grande influência sobre a microbiota, uma vez que estes compostos permanecem no lúmen intestinal e servem como substrato para sua fermentação e, conseqüentemente, crescimento (FLINT et al., 2008; PIEPER et al., 2009). Um dos produtos da fermentação microbiana das fibras no intestino grosso são os SCFA (ácidos graxos de cadeia curta), como o butírico, láctico, propiônico, acético, considerados benéficos para a mucosa intestinal e para o equilíbrio dinâmico do TGI, sendo que cada SCFA apresenta uma especificidade de ação. Estas ações incluem o fornecimento de energia para as células do epitélio e tecidos adjacentes, redução do processo inflamatório imunomediado, acidificação do meio para reduzir o crescimento de bactérias patogênicas e estímulo à proliferação celular (BLAUT; CLAVEL, 2007; RICHARDS; GONG; LANGE, 2005), além de ações específicas, como a modulação das junções de oclusão (*tight junctions*) via proteínas-quinases pelo ácido butírico (PENG et al., 2009).

Com base nestes conceitos, a adição de fibras para rações de leitões envolve uma nova abordagem de funcionalidade e, como ocorrem com as proteínas, a adição de fibras alimentares pode levar a um melhor desempenho e promover grandes alterações benéficas à microbiota intestinal e à sua ação fermentativa (HERMES et al., 2009) principalmente quando a inclusão é de fibras insolúveis (MATEOS; LÁZARO; MEDEL, 2000).

Este tipo de fibra influencia a composição taxonômica e o metabolismo da microbiota intestinal, principalmente pelo tipo de fibra e sua conseqüente interferência no fluxo de nutrientes no TGI (METZLER-ZEBELI et al., 2010). Dessa forma, em termos de ingredientes fibrosos que podem ser usados para leitões no período de pós desmame, níveis moderados de farelo de trigo ou aveia na dieta pós desmame são indicadas já que podem aumentar o consumo destes animais (MOLIST et al, 2009).

Também a utilização de aveia e cevada diminuem a incidência de diarreia e podem exercer o papel de fibras funcionais (STEIN; KIL; ROTH, 2013). Por outro lado, a pectina, quando comparada com fontes de fibra insolúveis, não parece ter efeitos benéficos sobre o desempenho e a morfologia intestinal dos leitões, enquanto que as fontes insolúveis podem influenciar decisivamente as funções intestinais principalmente pelo aumento da produção de mucina e, conseqüentemente, maior proteção da mucosa intestinal (HEDEMANN et al., 2006).

De maneira geral, todos os bons resultados relacionados com a utilização de fibras funcionais estão relacionados com a modulação da microbiota no intestino grosso, com uma

prevalência maior de Lactobacilos, melhor relação total deste com a *Escherichia coli* e, conseqüentemente, uma maior produção de SCFA, em especial o ácido butírico (BIKKER et al., 2006; HERMES et al., 2009; METZLER-ZEBELI et al., 2010). Estas respostas benéficas sobre o TGI também fazem parte da ação dos prebióticos (HOUDIJK et al., 2002), mas estes também são referidos na estimulação e modulação do sistema imune sérico e de mucosa (MA et al., 2014; XIONG et al., 2015).

2.2 ADITIVOS COMO ALTERNATIVAS AOS ANTIMICROBIANOS – PREBIÓTICOS

A atenção dedicada ao nível de proteína ou de fibra das dietas para leitões em determinadas situações, especialmente aquelas em que há desafio sanitário, desmames com idades muito precoces, baixo ou nenhum estímulo de consumo na maternidade e outros fatores que impactam diretamente na condição fisiológica e imune do animal, pode não ter o efeito desejado sobre às expectativas de desenvolvimento e aparecimento de diarreia em leitões no período pós-desmame (WU et al., 2015).

Neste sentido, a UE vem buscando alternativas aos antimicrobianos que possam funcionar como estimuladores de apetite, moduladores da microbiota e, principalmente, do sistema imune local do TGI e sistêmico a fim de aumentar a proteção dos leitões e evitar a quebra do tênue equilíbrio dinâmico deste órgão. Entre estas alternativas, ácidos orgânicos, probióticos e prebióticos têm recebido grande atenção da pesquisa e avanços têm sido feitos principalmente quanto à descoberta da efetividade nas respostas frente a desafios e mecanismos de ação destes aditivos. A funcionalidade de cada uma destas alternativas em última análise recai sobre os benefícios para o TGI e a manutenção da saúde intestinal de leitões, mesmo após as modificações impostas pelo desmame (HAN et al., 2007; KUMAR et al., 2007; PATEL; GOYAL, 2012).

Os prebióticos podem ser considerados substâncias com benefícios indiretos, uma vez que sua ação predispõe a uma modulação da microbiota, seja como substrato de fermentação, seja como estimulador de mediadores quimiotáticos de mucosa, fazendo com que essa microbiota influenciada pela ação dos prebióticos possa ser responsável ou co-responsável pelos benefícios observados com o uso desses produtos (HOUDIJK et al., 2002).

A definição de prebiótico pressupõe que são ingredientes não digeríveis resistentes à acidez gástrica e à atividade enzimática da digestão, susceptíveis à fermentação bacteriana e

com habilidade de estimular o crescimento ou a atividade das bactérias benéficas da microbiota (GIBSON et al., 2004; LAPARRA; SANZ, 2010). De acordo com este amplo conceito, similar ao de fibras alimentares, diversas substâncias assumem o papel de prebióticos na alimentação de humanos, animais e também no preparo de alimentos, como a inulina, os derivados de oligossacarídeos (galacto, xilo, arábico, fruto, quitosan), manitol, lactulose, rafinose, maltodextrina e outras muitas substâncias capazes de oferecer benefícios à saúde intestinal (PATEL; GOYAL, 2012).

Os prebióticos influenciam o conteúdo de ácidos graxos voláteis (AGV), sendo que os SCFA (ácidos graxos de cadeia curta) estimulam a proliferação das bifidobactérias e dos lactobacilos e, como ácido butírico, fornecem energia para o crescimento do epitélio intestinal (HOUDIJK et al., 2002). Dentre os principais prebióticos utilizados para o desmame de leitões, os mananooligossacarídeos (MOS) têm sido amplamente estudados com resultados benéficos sobre a estimulação da microbiota e o desenvolvimento do animal (SHIM et al., 2005), reduzindo a incidência de diarreia (LUNA et al., 2015), diminuindo a incidência de salmonelose (HORTA, 2009) e sendo eficiente na substituição aos antimicrobianos (CORASSA; LOPES; BELAVER, 2012). Os galactooligossacarídeos e os frutooligossacarídeos apresentam bons resultados sobre a modulação das bifidobactérias e dos lactobacilos (KOLIDA; TUOHY; GIBSON, 2002; SMIRICKY-TJARDES et al., 2003) e sobre o aumento da produção de ácido lático e acético (ZIMMERMANN; BAUER; MOSENTHIN, 2001). Também são usados a lactulose, com benefícios similares (GIBSON et al., 2004), e a Inulina, com efeitos benéficos sobre a produção de AGV (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

2.2.1 Quitooligossacarídeos e Suas Aplicações Como Prebióticos

Um outro prebiótico que vem sendo recentemente muito estudado principalmente na China (MA et al., 2014; XIONG et al., 2015; XU et al., 2013; YIN et al., 2008) é o Quitooligosacarídeo (QOS), um composto produzido a partir da deacetilação das quitinas ou quitosanas, polissacarídeos abundantes na natureza, presentes na parede celular de fungos e no exoesqueleto de artrópodes e, em especial na China, de crustáceos. Os QOS são caracterizados pela degradação destes polissacarídeos por processos de hidrólise enzimática ou química, levando à formação de oligômeros ou monômeros com características importantes como a bioatividade (MONTILLA et al., 2013). A hidrólise química a partir de

ácidos fortes vem sendo amplamente utilizada pela indústria de modo geral para a obtenção do QOS, entretanto, este processo, além de ter grande potencial de poluição, acaba por gerar um QOS de baixa qualidade em função da redução em sua polimerização (HEALY; ROMO, BUSTOS, 1994).

Uma das alternativas para a produção do QOS a partir da quitina ou quitosana é a sua hidrólise enzimática, a partir de enzimas como a pepsina, pectinase, lisozimas, proteases, lipases, quitanases e quitosanases. Esta degradação, além de ser preferível à química pelas características acima expostas deste último processo, também permite uma maior estabilidade e controle sobre a hidrólise da quitina, obtendo-se produtos de melhor qualidade (JUNG; PARK, 2014). Para a degradação enzimática, uma grande quantidade de microrganismos, como bactérias e fungos, pode ser utilizada para a biofermentação e consequente ação catalítica enzimática, promovendo a quebra das moléculas de polissacarídeos em oligômeros e monômeros. Esses microrganismos produzem enzimas quitanases ou quitosanases capazes de quebrar as ligações glicosídicas entre os açúcares, que são as glicosidases hidrolases (HG), classificadas como enzimas de Atividade em Carboidratos (CAZy) (CANTAREL et al., 2009). Dentre os diversos microrganismos responsáveis por essa ação enzimática sobre a quitina e quitosana, os bacilos, lactobacilos, as aeromonas, os aspergilos e os termococos demonstram sua capacidade de promover ações enzimáticas específicas sobre as ligações glicosídicas permitindo a produção de uma grande variedade de QOS (JUNG; PARK, 2014).

Dessa forma, a caracterização do QOS se dá segundo sua fração de resíduos N-acetilados, grau de N-Acetilação, grau de polimerização, peso e distribuição molecular e sequência de N-Acetilação. E a partir da purificação e caracterização dos produtos formados pelas reações enzimáticas hidrolíticas de quebra das ligações glicosídicas, é possível caracterizar um QOS (AAM et al., 2010), tornando-o um produto que, graças a baixa viscosidade e boa solubilidade em pH neutro, pode ser usado largamente na composição de cosméticos, preservação de alimentos, na agricultura e, cada vez mais, explorado também na prevenção de saúde humana e animal (KIM; RAJAPAKSE, 2005).

Na alimentação animal, os resultados têm sido bastante promissores, principalmente em aves e suínos (LI et al., 2007; LIU et al., 2008). A principal resposta do QOS, assim como os outros prebióticos, é a modulação da microbiota, com redução da população de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Clostridium* (HAN et al., 2007; KUMAR et al., 2007) e um aumento na contagem de Lactobacilos nas fezes (LIU et al., 2008). Outro aspecto relevante do uso do QOS é a redução do processo inflamatório da mucosa intestinal determinado pela redução da

expressão das proteínas TLR4 (receptores de reconhecimento) e da calprotectina (muito usada como marcador para doenças inflamatórias intestinais) (XIAO et al., 2014). Quanto à morfologia intestinal, o QOS tem sido referenciado pelo aumento de vilosidades de criptas e melhora na relação vilos/cripta para níveis de QOS a partir de 100 mg/kg quando comparados com um grupo controle (LI et al., 2007; XU et al., 2013), mas podendo haver redução das profundidades de cripta quando este prebiótico está associado ao cobre (WANG et al., 2012). Em baixas dosagens (30 mg/kg), o QOS apresentou estímulo à resposta imune, mas as respostas sobre a mucosa intestinal, a modulação da microbiota e o desempenho dos animais não foram eficientes em comparação aos resultados encontrados com uma maior inclusão do prebiótico (XIONG et al., 2015).

De maneira geral, o melhor desempenho zootécnico dos leitões com o uso do QOS está associado à diminuição da incidência de diarreia no período imediatamente pós desmame (HAN et al., 2007; KUMAR et al., 2007; WANG, 2012; XU et al., 2013) e à ação sobre o sistema imune do organismo, com aumento na IgA sérica (MA et al., 2014; XIONG et al., 2015; YIN et al., 2008) e também na IgG e IgM e das interleucinas IL1, IL2 e IL6 (YIN et al., 2008), o que faz com que o QOS apresente resultados similares ou mesmo superiores quando comparados com os antimicrobianos promotores de crescimento (MA et al., 2014; YANG et al., 2012), indicando que esta substância pode ser promissora como alternativa na retirada destas drogas na suinocultura para enfrentar os desafios do desmame.

2.2.2 Quitooligossacarídeo produzido em Londrina

Para o QOS produzido pela Universidade Estadual de Londrina e utilizado neste trabalho, o processo de obtenção do produto compõe as etapas de: obtenção, quantificação e caracterização do fermentado rico em QOS.

Para a obtenção do QOS a partir da farinha de crisálida, foi utilizado para a fermentação a linhagem do *Bacillus subtilis* DP4, obtido no acervo microbiológico do DCTA, a qual foi usada para inocular 150mL de meio de cultura preparado de acordo com Itano (2006), contendo 7,10% de farinha de crisálida como única fonte de carbono adquirida na empresa Fiação de Seda BRATAC - Londrina-PR (**Tabela 1**), além de 2,84% de peptona como única fonte de nitrogênio. O pH foi ajustado para 9,60 com solução de NaOH 30% e o meio esterilizado em autoclave à 121°C, 1 atmosfera de pressão, durante 15 minutos e, posteriormente, cultivado à temperatura de 31 °C durante 96 horas, com agitação de 110rpm.

Após 96 horas, o meio de cultura fermentado foi misturado com o carbonato de cálcio na proporção de 2:1 (v/p) para, em seguida, passar por uma secagem em estufa com circulação de ar a 45 °C por aproximadamente 48 horas. Após esse período, o produto foi triturado para homogeneização e armazenado em sacos de polietileno (46 x 28cm), vedados e mantidos em câmara fria a 5 °C até sua utilização.

Tabela 1 – Composição centesimal da farinha de crisálida obtida junto à empresa Fiação de Seda Bratac – Londrina – PR.

Proteína Bruta (%)	52,66	Isoleucina (%)	2,18	Treonina (%)	2,62
Extrato Etereo (%)	27,17	Leucina (%)	3,75	Potássio (mg/kg)	7643,09
Cálcio (%)	0,11	Ác. Glut. (%)	6,75	Magnésio (mg/kg)	3266,75
Fósforo total (%)	0,69	Lisina (%)	3,47	Manganês (mg/kg)	nd
Alanina (%)	2,82	Cistina (%)	0,62	Zinco (mg/kg)	162,29
Arginina (%)	2,73	Metionina (%)	1,69	Ferro (mg/kg)	89,11
Ác. Aspart. (%)	5,88	Fenilalanina (%)	2,67	Cobre (mg/kg)	14,65
Glicina (%)	2,35	Tirosina (%)	2,91	Cobalto (mg/kg)	8,50

Fonte: Itano (2006).

Para o perfil enzimático, a determinação da atividade Enzimática Cx e C1, assim como a atividade amilolítica, lignolítica e quitinolítica, foram previamente determinadas por Quintana (2009), identificando a ação amilolítica e quitinolítica do fermentado.

O *Bacillus subtilis* DP4 permanece vivo em associação com o QOS, conferindo a este, característica também de probiótico associado, embora esta atividade probiótica sobre o organismo ainda não esteja definida para este tipo de produção. O que há é uma contínua ação quitinolítica deste microrganismo no produto (ITANO, 2006).

Como prebiótico na produção animal, o QOS produzido na Universidade Estadual de Londrina foi previamente testado por este mesmo autor em frangos de corte. Os resultados apontaram uma redução no consumo diário das aves, mas sem influência no GPD dos animais. Em relação ao estímulo do sistema imune das aves, Quintana (2009) identificou maior teor de óxido nítrico com o aumento da idade e uma produção mais acentuada de anticorpos contra a doença de Newcastle após a vacinação das aves para o uso do QOS,

entretanto não houve diferença para a quantidade de linfócitos e células fagocíticas no sangue das aves que foram alimentadas com este produto.

Para leitões, esse tipo de produção de QOS pela Universidade ainda não tem nenhum trabalho de referência zootécnica, sendo este, portanto, o primeiro trabalho zootécnico com suínos relacionado a esta metodologia de produção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o Quitooligossacarídeo (QOS) produzido pela Universidade Estadual de Londrina à base de um subproduto da indústria têxtil como prebiótico para leitões ao desmame.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a partir de um estudo de dose-resposta, o melhor nível de QOS que promova uma ação prebiótica para leitões recém-desmamados quanto à performance, à morfometria intestinal e presença e diferenciação de células somáticas na lâmina própria.

Avaliar a resposta do melhor nível identificado de QOS para leitões recém-desmamados frente a dois antibióticos de ação específica gram positivo e negativo, a colistina e a lincomicina respectivamente, quanto à performance, à morfometria intestinal, à presença e diferenciação de células somáticas na lâmina própria e ao desenvolvimento imune dos animais.

4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1 (Normas para submissão à Revista Semina Agrárias)

Quitooligossacarídeo para leitões ao desmame: uma avaliação do efeito dose-resposta sobre desempenho, vísceras e morfometria intestinal.

ARTIGO 2 (Normas para submissão de artigo à Revista Semina Agrárias)

Quitooligossacarídeo como substituto aos promotores de crescimento: Efeitos no desempenho, morfometria e imunidade de leitões desmamados.

4.1 ARTIGO 1

Quitooligossacarídeo para leitões ao desmame: uma avaliação do efeito dose-resposta sobre desempenho, vísceras e morfometria intestinal

Chito-oligosaccharide for weaning piglets: an evaluation of dose-response effect on performance, viscera and intestinal morphometry

Resumo: Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito dose-resposta do Quitooligossacarídeo (QOS) produzido pela Universidade Estadual de Londrina sobre o desempenho, morfohistometria e peso de órgãos de leitões ao desmame. Foram utilizados 72 leitões de genética Pen Ar Lan®, desmamados com idade média inicial de 23 dias e peso médio de $7,51 \pm 1,35$ kg. Os tratamentos consistiram em uma dieta base com os níveis de inclusão de 0, 50, 100 e 150 ppm de QOS. Para a avaliação visceral e morfohistométrica, 24 animais foram abatidos aos 31 dias de idade e peso médio de $11,01 \pm 1,25$ kg. Não houve efeito de regressão sobre o desempenho ou incidência de diarreia. Houve efeito de regressão polinomial positivo para peso do intestino grosso, altura de vilosidades de jejuno e profundidade de cripta no jejuno e íleo, e regressão polinomial quadrática para a relação vilos/cripta deste último segmento. Também se observou este tipo de regressão para lesões no epitélio intestinal e contagem de linfócitos no duodeno e eosinófilos no duodeno e também no íleo. De maneira geral, os níveis crescentes de QOS melhoraram a morfofisiologia intestinal e ativaram a células somáticas na lâmina própria do intestino dos leitões, entretanto, não houve influência sobre a performance produtiva dos animais, provavelmente, porque estes não foram submetidos a condições entéricas adversas. Frente a todos os parâmetros estudados, o nível de 100 ppm de QOS mostrou-se o mais promissor na modulação da microbiota intestinal para as condições propostas por este experimento.

Palavras-Chave: Creche. Diarreia. Prebiótico. Performance. Alternativa.

Abstract Abstract: The objective of this paper was to evaluate the dose-response effect of a Chito-oligosaccharide (COS) produced by Universidade Estadual de Londrina over performance, diarrhea episodes, visceral characteristics and morphometry. A total of 72 Pen Ar Lan® piglets were weaned at 23 days (23,40) and 7.51 ± 1.35 Kg of BW. The treatment was a basic diet plus inclusion of 0, 50, 100, 150 ppm of COS (100 mg/kg). To the visceral and morphometric evaluation, 24 animals were slaughtered at 31 days of age with 11.01 ± 1.25 kg of BW. No regression effect over the performance or diarrhea prevalence was observed. Positive polynomial regression effect was observed for large intestine weight, villus height of jejunum and crypt depth in the same organ and ileum and quadratic polynomial regression effect was observed for villus/crypt relation of ileum. The same regression effect was observed in the intestinal epithelium lesions and total amount of lymphocytes and eosinophils in the duodenum and, for this last cell, in the ileum too. In general, increasing levels of COS leads to better intestinal morphometry and activates somatic cells in the lamina propria in the piglets intestine, however, no influence was observed in productive performance of these animals, probably, due to the absence of enteric challenge conditions. Face to all studied parameters, the level of 100 ppm of COS showed to be the most promising on the gut modulation for this experimental condition.

Keywords: Nursery. Diarrhea. Prebiotic. Performance. Alternative.

Introdução

O uso indiscriminado de antibióticos na produção animal aumenta a probabilidade de seleção de patógenos resistentes (MORÉS, 2014), interferindo diretamente sobre a eficácia destes produtos para a saúde humana. Em face disso, a suinocultura mundial, em especial no continente europeu, vem procurando alternativas viáveis para a retirada dos antibióticos sem que haja uma redução severa no desempenho e na condição sanitária dos animais.

Neste sentido, os prebióticos figuram como substâncias bastante promissoras para a viabilidade da produção suínica, em especial para leitões, pois, tem grande impacto sobre o período mais crítico desses animais, o desmame (ROBERFROID et al., 2010). Mananoligossacarídeos e frutooligossacarídeos têm sido os mais estudados para esta categoria, entretanto, novos prebióticos têm figurado como substâncias potencialmente benéficas, como a quitosana, polissacarídeo abundante na natureza e que estão presentes na parede celular de fungos e no exoesqueleto de artrópodes, sendo estes as principais fontes de extração e produção do quitooligossacarídeo (QOS). No Brasil, entretanto, poucos são os estudos com a utilização deste produto para a nutrição animal.

A Universidade Estadual de Londrina, desde 2006, vem estudando um QOS produzido a partir de um subproduto da indústria de seda, a farinha de crisálida (ITANO, 2006). Com resultados bastante promissores em frangos de corte (QUINTANA, 2009), este produto tem grandes perspectivas de bons resultados sobretudo relacionados à saúde intestinal e à modulação do sistema imune para leitões, atribuído porque a ação prebiótica do QOS envolve a ativação de interleucinas, aumento da concentração sérica de imunoglobulinas, incrementando as respostas imunes e minimizando o processo inflamatório do intestino (HAN et al., 2007; MA et al., 2014; YIN et al., 2008).

Objetivou-se com este trabalho, através de um estudo de dose-resposta, avaliar a ação prebiótica do QOS para leitões recém-desmamados quanto à performance, morfometria intestinal, e a presença e a diferenciação de células somáticas na lâmina própria.

Material e Métodos

Preparação do Inócuo para produção do Quitoooligossacarídeo.

Produzido a partir de uma linhagem de *Bacillus subtilis* DP4, obtida no acervo microbiológico do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (DCTA), a qual foi usada para inocular 150 mL de meio de cultura preparado, segundo Itano (2006), contendo 7,10% de farinha de crisálida como única fonte de carbono, adquirida na Empresa Fiação de Seda BRATAC – Londrina-PR (**Tabela 1**), além de 2,84% de peptona como única fonte de nitrogênio. No meio o pH foi ajustado para 9,60 com solução de NaOH 30%, sendo esterilizado em autoclave à 121°C, 1 atmosfera de pressão, durante 15 minutos e, posteriormente, cultivado à temperatura de 31°C durante 96 horas, com agitação de 110 rpm.

Preparação do Fermentado rico em Quitoooligossacarídeo.

Para a produção do fermentado rico em quitoooligossacarídeos (QOS), o meio utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, sendo inoculado uma alíquota de 5% retirada a partir do inócuo previamente preparado e mantido sob as mesmas condições. Após cultivo de 96 horas foi feita a mistura do meio de cultura fermentado com a farinha de ostra comercial na proporção de 2:1 (v/p) e, em seguida, essa mistura foi seca em estufa com circulação de ar a 45 °C por aproximadamente 48 horas. Posteriormente, o produto foi triturado para homogeneização e armazenado em sacos de polietileno (46 x 28cm), vedados e mantidos em câmara fria a 5 °C até sua utilização.

A partir do produto seco foi determinado seu teor de matéria seca e a presença de QOS, que, respectivamente, foram de 94,84% e de 1,11 g/100g.

A preparação do inócuo, do fermentado e o produto final (QOS) utilizado neste experimento foram baseados na metodologia adaptada de Itano (2006).

Experimento.

O presente experimento foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina, sendo aprovado para seu desenvolvimento (CEUA 1883.2012.52).

Foram utilizados 72 leitões de genética Pen Ar Lan®, desmamados com idade média inicial de 23,4 dias e peso médio de $7,51 \pm 1,35$ kg. Os animais ocuparam 24 baias de estrutura metálica suspensa, com 1,5 m² de área, com piso ripado plástico, equipadas com lâmpada incandescente de 250 W para aquecimento, bebedouro tipo chupeta e comedouro tipo calha com quatro bocas.

As temperaturas mínimas e máximas médias da creche, registradas no período experimental, foram de $21,16 \pm 1,20$ °C e $29,71 \pm 2,44$ °C, respectivamente. A umidade relativa do ar média, pela manhã e pela tarde, foi de $78,25 \pm 6,0\%$ e $61,20 \pm 10,33\%$, respectivamente.

O desenho experimental foi de dose-resposta do uso do QOS, com os animais distribuídos em um delineamento experimental em blocos casualizados (de acordo com o peso inicial), nas dosagens crescentes de 0, 50, 100 e 150 ppm, com 6 repetições e 3 animais por unidade experimental, caracterizada pela baía para as variáveis de performance, e pelo animal como unidade experimental para as demais análises. O sexo dos animais não foi levado em consideração para o desenho estatístico por não ter influência nas análises propostas ($P > 0,05$), servindo apenas para a separação em baias de duas fêmeas e um macho na mesma proporção para cada dose estudada.

As exigências nutricionais dos animais e a composição dos ingredientes foram baseadas nas recomendações de Rostagno et al. (2011). As fases propostas para o experimento foram pré-inicial I (dos 23 aos 35 dias), pré-inicial II (dos 35 aos 50 dias) e inicial (dos 50 aos 63 dias de idade). Rações e água foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental. A ração base proposta foi formulada com os principais ingredientes milho, farelo de soja, soro de leite em pó e suplemento vitamínico e mineral, calculadas para serem isonutritivas. A inclusão do produto teste (QOS) foi substituída por um inócuo (carbonato de cálcio) para ajuste dos níveis de cálcio da ração para todas as dosagens estudadas, uma vez que o produto tem uma base cálcica de diluição (**Tabela 2**).

As variáveis de desempenho como ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e índice de diarreia foram avaliadas durante as três fases e também no período total do experimento.

A observação da ocorrência de diarreia foi feita diariamente através da avaliação da consistência das fezes, anotando o número do(s) animal(s) com o quadro clínico. A consistência das fezes foi classificada de acordo com Sobestiansky e Barcellos (2007): 1- fezes líquidas; 2- fezes cremosas; 3- fezes pastosas; 4- fezes normais. Para análise dos dados, a baía foi considerada a unidade experimental e se ao menos um animal apresentasse escore inferior a 3, a baía era considerada positiva para diarreia.

Para a avaliação do peso dos órgãos do trato gastrointestinal, anexos e avaliação morfométrica das vilosidades do intestino delgado foi selecionado um animal por baía, fêmea, aos 31 dias de idade, totalizando 24 animais, com peso médio de 11,01 kg. O animal escolhido foi de acordo com o peso vivo, sendo utilizado aquele que apresentou o peso mais próximo da média dos animais de cada bloco. O sacrifício dos animais foi precedido por insensibilização elétrica, seguido da sangria dos grandes vasos da região do pescoço. Após o abate, os animais foram eviscerados e o conteúdo removido para avaliação do peso relativo do estômago vazio, baço, fígado, intestino delgado, intestino grosso, comprimento do intestino delgado e sua relação com o peso relativo desse órgão.

Em seguida, foi coletado um fragmento do duodeno, jejuno e íleo médios. Os fragmentos intestinais, de aproximadamente 3 cm de comprimento, foram lavados em solução fisiológica e então

seccionados transversalmente e longitudinalmente para expor o lúmen intestinal. Após 24 horas na solução fixadora (formol 10%) os fragmentos foram lavados e imersos em álcool 70% e armazenados a temperatura ambiente. Os fragmentos foram recortados em amostras de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Em cada lâmina foram dispostas quatro secções semi-seriadas com 5 µm de espessura, obtidas com micrótomo American Optimal, sendo que entre uma secção e a subsequente foram desprezadas 30 secções (BERTOLETTO, 2005). Cortes de 5 µm de espessura foram corados com Hematoxilina & Eosina para avaliação histológica e com a coloração de Azul de Alciano para avaliação da densidade de células caliciformes. Um escore histológico foi estabelecido para comparar as alterações histológicas, no qual é estabelecida uma correlação entre o tipo e extensão da lesão e o seu grau de severidade (**Quadro 1**). O escore de lesão do segmento foi obtido pela multiplicação do fator de severidade (ou grau de severidade) da lesão e sua extensão determinada pela intensidade ou frequência observada. O escore de lesão do órgão foi obtido pela soma dos escores lesionais. O fator de severidade (ou grau de severidade) foi determinado como: 1 – lesões leves; 2 – lesões moderadas; 3 – lesões severas. A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) foi avaliada em três campos por animal e o escore foi: 0, sem lesão; 1, pequena extensão (25% da seção intestinal afetada); 2, extensão intermediária (50% da seção intestinal afetada); 3, grande extensão (75% da seção intestinal afetada). Cada seção intestinal era de 1 cm² (BRACARENSE et al., 2012).

A altura e profundidade de vilosidades foram mensuradas em 30 vilosidades escolhidas aleatoriamente utilizando o programa MOTIC Image Plus 2.0 ML[®] image analysis system (MOTIC Image Plus Motic Instruments, Richmond, Canada). O número de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos foram contados na região de lâmina própria, em três campos aleatórios por amostra utilizando a objetiva de 40x. Para contagem das células caliciformes foram escolhidos 30 campos aleatórios por amostra. As médias do escore lesional, morfometria intestinal, número de células caliciformes e células inflamatórias foram utilizadas para a análise estatística, sendo analisadas alturas de pelo menos 30 vilosidades por segmento, e tratadas as médias destas vilosidades como unidade experimental. Somente os vilos ligados à lâmina própria e com pontas bem definidas foram medidos.

Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância com derivação de polinômios (regressão) pelo pacote GLM do programa MINITAB 17. A comparação dos diferentes níveis com a ração base foi realizada pelo teste de Dunnet. A contagem de células somáticas foi submetida à transformação dos dados $(Y+0,5)^{1/2}$ e posterior avaliação paramétrica. *P* valores $\leq 0,05$ foram considerados significantes e *P* valores $\leq 0,10$ foram admitidos como tendência à significância.

Resultados

Os dados de desempenho durante os diferentes períodos de avaliação (**Tabela 3**) não apresentaram relação com a dose utilizada de QOS, assim como os diferentes níveis de QOS também não apresentaram diferença em relação ao grupo controle. Não foram observados episódios de diarreia no período.

Para o peso relativo dos órgãos e o comprimento do intestino delgado (**Tabela 4**), verificou-se um aumento linear para o peso relativo do intestino grosso relacionado com um aumento no percentual de QOS utilizado. Houve também uma redução no peso relativo do fígado ao se fornecer 100 ppm de QOS em relação ao tratamento controle.

A avaliação morfofisiológica das diferentes porções do intestino delgado (**Tabela 5**) apontou modificações na morfologia de jejuno e íleo em decorrência da utilização de diferentes níveis de inclusão do QOS na alimentação dos animais. Para o jejuno, os níveis crescentes de QOS aumentaram a altura de vilosidades e o número de lesões epiteliais linearmente, já a profundidade de criptas se relacionou com os níveis de QOS de maneira quadrática, ou seja, com um aumento na profundidade de criptas para os níveis de 50 e 100 ppm e uma redução para o nível de 150 ppm (**Gráfico 1**). No íleo, o número de células caliciformes reduziu conforme o nível de inclusão de QOS aumentou, o escore lesional e a relação altura de vilosidades/profundidade de criptas apresentou aumento até o nível de 100 ppm e redução para o nível de 150 ppm para este segmento. A resposta comparativa dos diferentes níveis de QOS frente à ração controle indicou que não foi observada diferença nos parâmetros estudados de morfohistometria intestinal e escore lesional.

A maior incidência de lesões para o uso do QOS na porção jejunal foi caracterizada por epitélio cúbico mais acentuado para o nível de 150 ppm e fusão de vilosidades com maior escore de lesões para o nível de inclusão de 100 ppm de QOS. Para o íleo, a maior incidência de lesões também foi caracterizada por epitélio cúbico e fusão de vilosidades, com escore de lesões mais acentuado para os animais do grupo controle em relação aos demais grupos teste (**Fotos 1 e 2**).

Para a contagem de células somáticas (CCS), os resultados do nível de inclusão de QOS (**Tabela 6**) indicam um aumento no total de linfócitos no duodeno e eosinófilos em duodeno e jejuno até o nível de 100 ppm, com redução a partir de 150 ppm de QOS. Ao se analisar os diferentes níveis de QOS na alimentação dos leitões, observa-se que o fornecimento de 100 ppm de QOS proporcionou maior ($P < 0,05$) contagem de células somáticas no duodeno em relação ao tratamento controle e no íleo foi observado mais plasmócitos ($P < 0,05$) para o fornecimento de 150 ppm de QOS em relação ao tratamento controle.

Discussão

O efeito do uso de prebióticos sobre o ganho de peso, consumo ou eficiência alimentar dos animais apresenta respostas muito variadas e pode não influenciar a resposta de leitões para os diversos tipos de prebióticos durante o período de creche, como mananoligossacarídeos (CORASSA; LOPES; BELLAVER, 2012; SANTOS et al., 2010; SILVA et al., 2012), frutoligossacarídeos (VISENTINI et al., 2008) e também quitooligossacarídeos (CHEN et al., 2009). Entretanto, para o QOS, muitos estudos também apontam melhora no ganho de peso e eficiência alimentar, tanto em aves (HUANG et al., 2005; LI et al., 2007) como em suínos (HAN et al., 2007; XU et al., 2013; WANG et al., 2012), com bons resultados, principalmente no período imediato ao pós-desmame. Esse efeito pronunciado no crescimento dos leitões parece estar relacionado com a capacidade de agir como agente seletivo de bactérias da microbiota intestinal, inibindo a proliferação de bactérias nocivas, como *E. coli* ou *Bacillus cereus* (HAN et al., 2007; KUMAR et al., 2007; XIAO et al., 2014), favorecendo também o desempenho em razão da redução da incidência de diarreia (HAN et al., 2007; XU et al., 2013; WANG et al., 2012). No presente experimento, não houve incidência significativa de diarreia, indicando baixo desafio sanitário e minimizando os efeitos benéficos do QOS.

Para o peso de vísceras, o aumento do peso relativo do intestino grosso pode estar relacionado com o efeito modulador do QOS sobre a microbiota, que leva a uma maior prevalência de bactérias ácido-láticas que fermentam esse oligossacarídeo e produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGVCC). A participação destes ácidos sobre o epitélio intestinal está relacionada com o aumento da proliferação celular e de sua atividade, levando, conseqüentemente, a um aumento do peso relativo desse órgão (ROBERFROID, 2002). Os prebióticos e os probióticos podem alterar o perfil de fermentação e produção de AGVCC e, mesmo quando comparados com antibióticos, promovem, entre outros fatores, aumento do peso relativo do intestino grosso, relacionado com benefícios de desempenho e saúde intestinal (GARCÍA et al., 2014).

A fermentação que ocorre no intestino grosso, entretanto, está primariamente ligada com os nutrientes da dieta, sobretudo, o nível proteico e o teor de fibras, que são importantes fatores de controle da composição e da atividade metabólica da microbiota, podendo interferir no pH de todo o trato gastrintestinal, determinando modificações na relação entre bactérias enteropatogênicas e produtoras de ácidos (RIST et al., 2013). No presente experimento, o nível proteico da ração anterior ao abate, pode ser considerado elevado (mais de 20%), enquanto o nível de fibra baixo (menos de 2,6%). Essa associação influencia negativamente a produção de AGVCC, pois gera metabólitos tóxicos para as bactérias lácticas, como a amônia. Neste cenário, de alta proteína e fibra em níveis baixos, embora a fermentação proteica possa determinar grande atividade fermentativa no intestino grosso, cólon e ceco, essa atividade não determina aumento no peso relativo deste segmento

(GARCÍA et al., 2014), pois, há aumento em volume pelo gás e metabólitos produzidos, mas não uma proliferação e aumento da atividade celular.

Quando há um incremento de carboidratos fermentáveis na ração, há uma redução da fermentação relacionada aos elevados níveis proteicos, e o processo de fermentação passa a ocorrer com estes carboidratos. Essa mudança de substrato, entre outros aspectos, favorece a proliferação e modulação de bactérias ácido-láticas e a produção de AGVCC (RIST et al., 2013; WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001). Neste sentido, a definição de prebiótico, e o quitooligossacarídeo se encaixa nesta categoria, pressupõe-se que são ingredientes não digeríveis, resistentes à acidez gástrica e à atividade enzimática da digestão, susceptíveis à fermentação bacteriana e com habilidade de estimular o crescimento ou a atividade das bactérias benéficas da microbiota (LAPARRA; SANZ, 2010). Essa diferenciação da atividade fermentativa da dieta no leitão pode ter contribuído para a modulação da microbiota e conseqüentemente para o aumento do peso relativo do intestino grosso quando se elevaram os níveis de QOS da ração. O QOS tem ação positiva no crescimento e diferenciação de bactérias ácido-láticas benéficas à saúde intestinal no ceco e colo, aumentando o número de bactérias totais nesses órgãos e diminuindo a quantidade total de *E.coli* e *Clostridium spp* (HAN et al., 2007), entretanto, no presente experimento, não foi realizada a quantificação e diferenciação da microbiota intestinal.

Outra explicação para o aumento do peso relativo do intestino grosso está associada à capacidade de modificação da estrutura celular do intestino pelos prebióticos, promovendo aumento na densidade celular e no número de células do cólon (HOWARD et al., 1993).

Em relação ao peso relativo do fígado, o menor peso deste órgão para animais que receberam 100 ppm de QOS em relação aos animais controles, pode estar relacionado com a fermentação do QOS e à redução da fermentação proteica e de seus metabólitos, sobretudo a amônia, reduzindo a metabolização hepática destes compostos que tendem a aumentar o peso relativo desse órgão em rações com elevado nível de proteína bruta (FERREIRA et al., 2006; HANNAS et al., 2000).

Para a morfometria intestinal, o efeito dos prebióticos sobre a seletividade das bactérias benéficas do trato gastrintestinal, com aumento da produção de AGVCC e redução de metabólitos tóxicos no lúmen intestinal, promovem uma modulação positiva da morfologia e morfometria intestinal, indicando aumento na altura de vilosidades e melhor relação de vilosidades/criptas em animais não-ruminantes (GARCÍA et al., 2014; SANTANA et al., 2012; SILVA; NÖRNBERG, 2003), assim como acontece com o QOS para leitões (HAN et al., 2007). No presente experimento, o jejuno, com grande atividade absorptiva do intestino, apresentou correlação direta entre a altura das vilosidades e os níveis crescentes de QOS, corroborando os resultados encontrados por Liu et al. (2008) que apontam 200 ppm de QOS com respostas benéficas sobre essas características, por Wang et al. (2012), que obtiveram respostas similares trabalhando com 100 ppm de QOS em nano-partículas,

e por Xu et al. (2013), que conseguiram estes resultados com níveis de QOS variando entre 500 e 1000 ppm.

Para o íleo, observou-se efeito quadrático para a relação vilosidades/criptas com ponto de máxima em 75 ppm de inclusão de QOS na alimentação dos leitões, resultados semelhantes aos encontrados por Liu et al. (2008), que trabalhando com 100 e 200 ppm de QOS na alimentação de leitões ao desmame, verificaram uma melhora na altura de vilosidades e na relação vilosidade/cripta em relação ao grupo não alimentado com este prebiótico. Também Xu et al. (2013) verificaram esta mesma resposta neste segmento intestinal, assim como aumento da relação vilosidade/cripta também para a porção duodenal com níveis entre 500 e 1000 ppm de QOS. Já Wang et al. (2012), não observaram quaisquer efeitos na morfologia intestinal de leitões alimentados com 200, 400 ou 600 ppm de QOS.

Observou-se também neste experimento aumento da profundidade de criptas do jejuno e íleo. Esses resultados não são frequentes quando se trabalha com prebióticos para leitões no pós-desmame (UTIYAMA et al., 2004; BUDIÑO et al., 2005; LIU et al., 2008; TUCCI et al., 2011), todavia é comum que as criptas se apresentem diminuídas quando se alimentam leitões com níveis de inclusão mais elevados deste prebiótico (500 a 1000 ppm) (XU et al., 2013) ou quando o QOS está associado ao cobre (WANG et al., 2012).

A profundidade de criptas é um parâmetro que deve ser considerado a partir de sua relação com a altura das vilosidades, pois, em conjunto são eficazes para a avaliação da integridade intestinal. A relação da altura das vilosidades com a profundidade de criptas determina a taxa de integridade e recuperação do tecido epitelial, em um processo de replicação celular caracterizado por atividades de mitose-migração-extrusão que mantém em curso a capacidade digestiva e absorptiva deste tegumento (PLUSKE; HAMPSON; WILLIANS, 1997). Um aumento na profundidade de criptas corresponde, entre outros fatores, a maior atividade proliferativa celular e ao caráter antigênico dos componentes da ração (HU et al., 2012).

Um aumento de profundidade de criptas em conjunto com uma diminuição da relação vilosidade/cripta indica que esta proliferação celular está ocorrendo para recompor os ápices das vilosidades (PLUSKE; HAMPSON; WILLIANS, 1997). Entretanto, a presença do QOS no lúmen intestinal como modulador da microbiota e consequente aumento da produção de ácidos graxos voláteis, pode estar estimulando esta atividade proliferativa como agentes tróficos na mucosa intestinal. Os agentes tróficos, e nesta classe, pode-se incluir os ácidos orgânicos, interagem com a mucosa, acelerando a atividade mitótica e aumentando o número de células e, conseqüentemente, o tamanho dos vilos (BLAUT; CLAVEL, 2007; RICHARDS; GONG; LANGE, 2005).

A prevalência de um número maior de lesões observada de acordo com a inclusão de QOS para o jejuno, e em níveis de 50 e 100 ppm para o íleo, pode estar associada à progressiva redução da presença das células caliciformes. As células caliciformes são responsáveis pela produção de mucina,

parte integrante da barreira de defesa intestinal, cuja polimerização garante proteção contra patógenos, enzimas, toxinas, desidratação e abrasões (VAN TASSEL; MILLER, 2011). Além disso, estudos recentes fazem referência à mucina como glicoproteína com 80% de carboidrato em sua constituição, servindo como substrato para bactérias ácido-láticas, funcionando como um prebiótico *like*. A redução das células caliciformes pode estar associada, hipoteticamente, à diminuição do estímulo agressor, à própria modulação da microbiota bacteriana ou pela ação de um substrato oligossacarídeo fermentável em substituição à mucina pelos *Lactobacillus spp*, levando a uma diminuição de sua produção e, conseqüentemente, do número de células caliciformes (KIYOHARA et al., 2012).

Para a presença de células de defesa na lâmina própria do intestino delgado, o aumento da contagem de células somáticas (CCS) no duodeno para o nível de inclusão de 100 ppm de QOS em relação ao controle indica que há uma mobilização celular do sistema imune, em especial, de linfócitos, além de uma modulação da resposta eosinofílica, que aponta uma resposta inflamatória típica aos estímulos comensais de bactérias benéficas à saúde intestinal, caracterizada pelo desenvolvimento de uma resposta de tolerância do epitélio intestinal. A capacidade de ativação do sistema imune pelos prebióticos tem sido relacionada com o efeito modulador da microbiota intestinal (HOLSCHER et al., 2012) e pelo estímulo ao sistema imune de diferentes formas e mecanismos de ação (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Dessa forma, tem-se o estímulo antigênico do próprio prebiótico ou da alteração na microbiota, que promovem, em um primeiro momento, via estímulo dos receptores de fator de crescimento epitelial (EGF-R), uma resposta celular inflamatória, desenvolvendo a barreira epitelial, modulando a secreção de muco e a produção de IgA intermediada por citocinas, estimulando a produção de peptídeos antimicrobianos e a produção de linfócitos intraepiteliais, culminando no mecanismo de ativação dos macrófagos (SILVA; NÖRNBERG, 2003). Entretanto, embora os prebióticos possam causar este estímulo direta ou indiretamente via alteração do perfil microbiano do intestino, essas bactérias benéficas, em especial os *Lactobacillus*, são capazes de estabelecer um mecanismo de segurança e seletividade dessa resposta inflamatória a partir de um reflexo de tolerância e supressão dessa cascata inflamatória frente a microrganismos não patogênicos e de reatividade frente a organismos patogênicos, que permitem que se tenha uma resposta positiva na morfometria intestinal do leitão, tolerando a presença de bactérias comensais e ativando a defesa imune para agentes patogênicos, mas mediante uma resposta mais efetiva já ativada (HARDY et al., 2013).

Recentemente, Xiao et al. (2014) identificaram que um dos mecanismos regulatórios da resposta imune relacionados ao uso de 300 ppm de QOS na alimentação de leitões desmamados pode estar associado à redução da expressão da proteína TLR4, que é uma proteína chave para o reconhecimento das bactérias comensais do intestino, mas que em um processo inflamatório sofre superexposição, e a um estímulo na expressão de mRNA das interleucinas IL-1 β e IL-6 na mucosa jejunal.

No íleo, o perfil de células somáticas se altera com aumento da presença de eosinófilos e redução da presença de plasmócitos desde o tratamento controle, entretanto, para o nível de inclusão de 150 ppm de QOS, há uma manutenção da contagem de plasmócitos próxima a do jejuno, demonstrando uma maior prevalência deste tipo de célula para este nível de inclusão de QOS em relação ao controle. Esta resposta pode significar uma manutenção da produção de anticorpos nesta região pela quantidade maior de QOS na alimentação dos leitões e que pode estar caracterizando um estímulo direto pela presença do QOS, ou indireto, pela modulação mais acentuada da microbiota (HOLSCHER et al., 2012).

A melhora na performance de desempenho de leitões sob ação do QOS está associada à digestibilidade dos nutrientes, a modulação da microbiota e também à menor incidência de diarreia e melhora no escore fecal dos animais (HAN et al., 2007; XU et al., 2013; WALSH et al., 2013). No presente experimento, o desafio entérico não foi observado nos animais, o que pode ter determinado um desempenho similar entre o grupo controle e os diferentes níveis de QOS. Neste sentido, cabe ressaltar que embora os diferentes níveis de QOS tenham apresentado maior peso de intestino grosso, aumento de vilosidades e maior taxa de proliferação celular além de ativação do sistema imune tecidual, o gasto energético não interferiu no desempenho dos animais, tanto para o ganho de peso como para a eficiência alimentar, podendo-se inferir que a ação moduladora e de estímulo imune local causada pelo QOS, na ausência de desafio sanitário, não comprometeu o desempenho dos animais.

A partir de todos os parâmetros avaliados no presente experimento, pode-se atribuir respostas mais positivas para níveis crescentes de utilização do QOS, com aumento de intestino grosso, maior mobilização de células de defesa locais, melhor resposta em altura de vilosidade, profundidade de cripta e sua relação.

Conclusões

Os níveis crescentes de quitoooligossacarídeo na alimentação de leitões melhoraram a morfofisiologia intestinal e ativaram a imunidade tecidual de leitões em creche, mas não influenciaram a performance produtiva dos animais, pois, estes não foram submetidos a condições entéricas adversas. Dentre os níveis propostos neste trabalho, o nível de 100 ppm mostrou-se o nível mais seguro para garantir uma resposta positiva sobre os parâmetros morfométricos e órgãos intestinais, prevenindo o aparecimento de lesões epiteliais verificadas sobretudo no jejuno com níveis crescentes deste prebiótico.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo patrocínio integral do projeto.

Tabela 1 – Composição centesimal da farinha de crisálida obtida junto à empresa Fiação de Seda Bratac – Londrina – PR.

Proteína Bruta (%)	52,66	Isoleucina (%)	2,18	Treonina (%)	2,62
Extrato Etereo (%)	27,17	Leucina (%)	3,75	Potássio (mg/kg)	7643,09
Cálcio (%)	0,11	Ác. Glut. (%)	6,75	Magnésio (mg/kg)	3266,75
Fósforo total (%)	0,69	Lisina (%)	3,47	Manganês (mg/kg)	nd
Alanina (%)	2,82	Cistina (%)	0,62	Zinco (mg/kg)	162,29
Arginina (%)	2,73	Metionina (%)	1,69	Ferro (mg/kg)	89,11
Ác. Aspart. (%)	5,88	Fenilalanina (%)	2,67	Cobre (mg/kg)	14,65
Glicina (%)	2,35	Tirosina (%)	2,91	Cobalto (mg/kg)	8,50

Fonte: Itano (2006).

Tabela 2 - Composição centesimal e nutricional calculada das rações experimentais para os períodos propostos, pré-inicial I (23 aos 35 dias), pré-inicial II (36 a 50 dias) e Inicial (51 a 63 dias).

Níveis de QOS (ppm)		Pré-inicial I				Pré-Inicial II	Inicial
		0	50	100	150		
Macro							
Milho	%	52,0	52,0	52,0	52,0	54,1	61,9
F Soja	%	18,0	18,0	18,0	18,0	20,0	31,0
Leite em pó desnatado	%	17,2	17,2	17,2	17,2	16,3	0,00
Plasma	%	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	0,00
Hemácias	%	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
Óleo Vegetal Refinado	%	2,00	2,00	2,00	2,00	1,43	1,40
Soro de leite	%	1,87	1,87	1,87	1,87	2,54	2,50
Protenose	%	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Calcário Calcítico 38%	%	0,80	0,80	0,80	0,80	0,77	0,70
Fosfato Bi cálcico 18,5%	%	0,79	0,79	0,79	0,79	0,84	1,50
Sal Moído	%	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
¹ Premix	%	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Sulfato de Cobre 25%	%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,07
L-Lisina	%	0,07	0,07	0,07	0,07	0,04	0,02
Relação QOS/Carbonato de Cálcio							
QTO	%	0,000	0,450	0,901	1,351	Idem à fase anterior	
Carbonato de Cálcio	%	1,351	0,901	0,450	0,000		
Níveis Nutricionais							
Proteína Bruta	%	20,8	20,8	20,8	20,8	20,6	19,3
Ex. Etéreo	%	7,50	7,50	7,50	7,50	6,90	3,83
Fibra Bruta	%	2,45	2,45	2,45	2,45	2,30	3,09
Umidade	%	9,91	9,91	9,91	9,91	10,48	11,3
Lactose	%	7,35	7,35	7,35	7,35	7,80	1,80
Lisina Total	%	1,34	1,34	1,34	1,34	1,28	1,18
Lisina digestível	%	1,20	1,20	1,20	1,20	1,14	1,03
Cálcio	%	0,94	0,94	0,94	0,94	0,89	0,71
Fosforo total	%	0,57	0,57	0,57	0,57	0,58	0,62
P.digestível	%	0,44	0,44	0,44	0,44	0,43	0,41
Energia Metabolizável	Kcal	3613	3613	3613	3613	3618	3349

*QOS: Preparado de Quitoooligossacarídeo (1,11%). A matriz do QOS não foi estimada para os níveis nutricionais das diferentes inclusões deste produto.

¹. Premix, níveis de garantia por kg do produto: Colina: 75.000 mg kg⁻¹, Vitamina A: 50.000 UI, Vitamina D3: 75.000 UI, Vitamina E: 9000 mg kg⁻¹, Vitamina K3: 975 mg kg⁻¹, Vitamina B1: 500 mg kg⁻¹, Vitamina B2: 1.200 mg kg⁻¹, Vitamina B6: 750 mg kg⁻¹, Vitamina B12: 8.000 mcg kg⁻¹, Niacina: 5.000 mg kg⁻¹, Ácido Pantotênico: 3.000 mg kg⁻¹, Ácido Fólico: 500 mg kg⁻¹, Biotina: 20.000 mg kg⁻¹, Ferro: 30.000 mg kg⁻¹, Cobre: 3.000 mg kg⁻¹, Manganês: 17.500 mg kg⁻¹, Zinco: 30.000 mg kg⁻¹, Iodo: 200 mg kg⁻¹, Selênio: 150 mg kg⁻¹, Fitase: 25000 U kg⁻¹.

Quadro 1 – Critérios Histológicos usados para estabelecer o escore de lesões intestinais.

Tipo de Lesão	Fator de Severidade	Extensão da Lesão	Escore Máximo
Dilatação de vasos linfáticos	1	0 a 3	38
Vacuolização celular	1	0 a 3	
Epitélio cúbico (enterócitos)	2	0 a 3	
Achatamento de vilosidades	2	0 a 3	
Fusão de vilosidades	2	0 a 3	
Edema intersticial	2	0 a 3	
Necrose apical de vilosidades	3	0 a 3	

O escore de lesão do segmento foi obtido pela multiplicação do fator de severidade (ou grau de severidade) da lesão e sua extensão determinada pela intensidade ou frequência observada. O escore de lesão do órgão foi obtido pela soma dos escores lesionais. O fator de severidade (ou grau de severidade) foi determinado como: 1 – lesões leves; 2 – lesões moderadas; 3 – lesões severas. A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) foi avaliada em três campos por animal e o escore foi: 0, sem lesão; 1, pequena extensão (25% da seção intestinal afetada); 2, extensão intermediária (50% da seção intestinal afetada); 3, grande extensão (75% da seção intestinal afetada). Cada seção intestinal era de 1 cm². **Fonte:** Bracarense et al. (2012).

Tabela 3 – Desempenho zootécnico de leitões alimentados com diferentes níveis de inclusão de quitooligossacarídeo (QOS) durante os períodos cumulativos de 23 aos 35, 50 e 63 dias de idade.

Parâmetros	Níveis de QOS (ppm)				Média	SE Média	R ²
	0	50	100	150			
<i>23 a 35 dias</i>							
Peso Inicial (Kg)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	0,25	-
Peso Final (Kg)	10,6	10,6	10,7	10,8	10,7	0,29	-
CDR (g)	458	474	454	502	472	10,40	-
GPD (g)	282	283	285	303	288	8,62	-
CA	1,63	1,67	1,59	1,66	1,64	0,03	-
<i>23 a 50 dias</i>							
Peso Final (Kg)	17,7	17,6	18,4	18,5	17,9	0,47	-
CDR (g)	634	659	652	689	658	12,8	-
GPD (g)	411	410	436	438	424	9,00	-
CA	1,54	1,61	1,50	1,57	1,55	0,02	-
<i>23 a 63 dias (Período Total)</i>							
Peso Final (Kg)	26,9	26,8	27,9	27,6	27	0,55	-
CDR (g)	809	825	821	850	826	12,5	-
GPD (g)	510	508	532	524	518	9,89	-
CA	1,59	1,62	1,54	1,62	1,6	0,02	-

CDR – Consumo diário de ração; GPD – Ganho diário de Peso; CA – Conversão Alimentar.

Tabela 4 – Peso Relativo dos órgãos estômago, fígado, baço, intestino delgado e grosso e comprimento de intestino delgado para os diferentes níveis de inclusão de quitooligossacarídeo (QOS).

Parâmetros	Níveis de QOS (ppm)				Média	SE Média	R ²	P
	0	50	100	150				
<i>Peso dos órgãos</i>								
Estômago (%)	0,86	0,86	0,84	0,83	0,85	0,02	-	0,950
Fígado (%)	2,3	2,4	2,1A	2,30	2,27	0,01	-	0,030 ¹
Baço (%)	0,22	0,25	0,22	0,26	0,23	0,04	-	0,530
Intestino Delgado (%)	5,50	5,30	5,46	5,10	5,34	0,11	-	0,595
Intestino Grosso (%)	2,14	2,24	2,48	2,58	2,36	0,08	0,97	0,160
<i>Comprimento</i>								
Intestino Delgado (m)	11,7	11,7	10,5	11,3	11,3	0,26	-	0,246

¹ - teste de Dunnet com nível de significância de 5%. Para a presença da letra A, valores estatisticamente diferentes do observado no grupo controle.

² - Equação: $y = 2,123 + 0,003152x$.

Tabela 5 – Morfohistometria do intestino delgado de leitões alimentados com níveis crescentes de quitoooligossacarídeo (QOS).

Parâmetros	Níveis de QOS (ppm)				Média	SE Média	R ² *
	0	50	100	150			
<i>Duodeno</i>							
Vilos (µm)	296	339	318	330	321	13,0	-
Cripta (µm)	260	239	272	246	254	7,22	-
Células Caliciformes (n)	8,3	7,7	10,3	10,8	9,3	0,53	-
Relação Vil/Crip	1,1	1,3	1,1	1,3	1,2	0,07	-
<i>Jejuno</i>							
Vilos (µm)	292	297	302	314	301	11,3	0,94 ¹
Cripta (µm)	212	238	241	215	226	7,30	0,99 ²
Células Caliciformes (n)	7,4	6,2	8,0	6,7	7,0	0,44	-
Relação Vilos/Cripta	1,5	1,5	1,3	1,5	1,5	0,07	-
<i>Íleo</i>							
Vilos (µm)	269	303	322	289	296	10,0	-
Cripta (µm)	172	178	191	193	183	6,82	0,93 ³
Células Caliciformes (n)	11,8	10,4	8,7	8,1	9,7	0,65	0,97 ⁴
Relação Vilos/Cripta	1,6	1,7	1,7	1,5	1,6	0,06	0,98 ⁵

Vilos – Altura de Vilosidade; Cripta – Profundidade de Cripta; NS – Não Significativo.

*R² de Regressão Polinomial Ortogonal para R² ajustado para efeito linear ou quadrático.

¹ Equação: $y = 283,5 + 7,1x$.

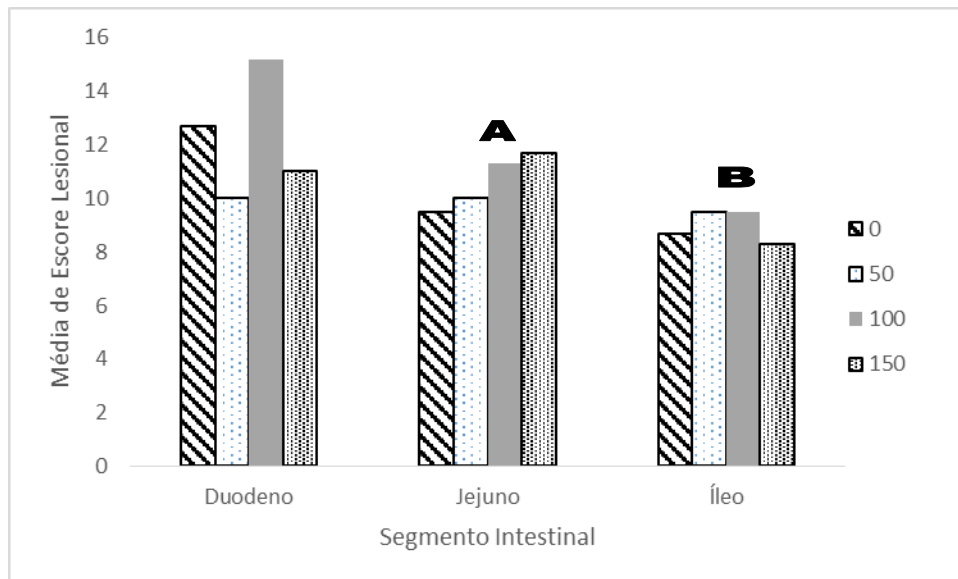
² Equação: $y = 158,5 + 66,2x - 13x^2$.

³ Equação: $y = 164,5 + 7,6x$.

⁴ Equação: $y = 12,95 - 1,28x$.

⁵ Equação: $y = 1,325 + 0,345x - 0,075x^2$.

Gráfico 1 - Relação entre o escore de lesões epiteliais* no duodeno, jejuno e íleo de acordo com os níveis crescentes de inclusão de QOS na alimentação de leitões.



*Escore de lesões epiteliais após exame histológico de acordo com a frequência e severidade das lesões no intestino delgado de acordo com Bracarense et al. (2012).

A – Equação: $y = 8,65 + 0,79x$. $R^2 = 0,955$.

B – Equação: $y = 6,8 + 2,38x - 0,5x^2$. $R^2 = 0,992$.

Tabela 6 – Contagem de Células Somáticas (CCS) epiteliais e suas diferenciações no Intestino Delgado de leitões alimentados com níveis crescentes de quitooligossacarídeo (QOS).

Parâmetros	Níveis de QOS (ppm)				Média	SE Média	R ²	P valor ¹
	0	50	100	150				
<i>Duodeno</i>								
CCS (n)	72,6	71,3	81,7 A	72,7	74,6	6,84	-	0,045 ¹
Linfócitos (n)	21,2	30,1	29,6	23,6	26,1	2,56	0,99 ²	0,540
Plasmócitos (n)	37,6	32,6	42,8	33,2	36,5	2,67	-	0,551
Eosinófilos (n)	13,9	8,7	9,3	15,9	11,9	1,60	0,99 ³	0,295
<i>Jejuno</i>								
CCS (n)	49,7	61,2	56,6	65,6	58,3	5,31	-	0,196
Linfócitos (n)	19,1	25,7	24,9	24,6	23,6	1,56	-	0,489
Plasmócitos (n)	14,6	23,9	17,0	18,5	18,5	1,88	-	0,410
Eosinófilos (n)	15,9	11,6	14,7	22,6	16,2	1,88	0,98 ⁴	0,224
<i>Íleo</i>								
CCS (n)	68,3	71,8	68,7	88,6	74,4	6,88	-	0,287
Linfócitos (n)	20,2	24,9	22,8	28,7	24,2	2,47	-	0,690
Plasmócitos (n)	7,8	9,2	7,4	19,7 A	11,0	1,61	-	0,011 ¹
Eosinófilos (n)	40,3	37,7	38,5	40,2	39,2	2,60	-	0,981

O número de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos foram contados na região de lâmina própria, em três campos aleatórios por amostra utilizando a objetiva de 40x.

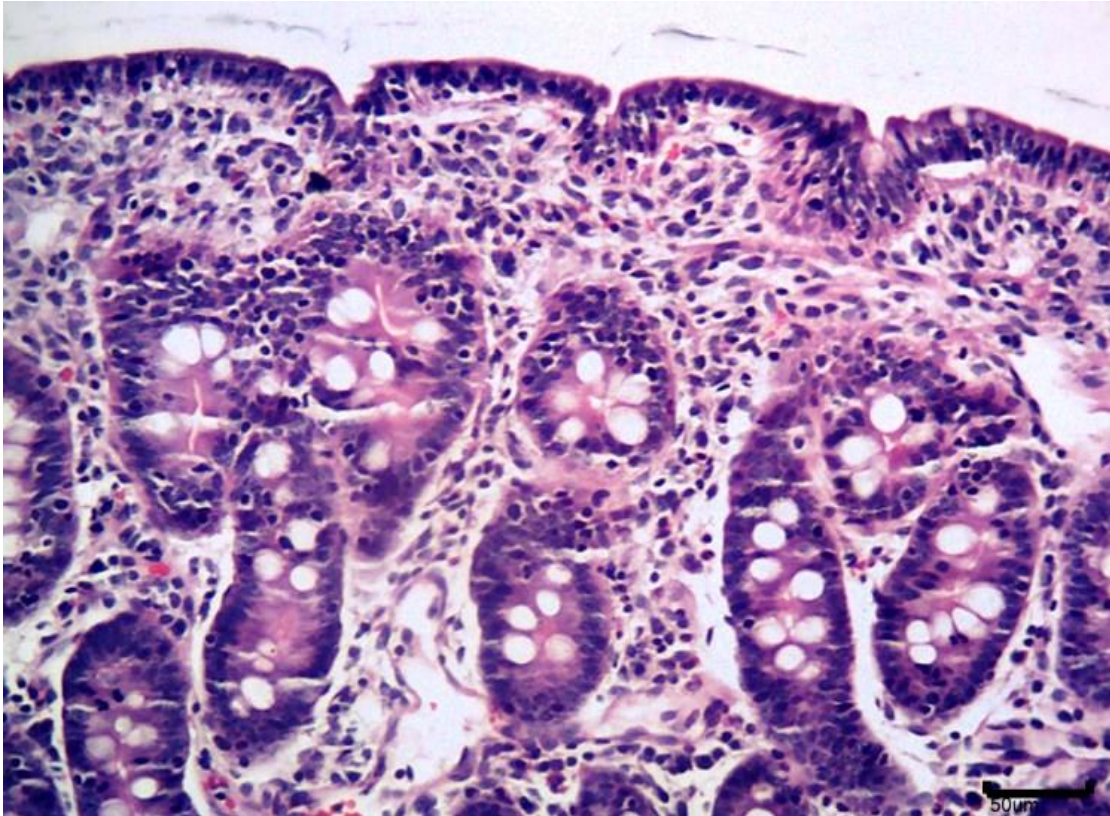
¹ P valor para o teste de Dunnet, sendo o nível 0 considerado o controle. Para a presença da letra A, valores estatisticamente diferentes do observado no grupo controle.

² Equação: $y = 5,825 + 19,295x - 3,725x^2$.

³ Equação: $y = 25,05 - 14,09x + 2,95x^2$.

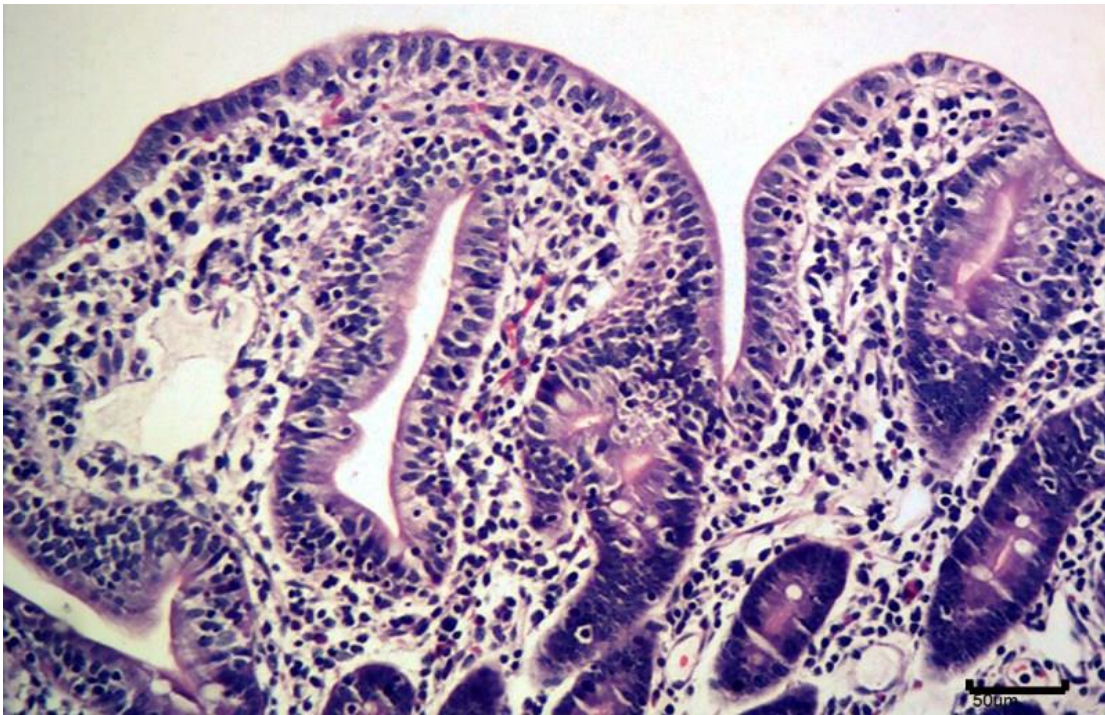
⁴ Equação: $y = 25,65 - 12,93x + 3,05x^2$.

Foto 1 – Epitélio Cúbico com achatamento de vilosidades.



Fonte: Elisângela Olegário da Silva.

Foto 2 – Fusão de Vilosidades.



Fonte: Elisângela Olegário da Silva.

Referências

- BERTOLETTO, P. R. *Estudo morfológico do intestino delgado de ratos na isquemia-reperfusão sob oxigenação hiperbárica*. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BLAUT, M.; CLAVEL, T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implication for health and disease. *The Journal of Nutrition*, Rockville, v. 137, n. 3, p. 751S-755S, 2007.
- BRACARENSE, A. F. L.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; PACHECO, G. D.; MOLL, W.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, v.107, p. 1776 – 1786, 2012.
- BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; NAKAGHI, L. S. O.; TUCCI, M. F.; FRAGA, A. L.; SCANDOLERA, A. J.; HUAYNATE, R. A. R. Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 921-929, 2005.
- CHEN, Y. J.; KIM, I. H.; CHO, J. H.; YOO, J. S.; WANG, Y.; HUANG, Y.; KIM, H. J.; SHIN, S. O. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and immune responses after lipopolysaccharide challenge in weanling pigs. *Livestock Science*, Melbourne, v. 124, n. 1-3, p. 255–260, 2009.
- CORASSA, A.; LOPES, D. C.; BELLAVER, C. Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos e probióticos para leitões de 21 a 49 dias de idade. *Archivos de Zootecnia*, Córdoba, v. 61, n. 235, p. 467-476, 2012.
- FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, R. F. M. D.; DONZELE, J. L.; ARAÚJO, C. V. D.; SILVA, F. C. D. O.; VAZ, R. G. M. V.; REZENDE, W. O. Redução da proteína bruta da ração e suplementação de aminoácidos para suínos machos castrados dos 15 aos 30 kg mantidos em ambiente de alta temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1056-1062, 2006.
- GARCÍA, K. E.; SOUZA, T. C. R.; LANDÍN, G. M.; BARREYRO, A. A.; SANTOS, M. G. B.; SOTO, J. G. G. Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets fed a low protein diet supplemented with probiotics. *Food and Nutrition Sciences*, Olsztyn, v. 5, n. 18, p. 1776-1786, 2014.
- HAN, K. N.; KWON, I. K.; LOHAKARE, J. D.; HEO, S.; CHAE, B. J. Chito-oligosaccharides as an alternative to antimicrobials in improving performance, digestibility and microbial ecology of the gut in weanling pigs. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, Korea, v. 20, n. 4, p. 556 – 562, 2007.
- HANNAS, M. I.; OLIVEIRA, R. F. M. D.; DONZELE, J. L.; FERREIRA, A. S.; LOPES, D. C.; SOARES, J. L.; MORETTI, A. M. Proteína bruta para suínos machos castrados mantidos em ambiente de conforto térmico dos 15 aos 30 kg. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 29, n. 2, 2000.
- HARDY, H.; HARRIS, J.; LYON, E.; BEAL, J.; FOEY, A. D. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*, Basel, v. 5, n. 6, p. 1869–1912, 2013.
- HOLSCHER, H. D.; FAUST, K. L.; CZERKIES, L. A.; LITOV, R.; ZIEGLER, E. E.; LESSIN, H.; HATCH, T.; SUN, S.; TAPPENDEN, K. A. Effects of prebiotic-containing infant formula on

- gastrointestinal tolerance and fecal microbiota in a randomized controlled trial. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, Silver Spring, v. 36, n. 1, S95-105S, 2012.
- HOWARD, M. D.; KERLEY, M. S.; GORDON, D. T.; PACE, L. W.; GARLEB, K. A. Effect of dietary addition of fructooligosaccharide on colonic microflora populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 71, n. 1, S177, 1993.
- HU, C. H.; GU, L. Y.; LUAN, Z. S.; SONG, J.; ZHU, K. Effects of montmorillonite-zinc oxide hybrid on performance, diarrhea, intestinal permeability and morphology of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 108–115, 2012.
- HUANG, R. L.; YIN, Y. L.; WU, G. Y.; ZHANG, Y. G.; LI, T. J.; LI, L. L.; LI, M. X.; TANG, Z. R.; ZHANG, J.; WANG, B.; HE, J. H.; NIE, X. Z. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. *Poultry Science*, Champaign, v. 84, n. 9, p. 1383–1388, 2005.
- ITANO, F. H. *Otimização da produção de quitinases de Bacillus spp.* 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- KIYOHARA, M.; NAKATOMI, T.; KURIHARA, S.; FUSHINOBU, S.; SUZUKI, H.; TANAKA, T.; SHODA, S.; KITAOKA, M.; KATAYAMA, T.; ASHIDA, H. K. α -N-acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in alternative mucin degradation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 287, n. 1, p. 693-700, 2012.
- KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N. Low molecular weight chitosans—preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Champaign, v. 1770, n. 4, p. 495-505, 2007.
- LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, London, v. 61, n. 3, p. 219-225, 2010.
- LI, X. J.; PIAO, X. S.; KIM, S. W.; LIU, P.; WANG, L.; SHEN, Y. B.; LEE, H. S. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on performance, nutrient digestibility, and serum composition in broiler chickens. *Poultry Science*, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1107-1114, 2007.
- LIU, P.; PIAO, X. S.; KIM, S. W.; WANG, L.; SHEN, Y. B.; LEE, H. S.; LI, S. Y. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of and in weaning pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2609-2618, 2008.
- MA, Y.; HUANG, Q.; LV, M.; WU, Z.; XIE, Z.; HAN, X.; WANG, Y. Chitosan-Zn chelate increases antioxidant enzyme activity and improves immune function in weaned piglets. *Biological Trace Elements Research*, San Diego, v. 158, n. 1, p. 45-50, 2014.
- MORÉS, N. É possível produzir suínos sem o uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho? In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 6., 2014, São Pedro. *Anais...* São Pedro: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122662/1/final7575.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, J. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, Amsterdam, v. 51, n. 1–3, p. 215-236, 1997.

QUINTANA, L. R. *Produção e caracterização de produto fermentado rico em quitooligossacarídeos: efeito na alimentação de aves*. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RICHARDS, J. D.; GONG, J.; LANGE, C. F. M. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 85, n. 4, p. 421-435, 2005.

RIST, V. T. S.; WEISS, E.; EKLUND, M.; MOSENTHIN, R. Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review. *Animal*, Cambridge, v. 7, n. 7, p. 1067-1078, 2013.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digest and Liver Disease*, Rome, v. 34, n. 2, p. S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, N. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B. Prebiotic effects metabolic and health benefits. *Brazilian Journal of Nutrition*, Campinas, v. 104, n. 2, p. S1–S63, 2010.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. GOMES, P. C., OLIVEIRA, R. F. M., LOPES, D. C., FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2011.

SANTANA, E. S.; ANDRADE, M. A.; ROCHA, T. M.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; JAYME, V. S.; BARNABÉ, A. C. S.; ALCÂNTARA, J. B. Performance of broilers experimentally inoculated with *Salmonella Typhimurium* and fed diets with addition of lactulosis. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 41, n. 8, p. 1884-1889, 2012.

SANTOS, V. M.; THOMAZ, M. C.; PASCOAL, L. A. F.; RUIZ, U. S.; WATANABE, P. H.; HUAYNATE, R. A. R.; SILVA, S. Z.; FARIA, H. G. Digestibilidade, desempenho e características morfofisiológicas do trato digestório de leitões desmamados sob dietas com mananoligossacarídeo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 45, n. 1, p. 91-105, 2010.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 983-990, 2003.

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

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. Monitoramentos clínicos. In: _____. *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone, 2007. p. 723-726.

TUCCI, F. M.; THOMAZ, M. C.; NAKAGHI, L. S. O.; HANNAS, M. I.; SCANDOLERA, A. J.; BUDIÑO, F. E. L. Efeito da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a estrutura e ultraestrutura do intestino delgado e sobre o desempenho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 63, n. 4, p. 931-940, 2011.

UTIYAMA, C. D.; OETTING, L. L.; GIANI, P. A.; RUIZ, U. S.; MIYADA, V. S. Efeito de agentes antimicrobianos probióticos, prebióticos e extratos vegetais sobre a morfometria dos órgãos de leitões recém desmamados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD-ROM.

VAN TASSELL, M. L.; MILLER, M. J. Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*, Basel, v. 3, n. 5, p. 613–636, 2011.

VISENTINI, P. R. S.; BERTO, D. A.; HAUPTLI, L.; PINTO, J. P. A. N.; TRINDADE NETO, M. A.; WECHSLER, F. S.; SCHERER, M. R. Adição de frutooligosacarídeos e olaquinox à dieta sobre o desempenho, microbiota intestinal e parâmetros sanguíneos de leitões desmamados. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 15, n. 3, p. 570-576, 2008.

XIAO, D.; WANG, Y.; LIU, G.; HE, J.; QIU, W.; HU, X. Effects of chitosan on intestinal inflammation in weaned pigs challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 9, n. 8, p. 104192 – 104199, 2014.

XU, Y.; SHI, B.; YAN, S.; LI, T.; GUO, Y.; LI, J. Effects of chitosan on body weight gain, growth hormone and intestinal morphology in weaned pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Korea, v. 26, n. 10, p. 1484, 2013.

WALSH, A. M.; SWEENEY, T.; BAHAR, B.; FLYNN, B.; O'DOHERTY, J. V. The effects of supplementing varying molecular weights of chitooligosaccharide on performance, selected microbial populations and nutrient digestibility in the weaned pig. *Animal*, Cambridge, v. 7, n. 4, p. 571-579, 2013.

WANG, M. Q.; DU, Y. J.; WANG, C.; TAO, W. J.; HE, Y. D.; LI, H. Effects of copper-loaded chitosan nanoparticles on intestinal microflora and morphology in weaned piglets. *Biological Trace Element Research*, Clifton, v. 149, n. 2, p. 184-189, 2012.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 207-228, 2001.

YIN, Y. L.; TANG, Z. R.; SUN, Z. H.; LIU, Z. Q.; LI, T. J.; HUANG, R. L.; RUAN, Z.; DENG, Z. Y.; GAO, B.; CHEN, L. X.; WU, G. Y.; KIM, S. W. Effect of galacto-mannan-oligosaccharides or chitosan supplementation on cytoimmunity and humoral immunity in early-weaned piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Korea, v. 21, n. 5, p. 723-731, 2008.

4.2 ARTIGO 2

Quitooligossacarídeo como substituto aos promotores de crescimento: Efeitos no desempenho, morfometria e imunidade de leitões desmamados.

Chito-oligosaccharide as growth promoter replacer: Effects on performance, morphometry and immune system of weaned piglets.

Resumo: Objetivou-se com este trabalho avaliar o Quitooligossacarídeo (QOS) frente a dois antibióticos utilizados como promotores de crescimento, a colistina e lincomicina, quanto ao desempenho, frequência de diarreia, características viscerais, morfometria e imunoglobulinas séricas, IgA, IgG e IgM. Foram utilizados 96 leitões de genética Pen Ar Lan®, desmamados com idade média inicial de 17 dias e peso médio de $5,33 \pm 0,369$ kg para avaliação de desempenho e imunoglobulinas séricas. Para a avaliação histológica e peso dos órgãos, foram utilizados 24 animais com idade de 35 dias e peso médio de $6,86 \pm 0,64$ kg. Os tratamentos consistiram em uma dieta basal acrescida de QOS (100 mg/kg), colistina 40 mg/kg e lincomicina 4,4 mg/kg. Para o desempenho, os antibióticos apresentaram melhor GPD dos 49 aos 63 dias de idade em relação ao QOS e a CA foi melhor para a colistina em comparação com os demais tratamentos, além disso apresentou menor incidência de diarreia aquosa quando comparada com os outros tratamentos. Para as vísceras, observou-se aumento do peso relativo do baço, maior comprimento do intestino delgado e menor pH duodenal para os leitões que receberam QOS em relação aos antibióticos. A morfometria indicou maior altura de vilosidades e melhor relação vilos/cripta para a colistina em relação ao QOS e menor escore lesional em relação aos demais tratamentos. A concentração sérica de imunoglobulinas apontou uma maior concentração de IgA para o QOS aos 35 dias. Frente aos resultados observados, o QOS não foi eficiente para substituir a colistina como alternativa a este promotor de crescimento para leitões desmamados com 17 dias de idade, mas a resposta observada de estímulo sobre o sistema imune indica um potencial promissor deste produto.

Palavras-Chave: Colistina. Lincomicina. Diarreia. Histologia. Imunoglobulinas.

Abstract: The objective of this paper was to evaluate the Chito-oligosaccharide (COS) against two growth promoters' antibiotics, Colistin and Lincomycin, related to the performance, diarrhea episodes, visceral characteristics, morphometry and serum immunoglobulins, IgA, IgG and IgM. A total of 96 Pen Ar Lan® piglets, weaned at 17 days and $5,33 \pm 0,369$ Kg of BW were evaluated for the performance and serum evaluation. For histology and visceral organs weight, were used 24 animals at 35 days of age and $6,86 \pm 0,64$ Kg of BW. The treatments was a basic diet plus COS (100 mg/kg), Colistin (40 mg/kg) and Lincomycin (4,4 mg/kg). The antibiotics showed better results on ADG during period 49 to 63 days compared with COS, the FCR was better and diarrhea frequency was lower for Colistin compared with all other treatments. The spleen weight and the large intestinal length were higher and duodenal pH was lower for COS compared with antibiotics. The morphometry indicated better villus height and villus/crypt relation for Colistin when compared with COS as lower lesion score compared with others treatments. The immunoglobulins serum concentration pointed more concentration of IgA for COS at 35 days of age. According to the results, COS was not efficient to replace Colistin as an alternative for this growth promoter for piglets weaned at 17 days, but the results related to the immune system, indicates the COS as a potential promising product for the weaning.

Keywords: Colistin. Lincomycin. Diarrhea. Histology. Immunoglobulins.

Introdução

Na atualidade, um dos maiores problemas da produção nacional corresponde ao uso irrestrito e abusivo de antimicrobianos sobre a produção suinícola industrial, aumentando o debate no que tange à segurança alimentar e a saúde humana principalmente sobre a questão de seleção de patógenos resistentes (MORÉS, 2014).

No mercado, são diversos os produtos que figuram como alternativa a estas drogas como promotores de crescimento, entretanto, os resultados ainda são muito variados e largamente dependentes de condições específicas. A Europa vem apostando nos últimos anos em uma mudança completa na forma de produzir suínos, e em especial, leitões. São medidas que incluem ações de manejo, prevenção e otimização da condição fisiológica do leitão desde a maternidade para o período de desmame que, em conjunto com uma nutrição pautada pela redução de desordens intestinais e modulação da microbiota desse órgão, funcionam como um campo fértil para a utilização destas alternativas com resultados bastante promissores para uma produção de leitões de forma sustentável e de qualidade (HEO et al., 2013).

Em face disto, entre os aditivos atualmente estudados e utilizados pela indústria, os prebióticos assumem papel decisivo nas principais estratégias visando melhores condições de criação, o que implica uma procura constante por novas substâncias que possam funcionar como prebióticos.

A Universidade Estadual de Londrina, acompanhando esta necessidade, vem pesquisando desde 2006 um quitoooligossacarídeo produzido a partir de um subproduto da indústria da seda com ação prebiótica sobre animais de produção (ITANO, 2006). Os quitoooligossacarídeos são bastante promissores quando utilizados como promotores da saúde intestinal e imunoestimulantes para leitões de creche (XIONG et al., 2015; XIAO et al., 2014). Neste sentido, o maior desafio deste novo prebiótico é se configurar como alternativa viável frente aos antibióticos mais comumente usados como promotores de crescimento para leitões aqui no Brasil.

Com este estudo, portanto, espera-se avaliar a resposta do quitoooligossacarídeo para leitões recém-desmamados com 17 dias de idade frente a dois antibióticos de ação específica gram positivo e negativo, a colistina e a lincomicina, quanto à performance e ao desenvolvimento imune e intestinal dos animais.

Material e Métodos

Preparação do inócuo

Produzido a partir de uma linhagem de *Bacillus subtilis* DP4, obtida no acervo microbiológico do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) da Universidade Estadual de Londrina, a qual foi usada para inocular 150mL de meio de cultura preparado segundo Itano (2006), contendo 7,10% de farinha de crisálida como única fonte de carbono adquirida na Empresa Fiação de Seda BRATAC – Londrina-PR (**Tabela 1**), além de 2,84% de peptona como única fonte de nitrogênio. NO meio o pH foi ajustado para 9,60 com solução de NaOH 30% e o meio esterilizado em autoclave à 121°C, 1 atmosfera de pressão, durante 15 minutos e, posteriormente, sendo cultivado à temperatura de 31°C durante 96 horas, com agitação de 110rpm.

Preparação do fermentado rico em Quitoooligossacarídeo

Para a produção do fermentado rico em quitoooligossacarídeos, o meio utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, sendo inoculado uma alíquota de 5% retirada a partir do inóculo previamente preparado e mantido sob as mesmas condições. Após o tempo de cultivo (96 horas) foi feita a mistura do meio de cultura fermentado com a farinha de ostra comercial na proporção de 2:1 (v/p) e, em seguida, essa mistura foi seca em estufa com circulação de ar a 45°C por aproximadamente 48 horas. Posteriormente, o produto foi triturado para homogeneização e armazenado em sacos de polietileno (46 x 28cm), vedados e mantidos em câmara fria a 5°C até sua utilização.

A partir do produto seco foi determinada seu teor de matéria seca e a presença de QOS, que, respectivamente, foram de 94,84% e de 1,11g/100g.

A preparação do inócuo, do fermentado e o produto final (QOS) utilizado neste experimento foram baseados na metodologia adaptada de Itano (2006).

Experimento

O presente experimento foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina, sendo aprovado para seu desenvolvimento (CEUA nº 18883.2012.52)

Foram utilizados 96 leitões de genética Pen Ar Lan®, desmamados com idade média inicial de 17 dias e peso médio de $5,33 \pm 0,369$ kg. Os animais ocuparam 24 baias de estrutura metálica suspensa, com 1,5 m², com piso ripado plástico, equipadas com lâmpada incandescente de 250 W para aquecimento, bebedouro tipo chupeta e comedouro tipo calha com quatro bocas. As temperaturas

mínimas e máximas médias da creche, registradas no período experimental, foram de $23,8 \pm 2,5$ °C e $29,4 \pm 3,0$ °C, respectivamente.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (baseado no peso inicial), com três tratamentos, 8 repetições e 4 animais por unidade experimental, caracterizada pela baía para as variáveis de performance e pelo animal como unidade experimental para as demais análises. O sexo dos animais não foi levado em consideração para o desenho estatístico por não ter influência nas análises propostas ($P > 0,05$), servindo apenas para a separação em baias de duas fêmeas e dois machos na mesma proporção para cada tratamento.

Os tratamentos propostos para este experimento foram um grupo de leitões recebendo a ração base contendo 100 ppm de quitooligossacarídeo (QOS) compondo o tratamento teste, a ração base contendo 40 ppm de colistina compondo o tratamento controle positivo Gram-negativo e a ração base contendo 4,4 ppm de lincomicina compondo o tratamento controle positivo Gram-positivo. Em virtude do número de baias experimentais e do objetivo do trabalho de testar o QOS frente a antibióticos Gram positivo e negativo, o tratamento controle negativo não foi utilizado.

As exigências nutricionais dos animais e a composição dos ingredientes foram baseadas nas recomendações de Rostagno et al. (2011). As fases propostas para o experimento foram pré-inicial I (dos 17 aos 35 dias), pré-inicial II (dos 36 aos 48 dias) e inicial (dos 49 aos 63 dias de idade). Rações e água foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental.

A ração base proposta foi formulada com os principais ingredientes milho, farelo de soja, soro de leite em pó e suplemento vitamínico e mineral, calculadas para serem isonutritivas. A inclusão do produto teste (QOS) foi substituída por um inócuo (carbonato de cálcio) para ajuste dos níveis de cálcio da ração para todos os demais tratamentos, uma vez que o produto tem uma base cálcica de diluição. A matriz do QOS não foi levada em consideração para a elaboração das dietas pelo baixo percentual do produto. A proporção dos antimicrobianos foi substituída por milho (**Tabela 2**).

As variáveis de desempenho, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, e índice de diarreia foram avaliadas durante as 3 fases e também no período total do experimento. A observação da ocorrência de diarreia foi feita diariamente através da avaliação da consistência das fezes, anotando o número do (s) animal (is) com o quadro clínico. A consistência das fezes foi classificada de acordo com Sobestiansky e Barcellos (2007): 1- fezes líquidas; 2- fezes cremosas; 3- fezes pastosas; 4- fezes normais. Para a avaliação da diarreia, os animais foram avaliados individualmente, mas a unidade experimental foi a baía, considerando positivo para diarreia a baía com pelo menos um animal com escore inferior a 3.

Para a avaliação de imunoglobulinas séricas IgA IgG e IgM de todos os animais, a primeira amostra de sangue foi coletada aos 21 dias de idade, antes da vacinação para circovírus e micoplasma. A segunda amostra foi obtida aos 35 dias.

Para a avaliação do peso dos órgãos do trato gastrintestinal e anexos e para a avaliação morfológica das vilosidades do intestino delgado foi selecionado um animal por baía, fêmea, aos 35 dias de idade, totalizando 24 animais, com peso médio de $6,86 \pm 0,64$ Kg. O animal escolhido foi de acordo com o peso vivo, sendo utilizado aquele que apresentou o peso mais próximo da média dos animais de cada bloco. O sacrifício dos animais foi precedido por insensibilização elétrica, seguido da sangria dos grandes vasos da região do pescoço. Neste momento, foi coletado a segunda amostra de sangue para avaliação de imunoglobulinas séricas IgA IgG e IgM de todos os animais, os sacrificados e os que permaneceram no experimento pela punção da veia cava anterior.

Após o abate, os animais foram eviscerados para avaliação do peso relativo de estômago, baço, fígado, intestino delgado, intestino grosso e comprimento do intestino delgado e pH duodenal, verificado com auxílio de um potenciômetro a partir do suco duodenal colhido diretamente do fragmento intestinal logo após a evisceração.

Em seguida, foi coletado um fragmento da porção média do duodeno, jejuno e íleo. Os fragmentos intestinais, de aproximadamente 3 cm de comprimento, foram lavados em solução fisiológica e então seccionados transversalmente e longitudinalmente para expor o lúmen intestinal. Após 24 horas na solução fixadora (formol 10%) os fragmentos foram lavados e imersos em álcool 70% e armazenados a temperatura ambiente. Os fragmentos foram recortados em amostras de aproximadamente 0,5cm de comprimento, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Em cada lâmina foram dispostas quatro seções semi-seriadas com 5µm de espessura, obtidas com micrótomo American Optimal, sendo que entre uma seção e a subsequente foram desprezadas 30 seções (BERTOLETTO, 2005). Cortes de 5 µm de espessura foram corados com Hematoxilina & Eosina para avaliação histológica e com a coloração Azul de Alciano para contagem de células caliciformes. Um escore histológico foi estabelecido para comparar as alterações histológicas, no qual é estabelecida uma correlação entre o tipo e extensão da lesão e o seu grau de severidade (**Quadro 1**). O escore de lesão do segmento foi obtido pela multiplicação do fator de severidade (ou grau de severidade) da lesão e sua extensão determinada pela intensidade ou frequência observada. O escore de lesão do órgão foi obtido pela soma dos escores lesionais. O fator de severidade (ou grau de severidade) foi determinado como: 1 – lesões leves; 2 – lesões moderadas; 3 – lesões severas. A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) foi avaliada em três campos por animal e o escore foi: 0, sem lesão; 1, pequena extensão (25% da seção intestinal afetada); 2, extensão intermediária (50% da seção intestinal afetada); 3, grande extensão (75% da seção intestinal afetada). Cada seção intestinal era de 1 cm² (BRACARENSE et al., 2012).

A altura e profundidade de vilosidades foram mensuradas em 30 vilosidades escolhidas aleatoriamente utilizando o programa MOTIC Image Plus 2.0 ML[®] image analysis system (MOTIC Image Plus Motic Instruments, Richmond, Canada). O número de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos foram contados na região de lâmina própria, em três campos aleatórios por amostra utilizando a

objetiva de 40x. Para contagem das células caliciformes foram escolhidos 30 campos aleatórios por amostra. As médias do escore lesional, morfometria intestinal, número de células caliciformes e células inflamatórias foram utilizadas para a análise estatística, sendo analisadas alturas de pelo menos 30 vilosidades por segmento, e tratadas as médias destas vilosidades como unidade experimental. Somente os vilos ligados à lâmina própria e com pontas bem definidas foram medidos. As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Estadual de Londrina.

Para as análises imunológicas, os soros foram diluídos para IgG 1:100.000, IgA e IgM forma diluídas 1:10.000, realizados de acordo com as instruções do fabricante, Bethyl Laboratories, Inc. USA, (Pig IgA ELISA Quantitation Set, Pig IgM ELISA Quantitation Set, Pig IgG ELISA Quantitation Set).

Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância com teste de Tukey a 5% de significância para diferença de médias e a 10% de significância para indicar tendência à diferença de médias pelo pacote GLM do programa MINITAB 17. A incidência de diarreia foi analisada por Qui-Quadrado de contingência quanto a positividade do animal para diarreia, a incidência de diarreia aquosa e o escore fecal médio durante o período de 17 a 35 dias. Os dados não paramétricos das análises imunológicas foram submetidos à transformação logarítmica e posteriormente analisados como dados paramétricos.

Resultados

Para o desempenho (**Tabela 3**), observa-se tendência a melhor ganho de peso diário (GPD) durante a fase Inicial (49 a 63 dias) para os antimicrobianos, quando comparados com 100 ppm de QOS, promovendo uma melhora de 100g dia⁻¹ no GPD ($P = 0,10$). A conversão alimentar (CA) da fase Pré-inicial I (17 a 35 dias) foi melhor ($P \leq 0,05$) para os leitões alimentados com colistina em relação ao QOS e à lincomicina.

A incidência de diarreia, presente na fase pré-inicial I (**Tabela 4**), indicou uma prevalência maior dos animais alimentados com QOS em relação aos antimicrobianos, sendo que este tratamento também foi o mais acometido com escore fecal 1 (fezes aquosas).

O peso relativo dos órgãos (**Tabela 5**) apresentou aumento relativo do peso do baço ($P \leq 0,05$) para os animais alimentados com 100 ppm de QOS em relação aos alimentados com os antimicrobianos, assim como o pH duodenal também foi menor ($P \leq 0,05$) para aqueles animais em relação aos animais alimentados com colistina. Para o comprimento do intestino delgado, houve influência dos tratamentos com antimicrobianos ($P \leq 0,05$), sendo que os dois grupos (Gram positivo e negativo) apresentaram maior comprimento desse órgão em relação aos animais do tratamento com QOS.

A avaliação morfométrica das diferentes porções do intestino delgado (**Tabela 6**) apontou aumento ($P \leq 0,05$) da altura de vilosidades e da relação altura de vilosidades/profundidade de criptas do jejuno para o uso de 40 ppm de colistina na ração quando comparado com 100 ppm de QOS.

Para a contagem de células somáticas (CCS), os resultados (**Tabela 7**) apontam uma presença maior de linfócitos na lâmina própria ($P \leq 0,05$) das porções do jejuno e do íleo dos leitões alimentados com QOS quando comparados aos alimentados com colistina para o primeiro segmento e com lincomicina para o segundo. Leitões alimentados com colistina também apresentaram número menor de linfócitos ($P \leq 0,05$) no jejuno quando comparados com os alimentados com lincomicina.

A resposta imune sérica (**Tabela 8**) indicou uma tendência ($P < 0,10$) de aumento na IgA sérica para os 35 dias de vida dos leitões tratados com QOS em relação à colistina (**Gráfico 1**).

Para as lesões de epitélio, observou-se que leitões alimentados com 100 ppm de QOS obtiveram uma tendência ($P \leq 0,10$) a apresentar maior escore de lesões epiteliais no duodeno quando comparados com leitões alimentados com 40 ppm de colistina (**Gráfico 2**).

Discussão

Antimicrobianos

A tendência ($P = 0,10$) a uma melhor resposta de ganho diário de peso (GPD) no período Inicial (49 a 63 dias) dos antimicrobianos quando comparados ao uso de 100 ppm de QOS pode estar associada segundo Gonzales, Mello e Café (2012) à ação dessas substâncias no trato digestório sobre a microbiota intestinal, reduzindo a competição por nutrientes e a produção de metabólitos que deprimem o crescimento dos animais. A melhor performance quando se utiliza antimicrobianos como promotores de crescimento é comum (PALERMO NETO; ALMEIDA, 2006; PARTANEN, 2002) e também seus efeitos sinérgicos com outras substâncias, como o plasma (RODRIGUES, 2013) e o sulfato de cobre (MENTEN, 1995), que foram utilizados como ingredientes nas dietas deste experimento.

A melhor conversão alimentar (CA) na fase de pós-desmame imediato pelo uso de colistina, quando comparada com os demais tratamentos, pode estar associada à menor incidência de diarreia, sobretudo aquosa, observada no mesmo período. Embora a diarreia pós desmame tenha diferentes etiologias, o manejo alimentar e a capacidade de adaptação digestiva do leitão à dieta oferecida são pontos importantes para o aparecimento da síndrome de diarreia pós desmame (SDPD) (KUMMER et al., 2009), com comprometimento de agentes infecciosos. A baixa idade de desmame, 17 dias, pode ter influenciado este desafio entérico adaptativo para a primeira dieta de creche e contribuído, conseqüentemente, para a maior incidência de diarreia aquosa que é causada principalmente pela colibacilose (KYRIAKIS et al., 1999). Neste sentido, o tratamento com colistina foi eficiente na redução da diarreia aquosa, estando sua resposta relacionada ao espectro de ação das polimixinas E, que agem seletivamente sobre bacilos entéricos Gram-negativos, em especial sobre a *Escherichia coli*.

As colibaciloses promovem a colonização do intestino delgado e liberam enterotoxinas que agem sobre as barreiras funcionais da mucosa, aumentando sua permeabilidade e levando à perda de fluidos para o lúmen intestinal, caracterizando o aparecimento da diarreia aquosa (GUIGNOT et al., 2007). Entretanto, no presente experimento, a causa da diarreia não foi identificada.

A colistina tem ação bactericida sobre estes patógenos, reduzindo sua população na microbiota intestinal e favorecendo, dessa forma, a integridade de funcionamento das proteínas constituintes das junções de oclusão (*tight junctions*), as zônulas de oclusão, ocludinas e claudinas (SUZUKI, 2013), reduzindo a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, a incidência desse tipo de diarreia.

Embora Yang et al. (2012), trabalhando com rações contendo 200, 400 e 600 ppm de QOS frente a 20 ppm de colistina, não tenham verificado diferença na contagem de *Escherichia coli* para o conteúdo cecal para o uso de colistina e de QOS durante 14 dias pós desmame, níveis de QOS de 400 e 600 ppm de ração determinaram resultados semelhantes para GPD e CA em relação ao antimicrobiano. Este resultado pode indicar que o nível de 100 ppm de QOS na ração utilizada neste experimento pode não ter sido suficiente para expressar efeitos benéficos nos primeiros 14 dias pós desmame.

Quanto à lincomicina, embora os animais deste tratamento tenham apresentado tendência de melhor GPD em relação ao QOS para a fase Inicial do experimento de maneira similar aos animais do grupo alimentado com colistina, os animais que receberam lincomicina apresentaram pior resultado ($P < 0,050$) para a conversão alimentar e prevalência de diarreia aquosa quando comparados com os animais do grupo com colistina. A lincomicina é uma lincosamida ativa contra antibióticos Gram positivos, micoplasma e algumas bactérias anaeróbias, tendo, portanto, ação restrita sobre as bactérias Gram-negativas aeróbias, como a *Escherichia coli* enterotoxigênica (SPINOSA, 2006).

Para a morfometria do jejuno, o tratamento com Colistina resultou em maior altura de vilosidades em relação ao tratamento com QOS e, conseqüentemente, melhor relação de altura de vilosidades/cripta. Estes resultados diferem dos encontrados por Yang et al. (2012), que não encontraram diferença para animais alimentados com 20 ppm de colistina quando comparado com animais alimentados com diferentes níveis de QOS (200, 400 e 600 ppm). Uma depleção na altura de vilosidades e principalmente na relação altura de vilosidades/profundidade de cripta são critérios eficientes para avaliar a capacidade de digestão de nutrientes do epitélio intestinal frente à agressão tecidual causada por agentes físicos, químicos e/ou microbiológicos durante o período de pós desmame imediato, especialmente em desmames precoces, e que tendem à normalidade a partir de 5 a 10 dias pós desmame (LALLÉS et al., 2004; MONTAGNE; PLUSKE; HAMPSON, 2003). Nesse sentido, a baixa prevalência de diarreia aquosa nos animais tratados com colistina em relação aos tratados com QOS provavelmente está associada à maior altura dos vilos e também a melhor relação desta com a profundidade de cripta. Os mecanismos responsáveis por esta melhor morfometria intestinal também devem estar associados à capacidade deste antimicrobiano em controlar a população

de bactérias Gram-negativas patogênicas, principalmente a *Escherichia coli* e, conseqüentemente, reduzir sua ação danosa à mucosa intestinal.

Maior altura de vilosidades e sua associação com a profundidade de criptas são parâmetros importantes na avaliação da integridade intestinal e na taxa de recuperação tecidual deste órgão, indicando um melhor funcionamento, sobretudo na absorção de nutrientes, dos segmentos intestinais e principalmente do jejuno (LALLÉS et al., 2004). Neste experimento, estas características foram favoráveis para os animais submetidos ao tratamento com 40 ppm de colistina quando comparados com os animais que receberam 100 ppm de QOS, o que possivelmente reflete a melhor performance na absorção de nutrientes durante as primeiras duas semanas pós desmame caracterizada pela melhor eficiência alimentar desses animais.

Concomitante aos resultados positivos da morfometria dos animais pertencentes ao tratamento com colistina, observou-se também uma redução do número de linfócitos na lâmina própria do jejuno e também um menor escore de lesões epiteliais no duodeno, indicando que não houve uma agressão tão severa com conseqüente aumento de lesões epiteliais e aumento do processo inflamatório dos animais que compunham este tratamento em relação aos animais alimentados com QOS e com lincomicina. Da mesma forma, a concentração de IgA sérica baixa dos animais que representam este tratamento em relação ao tratamento com QOS pode estar associada a menor agressão tecidual da mucosa intestinal quando comparamos os dois grupos de animais.

Quito oligossacarídeo

Os resultados de GPD, a CA, a prevalência de diarreia, o escore de lesões de epitélio e a morfometria intestinal diferem dos obtidos anteriormente por alguns autores que trabalharam com a colistina como um antibiótico referência (YANG et al., 2012) ou mesmo quando o uso do QOS foi comparado com um controle negativo, indicando muitos aspectos positivos do uso deste oligossacarídeo (HAN et al., 2007; XIONG et al., 2015; YANG et al., 2012).

Na avaliação visceral, o menor comprimento do intestino delgado (total e relativo) pode estar relacionado com a alta prevalência da diarreia aquosa e a atrofia de vilosidades que reduzem o tempo de recuperação e desenvolvimento do epitélio intestinal (LALLÉS et al., 2004), enquanto que a taxa de replicação celular das criptas é uma resposta à agressão tecidual, mas não é uma resposta positiva do desenvolvimento do epitélio intestinal (MONTAGNE; PLUSKE; HAMPSON, 2003). Embora Andrade et al. (2011), tenham encontrado aumento do comprimento intestinal com o uso da colistina, trabalhando diferentes inclusões de nucleotídeos, Rizzo et al. (2010) e Costa, Tsé e Miyada (2007) observaram redução do comprimento do intestino para o uso de antibióticos em frangos e suínos, respectivamente, e atribuíram esta resposta a uma melhora na condição de saúde intestinal do animal, uma vez que um aumento no comprimento do intestino pode determinar maior gasto energético e resultar em menor eficiência alimentar para este animal (GOMES et al., 2007). Dessa forma, ao

comparar o comprimento relativo do intestino delgado de outros trabalhos, verificou-se que os resultados deste parâmetro para este experimento foram inferiores aos de outros trabalhos (0,516 μm frente à 0,950 μm , de acordo com Andrade et al. (2011) e 0,720 μm , como observado por Costa et al. (2011)), demonstrando que houve retração do desenvolvimento do intestino delgado para todos os tratamentos propostos, sendo este mais acentuado no tratamento com QOS.

Em relação ao peso relativo do baço, Andrade et al. (2011), trabalhando com nucleotídeos, atribuíram o aumento do peso relativo do baço a um possível estímulo à imunidade dos leitões recém-desmamados. Para o QOS, Xiong et al., (2015) determinaram que, em baixas dosagens (30 ppm), o QOS pode estimular uma resposta imune em nível de mucosa. Já para níveis mais elevados, 300 mg/kg, Xiao et al. (2014) identificaram que o QOS foi efetivo para aliviar o processo inflamatório intestinal e estimular a resposta imune celular mediada. Entretanto, um aumento relativo do baço pode estar associado também a processos de hipersensibilidade do trato gastrintestinal e a estímulos de agressão desta mucosa por patógenos oportunistas, como a *Escherichia coli* enterotoxigênica, determinando quadros graves de diarreia, como foi observado neste experimento para os animais que receberam o QOS (ALTAMURA et al., 2001). Entretanto, a causa da diarreia não foi determinada para este experimento.

Para o pH duodenal, os valores de normalidade estão entre 4 e 6 para leitões, entretanto, quanto mais próximo de 4 for este pH, melhor será a resposta do leitão à proliferação de patógenos neste segmento, uma vez que o ótimo pH para o crescimento bacteriano se situa em 6-8 para a *Escherichia coli*, 6-7.5 para o *Streptococcus sp* e *Salmonella*, 6.8-7.5 para o *Staphylococcus sp* e 6.6-7.0 para a *Pseudomonas* (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993). Neste experimento, os valores de pH apresentados pelos leitões alimentados com QOS foram menores que nos demais tratamentos, entretanto, esteve acima da normalidade, 6,55. Este valor pode indicar, entre outros fatores, um efeito tamponante da ração base (efeito buffer do carbonato de cálcio e calcário), além de um baixo efeito acidificante da dieta por uma ineficiência na ação ácido láctica proveniente da lactose ou a não utilização de ácidos orgânicos como aditivos redutores de pH estomacal (KORNEGAY; EVANS; RAVINDRAN, 1994). Os resultados encontrados por Xiong et al. (2015), entretanto, apontam um maior valor de pH estomacal com o uso do QOS em baixa dosagem (30 ppm), mas não houve diferença no pH duodenal quando comparado com o uso de antibiótico (clortetraciclina). Alguns estudos em pacientes com doença inflamatória intestinal e lesões severas de duodeno, apontam uma redução do pH dessa região, provavelmente, em virtude da baixa excreção de bicarbonato de sódio (VERNIA et al., 1988).

Em relação à prevalência de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM séricas e a presença de células somáticas na lâmina própria dos diferentes segmentos intestinais, a maior concentração de IgA aos 35 dias de idade para os animais que receberam QOS em relação aos que receberam os antibióticos está de acordo com os resultados obtidos por Ma et al. (2014), que obtiveram aumento na IgA sérica de

animais alimentados com 100 ppm de QOS associado ao Zn quelatado, mas não obtiveram aumento nas concentrações séricas de IgM e IgG. Resultado similar obteve Xiong et al. (2015), com aumento da concentração de IgA para animais alimentados com QOS em relação ao grupo controle negativo. Já, Yin et al. (2008) obtiveram, com 250 ppm de QOS em relação à 110 ppm de lincomicina para leitões ao desmame, uma resposta tanto de IgA, como de IgG e IgM, além das interleucinas IL1, IL2 e IL6, indicando que o QOS, provavelmente, desempenhou papel fundamental na promoção da resposta imune celular mediada a partir da modulação na produção de citocinas e anticorpos, demonstrando que este prebiótico apresentou uma resposta melhor do que a observada pela lincomicina para o crescimento e saúde animal. Para a maior presença de linfócitos na lâmina própria do jejuno, estes resultados são similares aos obtidos por Xiong et al. (2015), que demonstraram este efeito na lâmina própria do jejuno e também do duodeno, mas, segundo estes autores, houve redução de linfócitos na lâmina própria do íleo em relação ao grupo controle. No presente experimento, entretanto, foi observada maiores contagens de linfócitos também neste segmento, quando este parâmetro dos animais alimentados com QOS era comparado com o grupo alimentado com lincomicina.

Para o escore de lesões, a resposta sobre o íleo foi positiva com redução do escore lesional médio para o QOS em relação ao duodeno e jejuno, além de nenhuma presença de lesões graves, com grau de intensidade ou frequência 3 ou superior (que representa 75% da seção afetada), enquanto que, nos demais tratamentos, houve prevalência deste grau para o íleo com três animais compondo os tratamentos com Colistina (1) e Lincomicina (2). Esta resposta de menor agressão epitelial do íleo identifica-se com os resultados verificados por Li et al. (2013) e Xiong et al. (2015), embora neste experimento não se tenha demonstrado diferença estatística entre os tratamentos para este segmento.

Conclusões

A Colistina apresentou respostas consistentes sobre o desempenho, a prevalência de diarreia e a morfometria intestinal em relação ao tratamento com a lincomicina e o QOS, nas condições deste experimento e frente ao desafio de um desmame de 17 dias de vida dos leitões.

O QOS não foi eficaz como única ação de substituição destes promotores de crescimento para os parâmetros estudados e sob as condições deste experimento. A resposta consistente de imunoestimulação do QOS frente aos antibióticos avaliados sugere uma ação sobre a modulação do sistema imune que deve ser explorada num momento crítico como o desmame, demandando mais investigações.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo patrocínio integral do projeto.

Tabela 1 – Composição centesimal da farinha de crisálida obtida junto à empresa Fiação de Seda Bratac – Londrina – PR.

Proteína Bruta (%)	52,66	Isoleucina (%)	2,18	Treonina (%)	2,62
Extrato Etereo (%)	27,17	Leucina (%)	3,75	Potássio (mg/kg)	7643,09
Cálcio (%)	0,11	Ác. Glut. (%)	6,75	Magnésio (mg/kg)	3266,75
Fósforo total (%)	0,69	Lisina (%)	3,47	Manganês (mg/kg)	nd
Alanina (%)	2,82	Cistina (%)	0,62	Zinco (mg/kg)	162,29
Arginina (%)	2,73	Metionina (%)	1,69	Ferro (mg/kg)	89,11
Ác. Aspart. (%)	5,88	Fenilalanina (%)	2,67	Cobre (mg/kg)	14,65
Glicina (%)	2,35	Tirosina (%)	2,91	Cobalto (mg/kg)	8,50

Fonte: Itano (2006).

Tabela 2 - Composição centesimal e nutricional calculada das rações experimentais base para os períodos propostos, pré-inicial I (17 aos 35 dias), pré-inicial II (36 a 48 dias) e Inicial (49 a 63 dias).

		Pré-inicial I	Pré-inicial II	Inicial
		Macro		
Milho	%	51,80	58,89	63,65
Farelo de Soja	%	18,00	21,00	29,00
Leite integral (pó)	%	12,00	7,00	2,00
Soro de leite	%	8,00	3,00	0,00
Plasma	%	3,00	3,00	0,00
Fosfato Bi cálcico 18%	%	2,38	2,00	1,72
Óleo Vegetal	%	2,00	2,00	1,80
Hemácias (pó)	%	1,00	1,00	0,00
Sal Moído	%	0,50	0,30	0,42
Premix ¹	%	0,40	0,40	0,40
Óxido de Zinco 79,9%	%	0,20	0,20	0,00
Calcário Calcítico 38%	%	0,17	0,51	0,51
L-Lisina	%	0,25	0,30	0,25
L-Treonina	%	0,15	0,20	0,10
DL-Metionina	%	0,15	0,20	0,10
Sulfato de Cobre 25%	%	0,00	0,00	0,05
Níveis Nutricionais				
Proteína Bruta	%	19,82	20,07	19,00
Ex. Etéreo	%	7,63	5,72	4,68
Fibra Bruta	%	2,15	2,50	3,03
Lactose	%	10,00	5,00	0,70
Lisina Total	%	1,40	1,40	1,20
Lisina Digestível	%	1,27	1,26	1,05
Treonina Digestível	%	0,81	0,76	0,67
Metionina Digestível	%	0,43	0,47	0,36
Zinco	mg kg ⁻¹	1700	1700	153
Cobre	mg kg ⁻¹	12,00	12,00	150
Cálcio	%	0,84	0,79	0,69
Fósforo Total	%	0,84	0,74	0,64
Fósforo digestível	%	0,65	0,55	0,44
Energia Metabolizável	Kcal	3513	3500	3420

¹ Premix, níveis de garantia por kg do produto: Colina: 75.000 mg kg⁻¹, Vitamina A: 50.000 UI, Vitamina D3: 75.000 UI, Vitamina E: 9000 mg kg⁻¹, Vitamina K3: 975 mg kg⁻¹, Vitamina B1: 500 mg kg⁻¹, Vitamina B2: 1.200 mg kg⁻¹, Vitamina B6: 750 mg kg⁻¹, Vitamina B12: 8.000 mcg kg⁻¹, Niacina: 5.000 mg kg⁻¹, Ácido Pantotênico: 3.000 mg kg⁻¹, Ácido Fólico: 500 mg kg⁻¹, Biotina: 20.000 mg kg⁻¹, Ferro: 30.000 mg kg⁻¹, Cobre: 3.000 mg kg⁻¹, Manganês: 17.500 mg kg⁻¹, Zinco: 30.000 mg kg⁻¹, Iodo: 200 mg kg⁻¹, Selênio: 150 mg kg⁻¹, Fitase: 25000 U kg⁻¹.

² Para os tratamentos propostos, foi incluído 0,901% de QOS para o tratamento QOS, enquanto que para os tratamentos com antibióticos foi incluído 0,901% de Carbonato de Cálcio para corrigir o nível de cálcio destas rações. Para a inclusão de 40 mg/Kg de colistina e 4,4 mg/Kg de Lincomicina, estes foram adicionados à ração sem substituição de ingredientes na formulação.

Quadro 1 – Critérios Histológicos usados para estabelecer o escore de lesões intestinais.

Tipo de Lesão	Fator de Severidade	Extensão da Lesão	Escore Máximo
Dilatação de vasos linfáticos	1	0 a 3	38
Vacuolização celular	1	0 a 3	
Epitélio cúbico (enterócitos)	2	0 a 3	
Achatamento de vilosidades	2	0 a 3	
Fusão de vilosidades	2	0 a 3	
Edema intersticial	2	0 a 3	
Necrose apical de vilosidades	3	0 a 3	

O escore de lesão do segmento foi obtido pela multiplicação do fator de severidade (ou grau de severidade) da lesão e sua extensão determinada pela intensidade ou frequência observada. O escore de lesão do órgão foi obtido pela soma dos escores lesionais. O fator de severidade (ou grau de severidade) foi determinado como: 1 – lesões leves; 2 – lesões moderadas; 3 – lesões severas. A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) foi avaliada em três campos por animal e o escore foi: 0, sem lesão; 1, pequena extensão (25% da seção intestinal afetada); 2, extensão intermediária (50% da seção intestinal afetada); 3, grande extensão (75% da seção intestinal afetada). Cada seção intestinal era de 1 cm². **Fonte:** Bracarense et al. (2012).

Tabela 3 – Desempenho zootécnico de leitões alimentados com Colistina (COL), Lincomicina (LIN) e Quitooligossacarídeo (QOS) para as diferentes fases de creche.

Parâmetros	Tratamentos			Média	SE Média	P valor
	QOS	COL	LIN			
<i>17 a 35 dias (Pré-Inicial I)</i>						
Peso Inicial (kg)	5,34	5,33	5,34	5,34	0,09	0,999
Peso Final (kg)	6,71	7,22	6,63	6,86	0,16	0,162
CDR (g)	210	236	200	215	0,01	0,183
GPD (g)	80	112	76	89	0,01	0,135
CA	2,63 B	2,10 A	2,63 B	2,41	0,122	0,047 ¹
<i>36 a 48 dias (Pré-Inicial II)</i>						
Peso Final (kg)	12,86	12,91	12,32	12,36	0,26	0,267
CDR (g)	717	821	720	747	0,02	0,233
GPD (g)	381	416	403	400	0,01	0,558
CA	1,88	1,87	1,78	1,87	0,04	0,263
<i>49 a 63 dias (Inicial)</i>						
Peso Final (kg)	17,65	20,5	19,48	19,06	0,52	0,141
CDR (g)	942	968	906	939	0,02	0,576
GPD (g)	446 B	549 A	551 A	515	0,02	0,100 ²
CA	2,11	1,76	1,64	1,82	0,06	0,133
<i>17 a 63 dias (Período Total)</i>						
CDR (g)	578	622	567	589	0,01	0,223
GPD (g)	280	335	321	312	0,01	0,157
CA	2,06	1,85	1,76	1,88	0,07	0,164

CDR – Consumo diário de ração; GPD – Ganho diário de Peso; CA – Conversão Alimentar.

¹Letras diferentes para números estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 95%.

²Letras diferentes para números estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 90%.

Tabela 4 – Incidência de diarreia total, aquosa e índice médio de escore fecal para leitões alimentados com 100 ppm de quitooligossacarídeo (QOS), 40 ppm de colistina (COL) ou 4,4 ppm de lincomicina (LIN) os tratamentos propostos durante a fase pré-inicial I (dos 17 aos 35 dias).

Parâmetros	Tratamentos			P valor
	QOS	COL	LIN	
<i>17 a 35 dias</i>				
Incidência de diarreia (%) ¹	100 B	50 A	83,33 AB	0,046
Incidência de diarreia aquosa (%) ¹	100 C	0 A	50 B	0,002
Escore Fecal ²	3,3 B	4,0 A	3,7 AB	0,016

¹Teste de contingência de Qui-quadrado. Para letras diferentes, números estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

²Avaliação do escore fecal, admitindo como normalidade a frequência total do escore para fezes normais. Para letras diferentes, números estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

Tabela 5 – Peso Relativo dos órgãos estômago, fígado, baço, intestino delgado e grosso e comprimento de intestino delgado (em % do peso final de abate) de leitões com 35 dias de idade de acordo com os diferentes tratamentos propostos.

Parâmetros	Tratamentos			Média	SE Média	P valor
	QOS	COL	LIN			
<i>Peso dos órgãos</i>						
Estômago (%)	0,77	0,73	0,88	0,79	0,04	0,198
Fígado (%)	2,72	2,46	2,56	2,58	0,07	0,285
Baço (%)	0,32 A	0,20 B	0,19 B	0,24	0,04	0,050 ¹
Intestino Delgado (%)	4,24	4,54	4,44	4,41	0,14	0,212
Intestino Grosso (%)	2,17	2,58	2,38	2,38	0,11	0,326
<i>Intestino Delgado</i>						
Comprimento (m)	7,22 B	8,53 A	8,00 A	7,92	0,30	0,031 ¹
Comprimento Relativo	0,46 B	0,55 A	0,54 A	0,516	0,04	0,055 ²
pH do duodeno	6,55 B	7,11 A	6,75 A	6,80	0,13	0,007 ¹

¹Letras diferentes indicam números estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 95%.

²Letras diferentes indicam números estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 90%.

Tabela 6 – Morfometria do Intestino Delgado de leitões com 35 dias de idade alimentados com 100 ppm de quitooligossacarídeo (QOS), 40 ppm de colistina (COL) ou 4,4 ppm de lincomicina (LIN).

Parâmetros	Tratamentos			Média	SE Média	P valor
	QOS	COL	LIN			
<i>Duodeno</i>						
Vilos (μm)	165	174	164	168	8,2	0,86
Cripta (μm)	214	230	225	223	7,91	0,78
Células Caliciformes (n)	4,9	5,1	4,1	4,7	0,35	0,59
Relação Vil/Crip	0,77	0,76	0,74	0,76	0,03	0,96
<i>Jejuno</i>						
Vilos (μm)	149 B	203 A	174 AB	175	8,32	0,02 ¹
Cripta (μm)	186	204	205	198	7,41	0,59
Células Caliciformes (n)	3,8	4,3	3,5	3,9	0,2	0,30
Relação Vil/Crip	0,81 B	1,00 A	0,86 AB	0,89	0,03	0,03 ¹
<i>Íleo</i>						
Vilos (μm)	156	172	156	161	5,22	0,40
Cripta (μm)	171	201	180	184	8,08	0,40
Células Caliciformes (n)	6,8	5,9	5,8	6,2	0,49	0,69
Relação Vil/Crip	0,92	0,87	0,90	0,90	0,03	0,88

¹Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 95%.

Tabela 7 – Contagem de Células Somáticas epiteliais e suas diferenciações no intestino delgado de leitões aos 35 dias de idade alimentados com 100 ppm de quito oligossacarídeo (QOS), 40 ppm de colistina (COL) ou 4,4 ppm de lincomicina (LIN).

Parâmetros	Tratamentos			Média	SE Média	P valor
	QOS	COL	LIN			
<i>Duodeno</i>						
CCS (n)	90,5	88,1	78,7	85,8	4,6	0,54
Linfócitos (n)	36,1	29,6	37,1	34,3	1,9	0,22
Plasmócitos (n)	40,8	32,2	30,7	34,6	4,0	0,44
Eosinófilos (n)	13,6	16,2	10,9	13,6	1,5	0,39
<i>Jejuno</i>						
CCS (n)	77,5	68,2	66,9	70,9	3,4	0,46
Linfócitos (n)	41,4 A	30,5 B	40,2 A	37,4	2,0	0,05 ¹
Plasmócitos (n)	13,9	15,1	8,9	12,6	1,7	0,29
Eosinófilos (n)	22,2	22,5	17,2	20,6	1,7	0,50
<i>Íleo</i>						
CCS (n)	90,1	85,0	79,4	84,8	4,0	0,61
Linfócitos (n)	40,5 A	33,3 AB	30,4 B	34,7	2,0	0,04 ¹
Plasmócitos (n)	6,9	9,9	7,1	8,0	0,7	0,15
Eosinófilos (n)	44,7	41,8	41,9	42,8	3,9	0,99

CCS – Contagem de Células Somáticas.

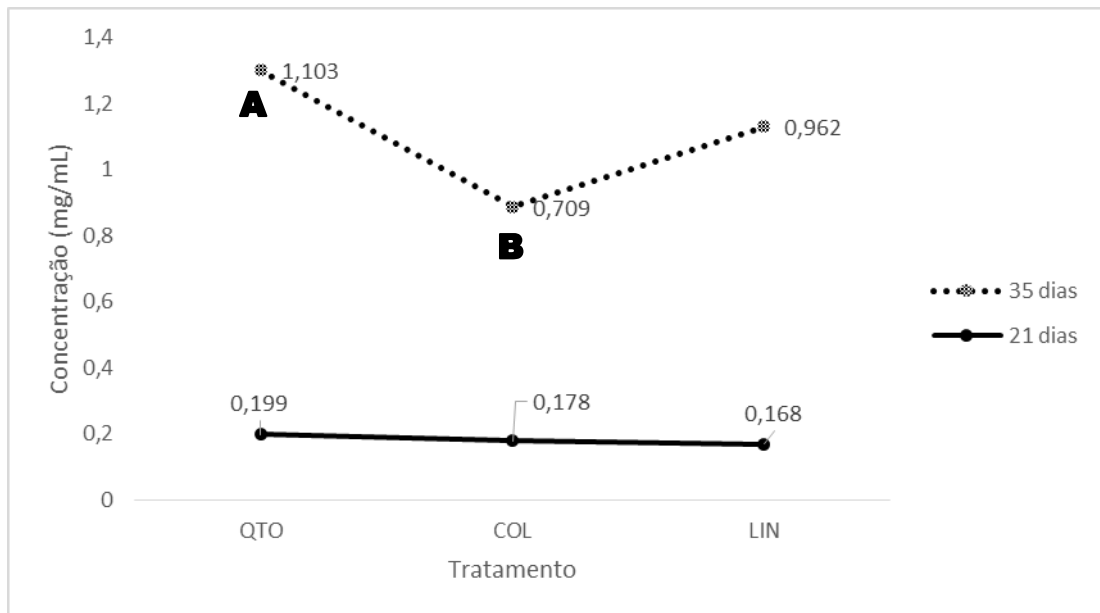
¹ Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 95%.

Tabela 8 – Resposta Imune sérica (Total, IgG, IgA e IgM), em mg/mL, de leitões aos 21 e 35 dias de idade alimentados com 100 ppm de quito oligossacarídeo (QOS), 40 ppm de colistina (COL) ou 4,4 ppm de lincomicina (LIN).

Parâmetros	Tratamentos			Média	SE Média	P valor
	QOS	COL	LIN			
<i>21 dias</i>						
Ig Totais (mg mL ⁻¹)	10,7	11,1	10,7	10,8	0,43	0,80
IgG (mg mL ⁻¹)	9,1	9,5	9,1	9,2	0,38	0,26
IgA (mg mL ⁻¹)	0,199	0,178	0,168	0,182	0,01	0,11
IgM (mg mL ⁻¹)	1,41	1,46	1,39	1,42	0,11	0,96
<i>35 dias</i>						
Ig Totais (mg mL ⁻¹)	12,5	14,1	13,5	13,4	0,47	0,50
IgG (mg mL ⁻¹)	8,5	10,1	9,2	9,3	0,40	0,86
IgA (mg mL ⁻¹)	1,103 A	0,709 B	0,962 AB	0,925	0,07	0,07 ¹
IgM (mg mL ⁻¹)	2,85	3,29	3,36	3,17	0,17	0,43

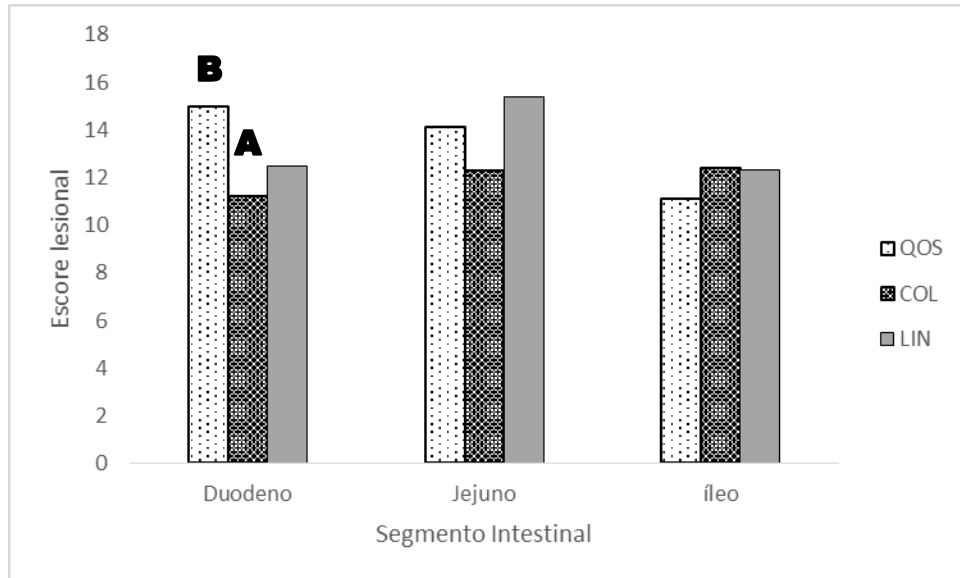
¹ Letras diferentes indicam tendência a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 90% com transformação logarítmica dos dados não paramétricos.

Gráfico 1 – Resposta Imune sérica de IgA (em mg/mL) de leitões aos 21 e 35 dias de idade alimentados com 100 ppm de quitooligossacarídeo (QOS), 40 ppm de colistina (COL) ou 4,4 ppm de lincomicina (LIN).



¹ Letras diferentes indicam tendência a médias estatisticamente diferentes ($P < 0,10$) pelo teste de Tukey com transformação logarítmica dos dados não paramétricos.

Gráfico 2 – Escore de lesões epiteliais* para os diferentes segmentos do intestino delgado de leitões alimentados com 100 ppm de quitooligossacarídeo (QOS), 40 ppm de colistina (COL) ou 4,4 ppm de lincomicina (LIN).



*Escore de lesões epiteliais após exame histológico de acordo com a frequência e severidade das lesões no intestino delgado de acordo com Bracarense et al. (2012)

¹ Letras diferentes indicam tendência a médias estatisticamente diferentes ($P < 0,10$) pelo teste de Tukey.

Referências

- ALTAMURA, M.; CARADONNA, L.; AMATI, L.; PELLEGRINO, N. M.; URGESI G.; MINIELLO, S. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, New York, v. 23, n. 2, p.153-161, 2001.
- ANDRADE, C.; ALMEIDA, V. V.; COSTA, L. B.; BERENCHTEIN, B.; MOURÃO, G. B.; MIYADA, V. S. Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 40, p. 788–796, 2011.
- BERTOLETTO, P. R. *Estudo morfológico do intestino delgado de ratos na isquemia-reperfusão sob oxigenação hiperbárica*. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BRACARENSE, A. F. L.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; PACHECO, G. D.; MOLL, W.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, v.107, p. 1776 – 1786, 2012.
- COSTA, L. B.; ALMEIDA, V. V.; BERENCHTEIN, B.; TSÉ, M. L. P., ANDRADE, C.; MIYADA, V. S. Aditivos fitogênicos e butirato de sódio como alternativas aos antibióticos para leitões desmamados. *Archivos de Zootecnia*, Córdoba, v. 60, n. 231, p. 733-744, 2011.
- COSTA, L. B.; TSÉ, M. L. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento de leitões recém-desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 589-595, 2007.
- GOMES, J. D. F.; PUTRINO, S. M.; MARTELLI, M. R.; DE PAULA ISHI, M., AMARAL SOBRAL, P. J.; FUKUSHIMA, R. S. Morfologia de órgãos digestivos e não digestivos de suínos de linhagens modernas durante as fases de crescimento, terminação e pós-terminação. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, v. 29, n. 3, p. 261-266, 2007.
- GONZALES, E.; MELLO, H. H. C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. *Revista UFG*, Goiânia, Ano 13, n. 13, p. 48 – 53, 2012.
- GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cellular Microbiology*, Oxford, n. 9, v. 1, p. 204-221, 2007.
- HAN, K. N.; KWON, I. K.; LOHAKARE, J. D.; HEO, S.; CHAE, B. J. Chito-oligosaccharides as an alternative to antimicrobials in improving performance, digestibility and microbial ecology of the gut in weanling pigs. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, Korea, v. 20, n. 4, p. 556 – 562, 2007.
- HEO, J. M.; OPAPEJU, F. O.; PLUSKE, J. R.; KIM, J. C.; HAMPSON, D. J.; NYACHOTI, C. M. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Berlin, v. 97, n. 2, p. 207-237, 2013.
- ITANO, F. H. *Otimização da produção de quitinases de Bacillus spp.* 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

- KORNEGAY, E. T.; EVANS, J. L.; RAVINDRAN, V. Effects of diet acidity and protein level or source of calcium on the performance, gastrointestinal content measurements, bone measurements, and carcass composition of gilt and barrow weanling pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 72, n. 10, p. 2670-2680, 1994.
- KUMMER, R.; GONÇALVES, M. A. D.; LIPPKE, R. T.; MARQUES, B. M. F. P.; MORES, T. J. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 37, n. 1, S195-S209, 2009.
- KYRIAKIS, S. C.; TSILOYIANNIS, V. K.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K.; TSINAS, A. C.; ALEXOPOULOS, C.; JANSEGGERS, L. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science*, London, v. 67, n. 3, p. 223-228, 1999.
- LALLÈS, J. P.; BOUDRY, G.; FAVIER, C.; LE FLOC'H, N.; LURONA, I.; MONTAGNE, L.; OSWALD, I. P.; PIE, S.; PIEL, C.; SÈVE, B. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research*, Paris, v. 53, n. 4, p.301–316, 2004.
- LI, J.; SHI, B.; YAN, S.; JIN, L.; GUO, Y.; XU, Y.; LI, T.; GUO, X. Effects of dietary supplementation of chitosan on humoral and cellular immune function in weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 186, n. 3-4, p. 204 –208, 2013.
- MA, Y.; HUANG, Q.; LV, M.; WU, Z.; XIE, Z.; HAN, X.; WANG, Y. Chitosan-Zn chelate increases antioxidant enzyme activity and improves immune function in weaned piglets. *Biological Trace Elements Research*, San Diego, v. 158, n. 1, p. 45-50, 2014.
- MENTEN, J. F. M. *Eficácia, efeito sinérgico e modo de ação de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento em suínos*. (Livre-Docência) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.
- MONTAGNE, L.; PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 95- 117, 2003.
- MORÉS, N. É possível produzir suínos sem o uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho? In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 6., 2014, São Pedro. *Anais...* São Pedro: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122662/1/final7575.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2015.
- PALERMO NETO, J.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 52, p. 641 – 658.
- PARTANEN, K. Uso de aditivos na produção de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. *Anais...* Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 45-62.
- RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E. T. Acidification of weaner pig diets: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, New York, v. 62, p. 313-322, 1993.
- RIZZO, P. V.; MENTEN, J. F. M.; RACANICCI, A. M. C.; TRALDI, A. B.; SILVA, C. S.; PEREIRA, P. W. Z. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 801-807, 2010.

RODRIGUES, V. V. *Plasma sanguíneo com ou sem antibiótico em dietas para leitões desmamados aos 28 dias de idade*. 2013. 88 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. GOMES, P. C., OLIVEIRA, R. F. M., LOPES, D. C., FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2011.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. Monitoramentos clínicos. In: _____. *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone, 2007. p. 723-726.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: macrolídios, lincosamidas, rinfamicinas, fosfomicina e novobiocina. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 40, p. 482 - 486.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Basel, v. 70, n. 4, p. 631-659, 2013.

VERNIA, P.; CAPRILLI, R.; LATELLA, G.; BARBETTI, F.; MAGLIOCCA, F. M.; CITTADINI, M. Fecal lactate and ulcerative colitis, *Gastroenterology*, London, v. 95, p. 1564-1568, 1988.

XIAO, D.; WANG, Y.; LIU, G.; HE, J.; QIU, W.; HU, X. Effects of chitosan on intestinal inflammation in weaned pigs challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 9, n. 8, p. 104192 – 104199, 2014.

XIONG, X.; YANG, H.S.; WANG, X. C.; HU, Q.; LIU, C. X.; WU, X.; DENG, D. J.; HOU, Y. Q.; NYACHOTI, C. M.; XIAO, D. F.; YIN, Y. L. Effect of low dosage of chito-oligosaccharide supplementation on intestinal morphology, immune response, antioxidant capacity, and barrier function in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1089-1097, 2015.

YANG, C. M.; FERKET, P. R.; HONG, Q. H.; ZHOU, J.; CAO, G. T.; ZHOU, L.; CHEN, A. G. Effect of chito-oligosaccharide on growth performance, intestinal barrier function, intestinal morphology and cecal microflora in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 90, n. 8, p. 2671-2676, 2012.

YIN, Y. L.; TANG, Z. R.; SUN, Z. H.; LIU, Z. Q.; LI, T. J.; HUANG, R. L.; RUAN, Z.; DENG, Z. Y.; GAO, B.; CHEN, L. X.; WU, G. Y.; KIM, S. W. Effect of galacto-mannan-oligosaccharides or chitosan supplementation on cytoimmunity and humoral immunity in early-weaned piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Korea, v. 21, n. 5, p. 723-731, 2008.

5 CONSIDERAÇÕES

O conceito de saúde intestinal quando entendido como a manutenção do equilíbrio dinâmico das funções secretórias, absorptivas e imunes do TGI, torna-se não só o objetivo final da nutrição e produção de leitões, mas o caminho pelo qual este objetivo pode ser atingido. Dessa forma, o QOS e todas as respostas obtidas por este trabalho devem ser compreendidas tão somente como parte deste caminho, assim como outros aditivos que se propõe a servir de substitutos para o uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento. O exemplo de produção europeu dos últimos anos é, sem dúvida, um modelo a ser seguido quando se busca uma produção suinícola sustentável e sem antibióticos. Manejos simples, mas eficazes, dedicação à higiene e limpeza de instalações, à prevenção de doenças e ao encontro de um sistema de produção que permita que se produzam leitões fisiologicamente saudáveis e prontos para um desafio como o período de desmame devem ser a mola propulsora para um novo olhar sobre a suinocultura. Dessa forma, a nutrição e todos os seus aspectos relevantes não só para a performance, mas para a vida dos leitões, pode se desafiar cada vez mais a encontrar soluções inteligentes e aditivos melhoradores, como o QOS, para que a produção alimentar consiga ser sempre mais saudável e de melhor qualidade para toda população.

REFERÊNCIAS

- AAM, B. B.; HEGGSET, E. B.; NORBERG, A. L.; SØRLIE, M.; VARUM, K. M.; EIJSINK, V. G. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 5, p. 1482-1517, 2010.
- ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. **Nature Reviews: Immunology**, London, v. 10, n. 2, p. 131–144, 2010.
- ABREU, M. L. T.; DONZELE, J. L.; SARAIVA, A.; FLÁVIA, R.; OLIVEIRA, M.; FORTES, E. I.; GRAÑA, G. L. Glutamina, nucleotídeos e plasma suíno em rações para leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 520-525, 2010.
- ALVARENGA, P. V. A.; **Mananas e glucanas em dietas para leitões recém-desmamados**. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2016.
- AUMAITRE, A.; SEVE, B. Nutritional importance of colostrum in the piglet. **Annales de Recherches Veterinaires**, Paris, v. 9, n. 2, p. 181-192, 1978.
- BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A. SEMENKOVICH, C. F., GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 44, p. 15718 –15723, 2004.
- BAILEY, M.; HAVERSON, K.; INMAN, C.; HARRIS, C.; JONES, P.; CORFIELD, G.; MILLER, B.; STOKES, C. The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 64, n. 4, p. 451–457, 2005.
- BALZAN, S.; QUADROS, C. A.; CLEVA, R.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 22, n. 4, p. 464-471, 2007.
- BEDFORD, M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. **World's Poultry Science Journal**, London, v. 56, n. 4, p. 347-365, 2000.
- BERGERON, K.; JULIEN, P.; DAVIS, T. A.; MYRE, A.; THIVIERGE, M. C. Long-chain n-3 fatty acids enhance neonatal insulin-regulated protein metabolism in piglets by differentially altering muscle lipid composition. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 48, n. 11, p. 2396-2410, 2007.
- BIKKER, P.; DIRKZWAGER, A.; FLEDDERUS, J.; TREVISI, P.; LE HUEROU-LURON, I.; LALLES, J. P.; AWATI, A. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, v. 12, p. 3337-3345, 2006.

- BINTER, C.; KHOL-PARISINI, A.; GERNER, W.; SCHAFER, K.; HULAN, H. W.; SAALMULLER, A.; ZENTEK, J. Effect of maternally supplied n-3 and n-6 oils on the fatty acid composition and mononuclear immune cell distribution of lymphatic tissue from the gastrointestinal tract of suckling piglets. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 65, n. 5, p. 341–353, 2011.
- BLACHIER, F.; WU, G.; YIN, Y. (Ed.). **Nutritional and physiological functions of amino acids in pigs**. Vienna: Springer, 2013.
- BLAUT, M.; CLAVEL, T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implication for health and disease. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 137, n. 3, p. 751S-755S, 2007.
- BLIKSLAGER, A. T.; ROBERTS, M. C.; RHOADS, J. M.; ARGENZIO, R. A. Prostaglandins I-2 and E-2 have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in porcine ileum. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 100, n. 8, p. 1928–1933, 1997.
- BOUDRY, G.; PÉRON, V.; LE HUËROU-LURON, I.; LALLÈS, J. P.; SÈVE, B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 134, n. 9, p. 2256-2262, 2004.
- BRITO, M. S.; OLIVEIRA, C. F. S.; SILVA, T. R. G.; LIMA, R. B.; MORAIS, S. N.; SILVA, J. H. V. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos: revisão. **Acta Veterinária Brasileira**, Mossoró, v. 2, n. 4, p. 111-117, 2009.
- BRUININX, E. M. A. M.; BINNENDIJK, G. P.; VAN DER PEET-SCHWERING, C. M. C.; SCHRAMA, J. W.; DEN HARTOG, L. A.; EVERTS, H.; BEYNEN, A. C. Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 1413-1418, 2002.
- BUDDINGTON, R. K.; SANGILD, P. T. Companion animals symposium: development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1506–1519, 2011.
- BURKEY, T. E.; SKJOLAAS, K. A.; MINTON, J. E. Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. **Journal of animal science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 1493-1501, 2009.
- BURRIN, D. G.; STOLL, B. Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 29, n. 1, p. 65-96, 2002.
- BURRIN, D. G.; STOLL, B.; GUAN, X.; CUI, L.; CHANG, X.; HADSELL, D. GLP-2 rapidly activates divergent intracellular signaling pathways involved in intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 292, n. 1, p. E281-E291, 2007.
- BURRIN, D. G.; STOLL, B.; JIANG, R. H.; CHANG, X. Y.; HARTMANN, B.; HOLST, J. J.; GREELEY, G. H.; REEDS, P. J. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets: how much is enough? **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 1603–1610, 2000.

- CAMPBELL, J. M.; CRENSHAW, J. D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 4, n. 19, p. 1-4, 2013.
- CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active enZYmes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, D233–D238, 2009.
- CASTILLO GÓMEZ, M.; MARTÍN ORÚE, S. M. **Development of gut microbiota in the pig**. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.
- CILIEBORG, M. S.; BOYE, M.; THYMANN, T.; JENSEN, B. B.; SANGILD, P. T. Diet-dependent effects of minimal enteral nutrition on intestinal function and necrotizing enterocolitis in preterm pigs. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thousand Oaks, v. 35, n. 1, p. 32-42, 2011.
- COLE, M.; VARLEY, M. Recent advances in the feeding and nutrition of the piglet. SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 5., São Paulo, Expo Center Norte. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. p. 37-52.
- CORASSA, A.; LOPES, D. C.; BELLAVÉ, C. Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos e probióticos para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 61, n. 235, p. 467-476, 2012.
- COSTA, M. M. D.; DRESCHER, G.; MABONI, F.; WEBER, S. D. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; VARGAS, A. C. D. Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 30-36, 2010.
- COSTA, M.; MALBONI, F.; WEBER, S. S.; FERRONATO, A. I.; SCHRANK, I. S.; VARGAS, A. Patotipos de *escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 509-516, 2009.
- COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. **Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs**, 2003.
- CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 7, n. 11, p. 353-361, 1996.
- DAVIS, T. A.; NGUYEN, H. V.; GARCIA-BRAVO, R.; FIOROTTO, M. L.; JACKSON, E. M.; REEDS, P. J. Amino acid composition of the milk of some mammalian species changes with stage of lactation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 72, n. 6, p. 845-853, 1994.
- DENG, D.; YAO, K.; CHU, W.; LI, T.; HUANG, R.; YIN, Y.; WU, G. Impaired translation initiation activation and reduced protein synthesis in weaned piglets fed a low-protein diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 20, n. 7, p. 544-552, 2009.
- DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

- DOUGLAS, S. L.; WELLOCK, I.; EDWARDS, S. A.; KYRIAZAKIS, I. High specification starter diets improve the performance of low birth weight pigs to 10 weeks of age. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 4741-4750, 2014.
- DROZDOWSKI, L. A.; CLANDININ, T.; THOMSON, A. B. R. Ontogeny, growth and development of the small intestine: understanding pediatric gastroenterology. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, Pleasanton, v. 16, n. 7, p. 787–799, 2010.
- ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, Washington, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.
- FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, É.; GYLES, C. L. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 6, n. 1, p. 17-39, 2005.
- FLINT, H. J.; BAYER, E. A.; RINCON, M. T.; LAMET, R.; WHITE, B. A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews: Microbiology**, London, v. 6, n. 2, p. 121–131, 2008.
- FRASER, D.; PAJOR, E. A.; FEDDES, J. J. R. The relationship between creep feeding behavior of piglets and adaptation to weaning: Effect of diet quality. **Canadian Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. 1-6, 1994.
- GARCÍA, K. E.; SOUZA, T. C. R.; LANDÍN, G. M.; BARREYRO, A. A.; SANTOS, M. G. B.; SOTO, J. G. G. Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets fed a low protein diet supplemented with probiotics. **Food and Nutrition Sciences**, Olsztyn, v. 5, n. 18, p. 1776-1786, 2014.
- GATTÁS, G.; FERREIRA, A. S.; BARBOSA, F. S.; DONZELE, J.; LOPES, D. Plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 14 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 278-285, 2008.
- GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. V.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.
- GILLESPIE, J.; FLANDERS, F. **Modern livestock & poultry production**. Stamford: Cengage Learning, 2009.
- GONZALES, E.; MELLO, H. H. C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, Goiânia, Ano 13, n. 13, p. 48 – 53, 2012.
- GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, n. 9, v. 1, p. 204-221, 2007.
- HAN, K. N.; KWON, I. K.; LOHAKARE, J. D.; HEO, S.; CHAE, B. J. Chito-oligosaccharides as an alternative to antimicrobials in improving performance, digestibility

and microbial ecology of the gut in weanling pigs. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, Korea, v. 20, n. 4, p. 556 – 562, 2007.

HEALY, M. G.; ROMO, C. R.; BUSTOS, R. Bioconversion of marine crustacean shell waste. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 139-147, 1994.

HEDEMANN, M. S.; ESKILDSEN, M.; LAERKE, H. N.; PEDERSEN, C.; LINDBERG, J. E.; LAURINEN, P.; BACH KNUDSEN, K. E. Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 1375-1386, 2006.

HEO, J. M.; KIM, J. C.; HANSEN, C. F.; MULLAN, B. P.; HAMPSON, D. J.; PLUSKE, J. R. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 62, n. 2, p. 343-358, 2008.

HEO, J. M.; OPAPEJU, F. O.; PLUSKE, J. R.; KIM, J. C.; HAMPSON, D. J.; NYACHOTI, C. M. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 97, n. 2, p. 207-237, 2013

HERMES, R. G.; MOLIST, F.; YWAZAKI, M.; NOFRARIAS, M.; GOMEZ DE SEGURA, A.; GASA, J.; PÉREZ, J. F. Effect of dietary level of protein and fiber on the productive performance and health status of piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 11, p. 3569-3577, 2009.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, Washington, v. 292, n. 5519, p. 1115-1118, 2001.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, n. 3, p. 159–169, 2010.

HORTA, F. C. **Avaliação do desempenho de suínos alimentados com mananoligossacarídeos (MOS)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

HOUDIJK, J. G. M.; HARTEMINK, R.; VERSTEGEN, M. W. A.; BOSCH, M. W. Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 56, n. 4, p. 297-307, 2002.

HU, C. H.; GU, L. Y.; LUAN, Z. S.; SONG, J.; ZHU, K. Effects of montmorillonite-zinc oxide hybrid on performance, diarrhea, intestinal permeability and morphology of weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 108–115, 2012.

INOUE, R.; TSUKAHARA, T.; NAKANISHI, N.; USHIDA, K. Development of the intestinal microbiota in the piglet. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 51, n. 4, p. 257-265, 2005.

ITANO, F. H. **Otimização da produção de quitinases de *Bacillus* spp.** 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

JACOBI, S. K.; MOESER, A. J.; CORL, B. A.; HARRELL, R. J.; BLIKSLAGER, A. T.; ODLE, J. Dietary long-chain PUFA enhance acute repair of ischemic-injured intestine of suckling pigs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 14, n. 7, 2012, p. 1266-1271.

JACOBI, S. K.; ODLE, J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, Bethesda, v. 3, n. 5, p. 687-696, 2012.

JAIN, A. K.; STOLL, B.; BURRIN, D. G.; HOLST, J. J.; MOORE, D. D. Enteral bile acid treatment improves parenteral nutrition-related liver disease and intestinal mucosal atrophy in neonatal pigs. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 302, n. 2, G218-G224, 2012.

JUNG, W.-J.; PARK, R.-D. Bioproduction of chitoooligosaccharides: present and perspectives. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 11, p. 5328-5356, 2014.

KANSAGRA, K.; STOLL, B.; ROGNERUD, C.; NIINIKOSKI, H. O. U. C. N.; HARVEY, R.; BURRIN, D. Total parenteral nutrition adversely affects gut barrier function in neonatal piglets. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 285, n. 6, G1162-G1170, 2003.

KIM, S.-K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 62, n. 4, p. 357-368, 2005.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, Philadelphia, v. 12, n. 5, p. 319-330, 2010.

KINNEBREW M. A.; PAMER, E. G. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 245, n. 1, p. 113-131, 2012.

KOLIDA, S.; TUOHY, K.; GIBSON, G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 87, s. 2, p. S193-S197, 2002.

KOMURA, M.; FUKUTA, T.; GENDA, T.; HINO, S.; AOE, S.; KAWAGISHI, H.; MORITA, T. A short-term ingestion of fructo-oligosaccharides increases immunoglobulin A and mucin concentrations in the rat cecum, but the effects are attenuated with the prolonged ingestion. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Abingdon, v. 78, n. 9, p. 1592-1602, 2014.

KORNEGAY, E. T.; EVANS, J. L.; RAVINDRAN, V. Effects of diet acidity and protein level or source of calcium on the performance, gastrointestinal content measurements, bone measurements, and carcass composition of gilt and barrow weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, n. 72, p. 2670-2680, 1994.

KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the acid of papain

and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **The Biochemical Journal**, London, v. 391, p. 167–175, 2007.

LALLÈS, J. P.; BOUDRY, G.; FAVIER, C.; LE FLOC'H, N.; LURONA, I.; MONTAGNE, L.; OSWALD, I. P.; PIE, S.; PIEL, C.; SÈVE, B. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, Paris, v. 53, n. 4, p.301–316, 2004.

LALLÈS, J.-P.; BOSI, P.; SMIDT, H. STOKES, C. R. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 66, n. 2, p. 260-268, 2007.

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, London, v. 61, n. 3, p. 219-225, 2010.

LE DIVIDICH, J.; SÈVE, B. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. **Domestic Animal Endocrinology**, Stonehan, v.19, n. 2, p. 63-74, 2000.

LE DIVIDICH, J.; THOMAS, F.; RENOULT, H.; OSWALD, I. Acquisition de l'immunité passive chez le porcelet: rôle de la quantité d'immunoglobulines ingérées et de la perméabilité intestinale. **Journées de la Recherche Porcine**, Paris, v. 37, p. 443-448, 2005.

LI, X. J.; PIAO, X. S.; KIM, S. W.; LIU, P.; WANG, L.; SHEN, Y. B.; LEE, H. S. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on performance, nutrient digestibility, and serum composition in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1107-1114, 2007.

LIBAO-MERCADO, A. J.; ZHU, C. L.; CANT, J. P.; LAPIERRE, H.; THIBAUT, J.-N.; SÈVE, B.; FULLER, M. F.; DE LANGE, C. F. M. Dietary and endogenous amino acids are the main contributors to microbial protein in the upper gut of normally nourished pigs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 139, n. 6, p. 1088–1094, 2009.

LIU, P.; PIAO, X. S.; KIM, S. W.; WANG, L.; SHEN, Y. B.; LEE, H. S.; LI, S. Y. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of and in weaning pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2609-2618, 2008.

LUNA, U.V., CARAMORI JÚNIOR, J.G., CORRÊA, G.S.S., KIEFER, C., SOUZA, M.A., VIEITES, F.M., CRUZ, R.A.S., ASSIS, S.D. Mananoligossacarídeo e β -glucano em dietas de leitões desmamados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 67, n. 2, p. 591-599, 2015.

MA, Y.; HUANG, Q.; LV, M.; WU, Z.; XIE, Z.; HAN, X.; WANG, Y. Chitosan-Zn chelate increases antioxidant enzyme activity and improves immune function in weaned piglets. **Biological Trace Elements Research**, San Diego, v. 158, n. 1, p.45-50, 2014.

MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L.; LAGE, A. P.; RISTOW, L. E.; REIS, A.; GUEDES, R. M. C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, p. 5, p. 1117-1123, 2007.

MADEC, F.; ROSE-AFSSA, N. I. C. O. L. A. S. Post-weaning multi-systemic wasting syndrome in pigs: why did it emerge? In: ANNUAL SYMPOSIUM NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES. The new energy crisis: food, feed or fuel? 23., 2007, Alltech UK. **Proceedings...** Alltech UK: Nottingham University Press, 2007. p. 65-70.

MARION, J.; PETERSEN, Y. M.; ROMÉ, V.; THOMAS, F.; SANGILD, P. T.; LE DIVIDICH, J.; LE HUËROU-LURON, I. Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the postranscriptional level. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 41, n. 4, p. 401-410, 2005.

MATEOS, G. G.; LÁZARO, R.; MEDEL, P. Feeding strategies for intensive livestock production without in feed antibiotic growth promoters. In: CONFERENCE-SHOW FEED MANUFACTURING IN THE MEDITERRANEAN REGION, 3., 2000, Reus ES. **Proceeding...** Reus ES: CIHEAM, 2000.

MCCRACKEN, B. A.; GASKINS, H. R.; RUWE-KAISER, P. J.; KLASING, K. C.; JEWELL, D. E. Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 125, n. 11, p. 2838-2845, 1995.

MELLO, R. O.; SILVA, C. M. G.; FONTE, F. P.; SILVA, D. L. F.; PEREIRA, J. A.; MARGARIDO, N. F.; MARTINEZ, C. A. R. Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2012.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polymyxins: review with emphasis on nephrotoxicity. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 752-759, 2009.

MENESES, M. A., SILVA, F. F., SILVA, R. R., SCHIO, A. R., SILVA, G. M., RODRIGUES, E. S. O.; PIMENTEL, L. R. Composição em ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com glicerina de baixa pureza. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, 971-984, 2015.

METZLER-ZEBELI, B. U.; HOODA, S.; PIEPER, R.; ZIJLSTRA, R. T.; VAN KESSEL, A. G.; MOSENTHIN, R.; GÄNZLE, M. G. Nonstarch polysaccharides modulate bacterial microbiota, pathways for butyrate production, and abundance of pathogenic *Escherichia coli* in the pig gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 11, p. 3692-3701, 2010.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, Kidlington, v. 24, n. 2, p. 184-197, 2005.

MOLIST, F.; GOMES DE SEGURA, A.; GASA, A.; HERMES, R. G.; MANZANILLA, E. G.; ANGUITA, M.; PÉREZ, J. F. Effects of the insoluble and soluble dietary fibre on the physicochemical properties of digesta and microbial activity in early weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 149, p. 346-353, 2009.

MONTAGNE, L.; PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 95- 117, 2003.

MONTILLA, A.; RUIZ-MATUTE, A. I.; CORZO, N.; CECILIA GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G. Enzymatic generation of chitooligosaccharides from chitosan using soluble and immobilized glycosyltransferase (Branchzyme). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 43, p. 10360–10367, 2013.

MORETÓ, M.; PÉREZ-BOSQUE, A. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 14, p. E92-E100, 2009.

MOROWITZ, M. J.; POROYKO, V.; CAPLAN, M.; ALVERDY, J.; LIU, D. C. Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. **Pediatrics**, Springfield, n. 125, v. 4, p. 777-785, 2010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: approved standard M31-A2. 2th ed. Villanova, PA: NCCLS, 2002.

PALERMO NETO, J.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 52, p. 641 – 658.

NEU, J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 85, n. 2, p. 629S–34S, 2007.

NICHOLS, N. L.; BERTOLO, R. F. Luminal threonine concentration acutely affects intestinal mucosal protein and mucin synthesis in piglets. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 138, n. 7, p. 1298–1303, 2008.

NYACHOTI, C. M.; OMOGBENIGUN, F. O.; RADEMACHER, M.; BLANK, G. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 125-134, 2006.

OSWALD, I. P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 37, n. 3, p. 359-368, 2006.

OTTO, E. R.; YOKOYAMA, M.; HENGEMUEHLE, S.; VON BERMUTH, R. D.; VAN KEMPEN, T.; TROTTIER, N. L. Ammonia, volatile fatty acids, phenolics, and odor offensiveness in manure from growing pigs fed diets reduced in protein concentration. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 7, p. 1754–1763, 2003.

PÁCHA, J. Development of intestinal transport function in mammals. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 80, n. 4, p. 1633-1667, 2000.

PARTANEN, K. Uso de aditivos na produção de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. p. 45-62.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 2, n. 2, p. 115-125, 2012.

PENDERS, J. C.; THUIJS, C.; VINK, F. F.; STELMA, B.; SNIJDERS, I.; KUMMELING, P. A.; VAN DEN, BRANDT, P. A.; STOBBERINGH, E. E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, Springfield, v. 118, n. 2, p. 511-521, 2006.

PENG, L.; LI, Z. R.; GREEN, R. S.; HOLZMAN, I. R.; LIN, J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 139, n. 9, p. 1619-1625, 2009.

PIEPER, R.; BINDELLE, J.; ROSSNAGEL, B.; VAN KESSEL, A.; LETERME, P. Effect of carbohydrate composition in barley and oat cultivars on microbial ecophysiology and the proliferation of *Salmonella enterica* in an in vitro model of the porcine gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 22, p. 7006-7016, 2009.

PIEPER, R.; KROGER, S.; RICHTER, J. F.; WANG, J.; MARTIN, L.; BINDELLE, J.; HTOO, J. K.; VON SMOLINSKI, D.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. VAN KESSEL, A. G. Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 142, n. 4, 661-667, 2012.

PINHO, M. A biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 119-123, 2008.

PLUSKE, J. R. Feed-and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 4, n. 1, p. 1, 2013.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, J. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 51, n. 1-3, p. 215-236, 1997.

PLUSKE, J. R.; KERTON, D. K.; CRANWELL, P. D.; CAMPBELL, R. G.; MULLAN, B. P.; KING, R. H.; POWER, G. N.; PIERZYNOWSKI, S. G.; WESTROM, B.; RIPPE, C.; PEULEN, O.; DUNSHEA, F. R. Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. **Crop and Pasture Science**, Collingwood, v. 54, n. 5, p. 515-527, 2003.

PUPPE, B.; TUCHSCHERER, A. The development of suckling frequency in pigs from birth to weaning of their piglets: a sociobiological approach. **Animal Science-Glasgow-**, Glasgow, v. 71, n. 2, p. 273-280, 2000.

QUINTANA, L. R. **Produção e caracterização de produto fermentado rico em quitoooligossacarídeos**: efeito na alimentação de aves. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. **Mucosal Immunology**, Amsterdam, v. 1, p. S10-S14, 2008.

RHOADS, J. M.; CHEN, W.; GOOKIN, J.; WU, G. Y.; FU, Q.; BLIKSLAGER, A. T.; RIPPE, R. A.; ARGENZIO, R. A.; CANCE, W. G.; WEAVER, E. M.; ROMER, L. H. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. **Gut**, London, v. 53, n. 4, p. 514–522, 2004.

RHOADS, J. M.; WU, G. Y. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. **Amino Acids**, Wien, v. 37, n. 1, p. 111–122, 2009.

RHOADS, M.; FU, Q.; RIPPE, R.; ODLE, J.; GRAVES, L. M. Focal adhesion kinase (FAK) and p70 s6 kinase are critical for arginine stimulated intestinal cell migration. **Journal of Investigative Medicine**, Hagerstown, v. 52, p. S291-S292, 2004.

RICHARDS, J. D.; GONG, J.; LANGE, C. F. M. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 85, n. 4, p. 421-435, 2005.

RIST, V. T. S.; WEISS, E.; EKLUND, M.; MOSENTHIN, R. Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review. **Animal**, Cambridge, v.7, n. 7, p. 1067-1078, 2013.

ROBOSKY, L. C.; WELLS, D. F.; EGNASH, L. A.; MANNING, M. L.; REILY, M. D.; ROBERTSON, D. G. Metabonomic identification of two distinct phenotypes in Sprague–Dawley (CrI:CD(SD)) rats. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 87, n. 1, p. 277-284, 2005.

SALZEDAS-NETTO, A. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, J. L.; MENCHACA-DIAZ, J. L.; BUGNI, G. M.; WATANABE, A. Y.; KOH, I. H. J. Can bacterial translocation be a beneficial event? **Transplantation Proceedings**, Orlando, v. 38, n. 6, p. 1836-1837, 2006.

SELLERS, R. S.; MORTON, D. The Colon from banal to brilliant. **Toxicologic Pathology**, p. 0192623313505930, 2013.

SEVE, B.; REEDS, P. J.; FULLER, M. F.; CADENHEAD, A. Protein synthesis and retention in some tissues of the young pig as influenced by dietary protein intake after early-weaning. Possible connection to the energy metabolism. **Reproduction Nutrition Développement**, Les Ulis, v. 26, n. 3, p. 849-861, 1986.

SHERMAN, P. M.; CABANA, M.; GIBSON, G. R.; KOLETZKO, B. V.; NEU, J.; VEEREMAN-WAUTERS, G.; ZIEGLER, E. E.; WALKER, W.A. Potential roles and clinical utility of prebiotics in newborns, infants, and children: proceedings from a global prebiotic summit meeting. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 155, n. 5, S61-S70, 2009.

SHIM, S. B.; VERSTEGEN, W. A.; KIM, I. H.; KWON, O. S.; VERDONK, J. M. A. J. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or

synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 59, n. 6, p. 419–427, 2005.

SILVA, C. A.; ZOTTI, E. Antimicrobianos na suinocultura: aspectos técnicos e práticos de uso. In: BARRY, A. F.; ALFIERI, A. A.; SILVA, C. A.; DALLANORA, D.; ZOTTI, E.; ALBERTON, G. C.; RODRIGUES, I. M. T. C.; MACHADO, I. P.; GRIESSLER, K.; MORES, M. A. Z.; DITTRICH, R. L.; STARKL, V. (Org.). **Tópicos em sanidade e manejo de suínos**. Campinas: SANPHAR, 2010. p. 137-164.

SKRZYPEK, T.; VALVERDE PIEDRA, J. L., SKRZYPEK, H.; WOLIŃSKI, J.; KAZIMIERCZAK, W.; SZYMAŃCZYK, S.; PAWŁOWSKA, M.; ZABIELSKI, R. Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Krakow, v. 56, S71-S87, 2005.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; FAHEY, G. C. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2535-2545, 2003.

SMITH, P. D.; SMYTHIES, L. E.; SHEN, R.; GREENWELL-WILD, T.; GLIOZZI, M.; WAHL, S. M. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. **Mucosal Immunology**, Amsterdam, v. 4, n. 1, 31–42, 2011.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: macrolídios, lincosamidas, rinfamicinas, fosfomicina e novobiocina. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 40, p. 482 - 486.

STEIN, H. H. Experience of feeding pigs without antibiotics: a European perspective. **Animal Biotechnology**, New York, v. 13, n. 1, p. 85-95, 2002.

STEIN, H. H.; KIL, D. Y.; ROTH, J. A. **Strategies for managing weanling pigs fed no antibiotic growth promoters**. Champaign: University of Illinois, Urbana-Champaign, 2013.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 70, n. 4, p. 631-659, 2013.

SWIATCZAK, B.; RESCIGNO, M. How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 43-49, 2012.

SWORDS, W. E.; WU, C. C.; CHAMPLIN, F. R.; BUDDINGTON, R. K. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. **Neonatology**, Basel, v. 63, n. 3, p. 191-200, 1993.

THOMPSON, C. L.; WANG, B.; HOLMES, A. J. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. **The ISME Journal**, London, v. 2, n. 7, p. 739-748, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT. **Agriculture SDA**: reference of swine health and environmental management in the United States, 2006. Mar. 2008. Part. 3.

VAN DIJK, A. J.; ENTHOVEN, P. M. M.; VAN DEN HOVEN, S. G. C. VAN LAARHOVENB, M. M. M. H.; NIEWOLDC, T. A.; NABUURSC, M.J.A.; BEYNEND, A.C. The effect of dietary spray dried porcine plasma on clinical response in weaned piglets challenged with a pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 207-218, 2002.

VAN HAVER, E. R.; SANGILD, P. T.; OSTE, M.; SIGGERS, J. L.; WEYNS, A. L.; VAN GINNEKEN, C. J. Diet-dependent mucosal colonization and interleukin-1 β responses in preterm pigs susceptible to necrotizing enterocolitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 90–98, 2009.

VERDONK, J. M. A. J.; SPREEUWENBERG, M. A. M.; BAKKER, G. C. M.; VERSTEGEN, M. W. A. Nutrient intake level affects histology and permeability of the small intestine in newly weaned piglets. In: LINDBERG, J. E.; OGLE, B. **Digestive physiology of pigs**: proceedings of the 8th symposium. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 332-334.

WANG, M. Q.; DU, Y. J.; WANG, C.; TAO, W. J.; HE, Y. D.; LI, H. Effects of copper-loaded chitosan nanoparticles on intestinal microflora and morphology in weaned piglets. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 149, n. 2, p. 184-189, 2012.

WHITE, D. G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). In: ANNUAL MEETING, 2006, San Francisco. **Proceedings** San Francisco: AERA, 2006. p. 56-60.

WIEST, R.; KRAG, A.; GERBES, A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. **Gut**, London, v. 61, n. 2, p. 297-310, 2012.

WILLIAMS, B. A.; BOSCH, M. W.; AWATI, A.; KONSTANTINOV, S. R.; SMIDT H.; AKKERMANS, A. D. L.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. In vitro assessment of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: fermentable substrates and microbial activity. **Animal Research**, Paris, v. 54, n. 3, p. 191–201, 2005.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 207-228, 2001.

WU, Y., JIANG, Z., ZHENG, C., WANG, L., ZHU, C., YANG, X., MA, X. Effects of protein sources and levels in antibiotic-free diets on diarrhea, intestinal morphology, and expression of tight junctions in weaned piglets. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 170-176, 2015.

XIAO, D.; WANG, Y.; LIU, G.; HE, J.; QIU, W.; HU, X. Effects of chitosan on intestinal inflammation in weaned pigs challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. 104192 – 104199, 2014.

XIONG, X.; YANG, H.S.; WANG, X.C.; HU, Q.; LIU, C. X., WU, X.; DENG, D. J.; HOU, Y. Q.; NYACHOTI, C. M.; XIAO, D. F.; YIN, Y. L. Effect of low dosage of chito-oligosaccharide supplementation on intestinal morphology, immune response, antioxidant

capacity, and barrier function in weaned piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1089-1097, 2015.

XU, R. J.; SANGILD, P. T.; ZHANG, Y. Q.; ZHANG, S. H. Bioactive compounds in porcine colostrum and milk and their effects on intestinal development in neonatal pigs. In: ZABIELSKI, R.; GREGORY, P. C.; WESTROM, B. (Ed.). **Biology of the intestine in growing animals**. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 169 -192

XU, J.; MAHOWALD, M. A.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; MARTENS, E. C.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; MINX, P.; LATREILLE, P.; CORDUM, H.; VAN BRUNT, A.; KIM, K.; FULTON, R. S.; FULTON, L. A.; CLIFTON, S. W.; WILSON, R. K.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 7, e156, 2007.

XU, Y.; SHI, B.; YAN, S.; LI, T.; GUO, Y.; LI, J. Effects of chitosan on body weight gain, growth hormone and intestinal morphology in weaned pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Korea, v. 26, n. 10, p. 1484, 2013.

YANG, C. M.; FERKET, P. R.; HONG, Q. H.; ZHOU, J.; CAO, G. T.; ZHOU, L.; CHEN, A. G. Effect of chito-oligosaccharide on growth performance, intestinal barrier function, intestinal morphology and cecal microflora in weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 2671-2676, 2012.

YIN, Y. L.; TANG, Z. R.; SUN, Z. H.; LIU, Z. Q.; LI, T. J.; HUANG, R. L.; RUAN, Z.; DENG, Z. Y.; GAO, B.; CHEN, L. X.; WU, G. Y.; KIM, S. W. Effect of galacto-mannan-oligosaccharides or chitosan supplementation on cytoimmunity and humoral immunity in early-weaned piglets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Korea, v. 21, n. 5, p. 723-731, 2008.

YUE, L. Y.; QIAO, S. Y. Effects of low-protein diets supplemented with crystalline amino acids on performance and intestinal development in piglets over the first 2 weeks after weaning. **Livestock Science**, Melbourne, v. 115, n. 2, p. 144-152, 2008.

ZHANG, Y.; CHEN, D. W.; YU, B.; HE, J.; YU, J.; MAO, X. B.; ZHENG, P. Spray-dried chicken plasma improves intestinal digestive function and regulates intestinal selected microflora in weaning piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, 2015.

ZIMMERMANN, B.; BAUER, E.; MOSENTHIN, R. Pro- and prebiotics in pig nutrition—potential modulators of gut health? **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 10, n. 1, p. 47–56, 2001.