

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

PREBIÓTICOS EM SUBSTITUIÇÃO À ANTIMICROBIANO EM DIETAS DE LEITÕES
RECÉM-DESMAMADOS

PATRÍCIA VERSUTI ARANTES ALVARENGA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutora em Zootecnia.

BOTUCATU – SP

Março - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

PREBIÓTICOS EM SUBSTITUIÇÃO À ANTIMICROBIANO EM DIETAS DE LEITÕES
RECÉM-DESMAMADOS

PATRÍCIA VERSUTI ARANTES ALVARENGA
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Dirlei Antonio
Berto

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Livio
Panhoza Tse

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Março – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Alvarenga, Patrícia Versuti Arantes.

Prebióticos em substituição à antimicrobiano em dietas
de leitões recém-desmamados / Patrícia Versuti Arantes
Alvarenga. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Dirlei Antonio Berto

Coorientador: Marcos Lívio Panhoza Tse

Capes: 50403028

1. Alimentos - Aditivos. 2. Prebióticos. 3. Dietas. 4.
Leitão (Suíno) - Desempenho. 5. Saúde animal.

Palavras-chave: aditivos; desempenho; saúde; suínos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Patrícia Versuti Arantes Alvarenga - nascida em 13 de abril de 1991, na cidade de Santos/SP, filha de Marcelo Alvarenga e Janete Versuti, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, em março de 2009 e graduou-se em dezembro de 2013. Em março de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia da Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, onde foi bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e graduou-se em janeiro de 2016. Em março de 2016 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia da Unesp - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Durante a pós-graduação, atuou na área de nutrição e produção de suínos.

Dedicatória

À minha mãe Janete,

Pelo amor, paciência, ensinamentos de vida e espelho profissional.

Ao meu pai Marcelo,

Pelo amor, ensinamentos e base de força.

Ao meu irmão Douglas,

Pelo amor e exemplos de doçura e paz.

Aos meus avós Orlando e Maria do Carmo (*in memoriam*),

Pela base familiar, pelos exemplos de vida e profissionais, pelo amor incondicional.

Com muito amor e gratidão,

DEDICO.

Agradecimentos

À minha família, pela base que me proporcionou oportunidades e capacidade de chegar até aqui;

Ao Andrew, por todo o amor, paciência e ajuda neste período;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelo ensino gratuito e de qualidade desde a minha graduação;

Aos Departamentos de Zootecnia pelas bases de ensino e estrutura física e humana excelentes e únicas;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Aos Professores Dirlei Antonio Berto e Marcos Livio Panhoza Tse, pela oportunidade de orientação, amizade, pelos exemplos pessoais e profissionais e por toda ajuda durante a condução deste trabalho;

Ao Professor Ricardo de Oliveira Orsi pela amizade, ensinamentos e ajuda imprescindíveis para a execução de análises e interpretação de resultados;

Ao Professor Carlos Roberto Padovani pela ajuda com as análises estatísticas e atenção às dúvidas;

À todos os Professores dos Departamentos de Zootecnia, pelos ensinamentos e pelo convívio;

Aos amigos e funcionários do setor de Suinocultura, Franco e Sérgio, pela ajuda nas coletas de sangue e manejo dos animais, assim como pela amizade e ensinamentos;

Ao Laboratório UNIPEX e aos seus funcionários Leandro, Lucas (*in memoriam*), Renata e Maria Regina, pela ajuda, receptividade e paciência na condução de análises laboratoriais e elucidação de dúvidas;

Aos amigos e colegas de grupo de pesquisa, Vinicius, Sílvia, Mayra e Filipe, pela amizade, boas lembranças e por toda a ajuda no preparo e condução dos experimentos;

Ao Rafael, pela amizade, paciência e pelo tempo despendido em me ajudar durante as análises;

Aos alunos Yasmim, Sérgio, Gustavo, Felipe e Angélica pela ajuda na condução dos experimentos;

Aos amigos de República Vinicius, Evelyn, Caio e Marconi, pelas boas lembranças compartilhadas e vivência;

Aos amigos Erick e Samantha, pelo amor fraterno, entendimento de minhas ausências e apoio;

Ao Olinto Rodrigues de Arruda Júnior, pela parceria no fornecimento dos leitões para condução dos experimentos;

À empresa YES Synergy®, pela parceria e financiamento da pesquisa;

À todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais nas fases pré-inicia I, pré-iniciais II e iniciais	61
Tabela 2. Valores nutricionais calculados para as fases pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais ¹	62
Tabela 3. Níveis de inclusão (%) de mananoligossacarídeo (MOS), β -glucano, galactoligossacarídeo (GOS), frutoligossacarídeo (FOS) e do antimicrobiano melhorador de desempenho nas dietas experimentais de leitões recém-desmamados	62
Tabela 4. Consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP), conversão alimentar (CA) e incidência de diarreia (ID) dos leitões durante o período experimental (41 dias)65	
Tabela 5. Altura média de vilos (AV), profundidade média de criptas (PC), relação AV:PC, área de superfície de vilos (AS) e área de Placas de Peyer (PP) dos leitões aos 35 dias de idade	66
Tabela 6. Microbiologia do conteúdo do ceco dos leitões aos 35 dias de idade	66
Tabela 7. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo do cólon proximal dos leitões aos 35 dias de idade.....	66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais nas fases pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais.....	78
Tabela 2. Valores nutricionais calculados para as fases pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais ¹	79
Tabela 3. Níveis de inclusão (%) de mananoligossacarídeo (MOS), β -glucano, frutoligossacarídeo (FOS), galactoligossacarídeo (GOS), e do antimicrobiano melhorador de desempenho nas dietas experimentais de leitões recém-desmamados.....	79
Tabela 4. Eritrograma e plaquetas dos leitões antes e três horas após o desafio com LPS ⁸³	
Tabela 5. Leucograma dos leitões antes e três horas após o desafio com LPS.....	84
Tabela 6. Produção de espécies reativas de oxigênio (H ₂ O ₂) e nitrogênio (NO ₂) no sangue periférico dos leitões antes e três horas após o desafio com LPS	84
Tabela 7. Citocinas séricas antes e três horas após o desafio com LPS.....	85
Tabela 8. Imunoglobulinas séricas dos leitões antes e 15 dias após o desafio com LPS	85
Tabela 9. Proteína C-reativa e haptoglobina séricas dos leitões antes e 24 horas após o desafio com LPS	86
Tabela 10. Proteínas totais, albumina, globulinas e relação albumina:globulina do soro dos leitões antes e 24 horas após o desafio com LPS	86

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

A = Albumina

A/G = Relação albuminas:globulinas

AGCC = Ácidos graxos de cadeia curta

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APT = Água peptonada tamponada

AS = Área de superfície de vilos

AV = Altura de vilos

AV:PC = Relação altura de vilos:profundidade de criptas

CA = Conversão alimentar

CDR = Consumo diário de ração

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média

CV = Coeficiente de variação

DAMP = Padrão molecular associado à lesão

DB = Dieta basal

DC = Células dendríticas

ERN = Espécies reativas de nitrogênio

ERO = Espécies reativas de oxigênio

FAO = Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FDA = *Food and Drug Administration*

FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FOS = Frutoligossacarídeo

G = Globulinas

GALT = tecido linfóide associado à mucosa do trato gastrintestinal

GDP = Ganho diário de peso

GOS = Galactoligossacarídeo

ID = Incidência de diarreia

IFN = Interferon

IL = Interleucina

IN = Instrução Normativa

LPS = Lipopolissacarídeo

MALT = Tecido linfóide associado à mucosa

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC = Complexo de histocompatibilidade principal

MOS = Mananoligossacarídeo

NK = Células *Natural Killer*

OIE = Organização Mundial de Saúde Animal

OMC = Organização Mundial do Comércio

OMS = Organização Mundial da Saúde

ONDs = Oligossacarídeos não digestíveis

PAMP = Padrão molecular associado à patógeno

PC = Profundidade de criptas

PC = Proteína C-reativa

PFA = Proteínas de fase aguda

PRR = Receptor de reconhecimento padrão

PT = Proteínas totais

RDW = Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos

TGI = Trato gastrointestinal

Th-1 = Linfócitos T *helper* 1

Th-2 = Linfócitos T *helper* 2

TLR = Receptor celular do tipo TOLL

TNF- α = Fator de necrose tumoral- α

VCM = Volume corpuscular médio

ZnO = Óxido de zinco

CuSO₄H₂O = sulfato de cobre

Zn = Zinco

Cu = Cobre

Co = Cobalto

Mn = Manganês

I = Iodo

Se = Selênio

Fe = Ferro

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

NO = Óxido nítrico

OCl⁻ = Ânion hipoclorito

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	18
Considerações Iniciais	19
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1 Desenvolvimento fisiológico e imunológico de leitões.....	20
1.2 Sistema imune dos suínos	22
1.2.1 Sistema imune inato.....	23
1.2.2 Sistema imune adaptativo	28
1.3 Aditivos utilizados na suinocultura	30
1.3.1 Antimicrobianos melhoradores de desempenho	32
1.3.2 Prebióticos	35
1.3.2.1 β -glucanos.....	36
1.3.2.2 Mananoligossacarídeos	39
1.3.2.3 Frutoligossacarídeos	40
1.3.2.4 Galactoligossacarídeos	42
2. OBJETIVOS	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO 2.....	56
1. Introdução	59
2. Material e Métodos	60
2.1. <i>Instalação experimental e animais</i>	60
2.2 <i>Delineamento e dietas experimentais</i>	60
2.3 <i>Variáveis analisadas</i>	62
2.3.1 <i>Experimento 1</i>	62
2.3.2 <i>Experimento II</i>	63
2.4 <i>Análise estatística</i>	64
3. Resultados.....	64
3.1 <i>Desempenho</i>	64
3.2 <i>Morfometria, microbiologia e concentração de ácidos graxos de cadeia curta</i>	65
4. Discussão.....	66
4.1 <i>Desempenho</i>	66
4.2 <i>Morfometria, microbiologia e ácidos graxos de cadeia curta</i>	68
Referências	69
CAPÍTULO 3	73
1. Introdução	76
2. Material e Métodos	77
2.1 <i>Instalação experimental e animais</i>	77

<i>2.2 Delineamento e dietas experimentais</i>	77
<i>2.3 Desafio imunológico e coletas de sangue</i>	79
<i>2.4 Variáveis analisadas</i>	80
<i>2.4.1 Hemograma completo e citocinas</i>	80
<i>2.4.2 Quantificação de proteínas de fase aguda</i>	80
<i>2.4.3 Imunoglobulinas</i>	81
<i>2.4.4 Explosão Respiratória</i>	81
<i>2.5 Análise estatística</i>	82
3. Resultados	82
4. Discussão	86
<i>4.1 Hemograma completo</i>	86
<i>4.2 Explosão respiratória</i>	87
<i>4.3 Citocinas e imunoglobulinas</i>	88
<i>4.4 Proteínas de fase aguda e proteínas séricas</i>	89
Referências	91
Implicações	96

Prebióticos em substituição à antimicrobiano em dietas de leitões recém-desmamados

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar combinações dos prebióticos mananoligossacarídeo, β -glucano, frutoligossacarídeo e galactoligossacarídeo, em substituição ao antimicrobiano halquinol, em dietas de leitões recém-desmamados, sobre o desempenho, incidência de diarreia, saúde intestinal, parâmetros hematológicos e imunológicos. Foram realizados três experimentos, utilizando o total de 200 leitões recém-desmamados com idade média de 21 dias, distribuídos em delineamento em blocos inteiramente casualizados, com cinco tratamentos e oito repetições. Os tratamentos foram constituídos: CON = dieta basal (DB) + 120 ppm de halquinol; M β = DB + MOS e β -glucano (3,0 kg/t); F₉G₁ = DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 9:1); F₇G₃ = DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 7:3); F₅G₅ = DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 5:5). No período de 0-15d, os animais dos tratamentos CON e F₉G₁, apresentaram melhor ($P < 0,05$) conversão alimentar (CA) que os animais do tratamento M β . No período de 0-28d, os animais do tratamento F₉G₁ apresentaram tendência de melhor ($P < 0,10$) CA. No período de 0-41d, os animais do tratamento CON apresentaram melhor ($P < 0,05$) CA em comparação aos animais do F₇G₃, não diferindo dos demais tratamentos. Ao 14º dia experimental, 40 leitões foram abatidos para coleta de amostras, e outros 40 leitões receberam injeção via intramuscular de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (O55:B5). Para as variáveis de morfometria, no duodeno, houve maior ($P < 0,05$) altura de vilos (AV) nos animais dos tratamentos CON, M β e F₉G₁ em relação aos animais do tratamento F₇G₃ e também maior ($P < 0,05$) área de superfície de vilos (AS) nos animais dos tratamentos M β e F₉G₁ em relação aos animais do F₇G₃. No jejuno, houve maior ($P < 0,05$) relação altura de vilos:profundidade de criptas (AV:PC) nos animais que receberam CON comparados aos animais do tratamento F₇G₃. Para o hemograma, após o desafio, houve redução ($P < 0,05$) na contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito nos animais do grupo F₉G₁, porém, aumento ($P > 0,05$) da concentração de hemoglobina corpuscular média, comparando com o momento anterior ao desafio. Todas as variáveis do leucograma foram reduzidas ($P < 0,05$) após o desafio, para todos os tratamentos. Antes do desafio, os leitões que receberam o tratamento CON apresentaram maior ($P < 0,05$) contagem de neutrófilos segmentados comparada com os leitões do grupo F₅G₅. Com relação à explosão respiratória, após desafio com LPS, somente os animais do tratamento F₉G₁ aumentaram ($P < 0,05$) a produção de

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e somente os animais dos grupos F_9G_1 e CON mantiveram ($P>0,05$) a produção de óxido nítrico (NO), com relação ao momento anterior ao desafio. Houve aumento ($P<0,05$) na produção de proteína C-reativa (PC) nos leitões dos grupos CON, M β e F_9G_1 , comparando os momentos antes e após desafio. Conclui-se que leitões alimentados com dietas contendo a combinação de prebióticos na proporção 0,20% de MOS e β -glucano, 0,09% de FOS e 0,01% de GOS (F_9G_1) apresentaram melhorias sobre o desempenho e saúde dos animais, de forma semelhante ou melhorada ao uso do antimicrobiano halquinol.

Palavras-chave: aditivos, desempenho, saúde, suínos

Prebiotics in substitution to antimicrobial in diets of weanling pigs

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate prebiotic combinations of mannanigosaccharide, β -glucan, fructoligosaccharide and galactoligosaccharide, in substitution to antimicrobial halquinol, in diets of weanling pigs, on the performance, diarrhea incidence, intestinal health, hematological and immunological parameters. It were carried out three experiments, using a total of 200 weanling pigs, 21 d-old in average, distributed in a completely randomized block design with five treatments and eight replicates. The treatments were: CON = basal diet (BD) + 120 ppm of halquinol; M β = BD + MOS and β -glucan (3.0 kg/t); F₉G₁ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS: GOS ratio 9:1); F₇G₃ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS: GOS ratio 7:3); F₅G₅ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS:GOS ratio 5:5). In the period of 0-15d, the animals of CON and F₉G₁ treatments presented better ($P<0.05$) feed conversion ratio (FCR) compared to the animals of M β treatment. In the period of 0-28d, the animals from F₉G₁ treatment tended to improve ($P<0.10$) FCR. In the period of 0-41d, animals fed CON treatment showed better ($P<0.05$) FCR compared to the animals fed F₇G₃, not differing from the other treatments. On the 14th experimental day, 40 piglets were slaughtered to collect samples, and others 40 piglets received intramuscular injection of *Escherichia coli* LPS (O55:B5). For morphometric variables, in the duodenum, there was higher ($P<0.05$) villus height (VH) in animals fed CON, M β and F₉G₁ treatments compared to those of F₇G₃ and also higher ($P<0.05$) villus surface area (SA) for the animals fed M β and F₉G₁ compared to animals of those of F₇G₃. In the jejunum, there was a higher ($P<0.05$) villus height crypt depth ratio (VH:CD) in the animals fed CON compared to the animals from F₇G₃ treatment. For blood count, after challenge, there was a reduction ($P<0.05$) for the erythrocyte, hemoglobin and hematocrit counts in F₉G₁ group, but also an increase ($P>0.05$) in the mean corpuscular hemoglobin concentration, compared to period prior challenge. All leukogram variables were reduced ($P<0.05$), after challenge, for all treatments. Prior to challenge, piglets from CON group had higher ($P<0.05$) segmented neutrophil counts compared to piglets of F₅G₅ group. Regarding the respiratory burst, after challenge with LPS, only F₉G₁ animals increased ($P<0.05$) hydrogen peroxide (H₂O₂) production, and only animals fed F₉G₁ and CON kept ($P>0.05$) nitric oxide (NO) production, compared to the moment before challenge. There was an increase ($P<0.05$) in the production of C-reactive protein (CP) in the piglets of the CON, M β and F₉G₁ groups, comparing the moments before and after LPS application. It is concluded

that piglets fed diets containing a combination of prebiotics in the proportion of 0.20% of MOS and β -glucan, 0.09% of FOS and 0.01% of GOS (F₉G₁) led to improvements in performance and health of the animals, similarly or better than the use of the antimicrobial halquinol.

Keywords: additives, health, performance, swine

CAPÍTULO 1

Considerações Iniciais

O desmame é um manejo crítico na produção de suínos, devido à ação de diversos agentes estressores, de ordens social (separação abrupta da porca e leitegada, mistura à novos lotes), ambiental (troca de galpão) e nutricional (troca de leite para ração sólida). Estes eventos, associados à imaturidade fisiológica e imunológica dos animais na idade de desmame, podem tornar o ambiente gastrointestinal propício à proliferação de bactérias patogênicas, levando à ocorrência de quadros diarreicos e danos ao epitélio, com redução da área absorptiva e, conseqüentemente, queda nos índices de desempenho (Pluske et al., 2003).

Para controlar a proliferação de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal, compostos antimicrobianos têm sido comumente utilizados como melhoradores de desempenho, porém, seu uso exacerbado tem sido associado à seleção de cepas bacterianas resistentes à antimicrobianos utilizados na medicina humana (Thacker et al., 2013). Desta forma, vários países limitaram ou mesmo proibiram o uso destes compostos como melhoradores de desempenho, reforçando a necessidade de estudos com outros compostos bioativos naturais capazes de melhorar a saúde geral e o desempenho dos suínos.

Neste sentido, os prebióticos vêm sendo amplamente estudados como aditivos alternativos aos antimicrobianos, os quais definem-se como compostos que não são digeridos ou absorvidos pelo organismo animal, porém servem como substrato para bactérias benéficas do trato gastrointestinal, levando à melhorias na saúde e desempenho do hospedeiro (Gibson e Roberfroid, 1995). Entre as substâncias prebióticas mais estudadas estão os oligossacarídeos não digestíveis (ONDs); como os frutoligossacarídeos (FOS), mananoligossacarídeos (MOS), galactoligossacarídeos (GOS) e β -glucanos; os quais são fermentados seletivamente por microrganismos benéficos no intestino grosso (Roy e Gibson, 1998). Dentre estes destacam-se as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que produzem substâncias estimulatórias para o sistema imune local do intestino, além de produzirem ácidos orgânicos, reduzindo o pH do meio e assim controlando indiretamente a proliferação de bactérias patogênicas (Silva e Nörnberg, 2003).

Diferenciando a funcionalidade dos ONDs, o MOS adsorve bactérias patogênicas gram negativas com fímbrias tipo-1 específicas (*Escherichia coli* e *Salmonella* spp.), impedindo-as de infectar enterócitos, sendo eliminadas nas fezes (Firon et al., 1983). Os β -glucanos, como moléculas imunomoduladoras, estimulam diretamente células imunológicas específicas, favorecendo a atividade antimicrobiana e citotóxica, e assim, aumentam a capacidade de induzir resposta imunológica mais rápida e eficiente por meio de maior produção de mediadores pró-inflamatórios (Williams et al., 1996; Rice et al., 2004). Os FOS e

GOS possuem alta capacidade bifidogênica, ou seja, são altamente seletivos por bactérias do gênero *Bifidobacterium*, que promovem uma série de melhorias na saúde do animal, através da produção de metabólitos que estimulam o sistema imune local intestinal e ativam uma cascata de reações imunológicas celulares e humorais (Xu et al., 2002; Tzortis et al., 2005).

De forma geral, a literatura demonstra resultados benéficos com a utilização de prebióticos na dieta de suínos, porém, não há estudos com leitões no período de creche avaliando os quatro compostos (MOS, β -glucano, FOS e GOS) combinados, em diferentes doses nas dietas, o que demonstra a importância de estudos com essa finalidade.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Desenvolvimento fisiológico e imunológico de leitões

A placenta da fêmea suína, denominada epitélio-corial, não permite a passagem de macromoléculas ao feto e dentre estas moléculas incluem-se as imunoglobulinas, de modo que os suínos nascem imunologicamente imaturos e recebem imunidade passiva somente ao ingerir o colostro materno. A ingestão do colostro pelos leitões é de suma importância, especialmente nas primeiras 24 horas, período em que as barreiras físicas intestinais do neonato ainda permitem a absorção das imunoglobulinas (Rooke e Bland, 2002). Contudo, após as primeiras horas do nascimento, o intestino delgado dos recém-nascidos segue se desenvolvendo e sofrendo alterações, podendo alterar a capacidade de absorção de macromoléculas, de modo que a absorção máxima de imunoglobulinas é atingida 4 a 12 horas após o nascimento, declinando posteriormente (Varley, 1995). Desta forma, o manejo de assistência ao parto é essencial para menor taxa de mortalidade, sendo a orientação à mamada um estímulo à ingestão de colostro nas primeiras horas pós-parto (Sobestiansky et al., 1998).

A taxa de sobrevivência na maternidade, por sua vez, não depende somente da absorção satisfatória das imunoglobulinas colostrais pelos neonatos (imunidade passiva), mas também da capacidade dos leitões desenvolverem adequadamente a imunidade ativa, que inicia seu desenvolvimento nas primeiras semanas de vida e atinge grau adequado de proteção aproximadamente aos 35 dias de idade (Brown et al., 1961). Além da imunidade adquirida pelas imunoglobulinas absorvidas via colostro, a imunidade inata, composta por células de defesa inespecíficas, ainda está em desenvolvimento nas primeiras semanas de vida dos suínos (Miller e Stokes, 1993).

À idade de 21 dias, quando normalmente tem sido realizado o desmame nas suinoculturas tecnificadas no Brasil, os leitões são fisiologicamente e imunologicamente imaturos, contudo, através do leite, recebem componentes biologicamente ativos (enzimas,

hormônios e fatores de crescimento), responsáveis por estimular o desenvolvimento do trato gastrointestinal (Xu et al., 2000). O desmame abrupto é desvantajoso do ponto de vista fisiológico, já que os animais passam a receber nutrientes oriundos de ingredientes de origem vegetal, principalmente, os quais são menos digestíveis e contêm antígenos que provocam reações de hipersensibilidade transitória no intestino (Ludke et al., 1998). Nesta idade de desmame, o leite da porca apresenta baixa quantidade de imunoglobulinas; além disto, o estresse imposto aos leitões provoca imunossupressão devido a maior secreção de cortisol e catecolaminas, hormônios que induzem secreção de citocinas pró-inflamatórias e causam mobilização energética e proteica e, por consequência, menor disponibilidade de nutrientes para crescimento e produção de proteínas responsáveis pela proteção inata e adquirida (Tizard, 2014).

O desmame, portanto, se caracteriza como manejo crítico na produção suína, pois os leitões são expostos a vários agentes estressores, de ordens social (separação abrupta da porca e leitegada, mistura à novos lotes), ambiental (troca de galpão) e nutricional (troca de leite por ração sólida), que causam mudanças bruscas no comportamento e fisiologia dos animais. Nos primeiros dias pós-desmame observa-se queda no consumo de ração que associado à imaturidade fisiológica dos animais causam mudanças no *turnover* intestinal, com diminuição das taxas de mitose e aumento nas taxas de apoptose das células epiteliais. Como consequência, ocorre atrofia dos vilos e aprofundamento das criptas, devido à menor migração de células das criptas para os vilos (Pluske et al., 1997). Com menor número de enterócitos funcionais, há redução brusca da área digestiva e absorptiva intestinal, diminuindo a digestibilidade dos nutrientes dietéticos e, conseqüentemente, ocasiona queda nos índices de desempenho.

Durante o aleitamento, o elevado teor de lactose presente no leite garante a proliferação de bactérias ácido lácticas, principalmente *Lactobacillus* spp. (Tannock, 1992), que produzem ácido láctico suficiente para diminuir o pH do estômago, não havendo necessidade de secreção de grandes quantidades de ácido clorídrico (HCl). Com o desmame, a disponibilidade de substrato às bactérias lácticas é reduzida e, conseqüentemente, a produção de ácido láctico diminui, contudo, o leitão recém-desmamado possui baixa capacidade de produção de ácido clorídrico (Manners, 1976; Efrid et al., 1982), tendo dificuldade em manter o adequado pH estomacal para a ativação de pepsinas, que é ativada a partir de seu zimogênio (pepisonogênio) em pH próximo à 3,0 (Prohászka e Baron, 1980). Além disso, muitos dos ingredientes das dietas pré-iniciais possuem elevada capacidade tamponante (principalmente fontes de proteínas e de minerais), o que torna o trato gastrointestinal mais propício à

multiplicação de patógenos. Segundo Delforge (1987) e Bartels e Penz Jr (1996), quando a capacidade tamponante da dieta for maior que 750 meq/kg a proliferação de *Escherichia coli* é favorecida.

Com menor atividade proteolítica estomacal, maior quantidade de proteínas da dieta não é digerida, tornando-se substrato para bactérias proteolíticas no intestino dos leitões. Estas bactérias produzem metabólitos tóxicos como aminas biogênicas e compostos que agridem o epitélio intestinal e se caracterizam como agentes etiológicos de diarreias pós-desmame. Muitas destas bactérias são patogênicas oportunistas, como as *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., que secretam enterotoxinas causando diarreia e outros distúrbios fisiológicos (Chamone et al., 2010). Segundo Jensen (1998), a microbiota intestinal de leitões pós desmame leva de duas a três semanas para se recuperar, sendo que, especialmente na primeira semana pós-desmame, a microbiota é instável.

Com relação à produção enzimática, esta é influenciada pela idade do animal, porém, acima de tudo, é substrato dependente. As enzimas responsáveis em digerir os dissacarídeos da dieta ou oriundos da ação da amilase e isomaltase são: lactase, maltase e sacarase, que são encontradas na membrana apical de enterócitos (Cunningham, 2004). Durante o aleitamento, a quantidade elevada do substrato lactose induz a alta secreção de lactase. A sacarase e a maltase têm atividades baixas após o nascimento e aumentam com o decorrer do tempo, atingindo níveis satisfatórios aproximadamente às quatro semanas de idade dos leitões, sendo o aumento na produção dependente da inclusão de substratos na dieta, como os carboidratos complexos presentes em ingredientes de origem vegetal (Puppa, 2008).

A secreção de enzimas pancreáticas está diretamente ligada à produção hormonal estimulada pela ingestão proteica e energética (principalmente glucagon) (Kelly et al., 1991), contudo, a ativação dos zimogênios pancreáticos secretados depende do potencial tamponante da secreção pancreática e do pH do quimo intestinal. Sendo assim, os fatores ligados ao desenvolvimento da maturidade fisiológica de leitões estão relacionados à muitos fatores, como a idade de desmame, presença de antígenos alimentares, proliferação de patógenos, digestibilidade dos nutrientes das dietas, proliferação de enterócitos e migração cripta-vilo, entre outros (Pluske et al, 1997).

1.2 Sistema imune dos suínos

O sistema imune constitui as defesas corporais conjuntas, sendo complexas interações de reações celulares e bioquímicas. Estas interações se organizam em vias distintas, definidas como imunidade inata (ou inespecífica) e adaptativa (ou adquirida). A entrada de um

microrganismo estranho no organismo animal desencadeia mudanças na expressão de inúmeras moléculas, a fim de assegurar a destruição do invasor e garantir a saúde e sobrevivência do indivíduo (Abbas et al., 2015). Como primeira defesa contra microrganismos invasores, tem-se as barreiras físicas, como a pele e processos de “autolimpeza”, por exemplo, dos tratos respiratório, gastrointestinal e urinário, como tosse, espirro, fluxo gastrointestinal, fluxo de muco, vômito, diarreia, fluxo de urina, baixo pH do sistema urinário, ente outros (Wood, 2006).

A presença de uma grande população bacteriana comensal na pele e trato gastrointestinal elimina muitos invasores potenciais, por competição com a microbiota patogênica e produção de metabólitos tóxicos e ácidos orgânicos, que reduzem o pH do meio e tornam o ambiente desfavorável à proliferação bacteriana patogênica (Colditz, 2002). O microrganismo que consiga ultrapassar estas primeiras barreiras físicas à invasão será confrontado pelas vias de defesa do sistema imune (Figura 1). A seguir serão descritas as vias inatas e adaptativas do sistema imune.

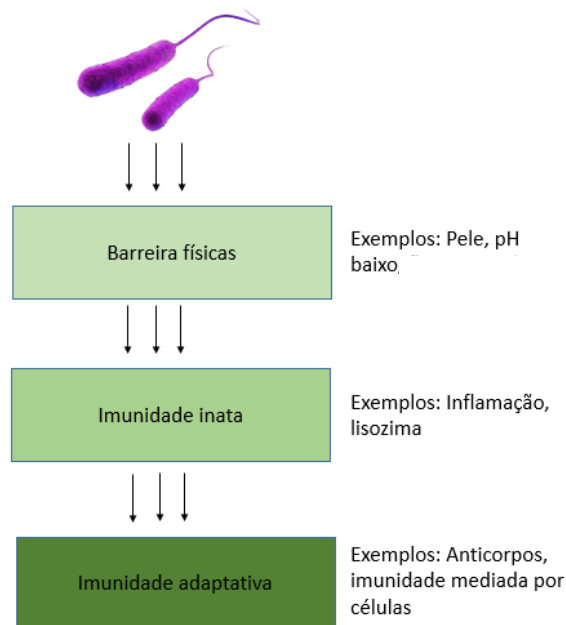


Figura 1. Três principais barreiras do organismo animal contra invasões microbianas (adaptado de Tizard, 2014).

1.2.1 Sistema imune inato

A imunidade inata é composta por uma rede de subsistemas conectados, que não apresenta memória, sendo inespecífica aos agentes microbianos. A exemplo da imunidade inata tem-se as barreiras físicas, células e proteínas específicas. Dentre as principais células

envolvidas estão os neutrófilos, os monócitos/macrófagos, as células dendríticas (DC) e as células *Natural Killer* (NK) e dentre as proteínas podemos citar as proteínas do sistema complemento, as proteínas de fase aguda e as citocinas (Levinson, 2016).

As células NK representam 15% dos leucócitos sanguíneos dos suínos, e possuem função de destruir outras células, como células cancerosas, e ainda possuem importante função de combate à infecções causadas por vírus, bactérias e protozoários (Wood, 2006). Quando um microrganismo atravessa as barreiras físicas, células especializadas e mecanismos bioquímicos são ativados, para reconhecimento e diferenciação destes potenciais patógenos das próprias células dos animais. Uma maneira do organismo conter a infecção é por meio de isolamento, dado pela inflamação, impedindo que a infecção se alastre para outras áreas e tecidos não infectados (Tizard, 2008). A inflamação aguda se desenvolve rapidamente após dano tecidual, sendo o mais importante processo dos subsistemas inatos, desencadeando a migração de leucócitos e proteínas protetoras da corrente sanguínea para o local de infecção.

Alguns sinais desencadeiam mecanismos da imunidade inata, como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que se caracterizam como moléculas de superfície de microrganismos (exemplos: ácidos nucleicos e lipopolissacarídeos) e padrões moleculares associados a lesões ou alarminas (DAMPs), que são moléculas liberadas por tecidos lesionados ou moléculas oriundas de células lisadas. Os PAMPs e DAMPs se ligam à receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Figura 2) localizados nas superfícies ou interior das células “sentinelas” (principalmente monócitos/macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células epiteliais) (Tizard, 2014).

Os receptores celulares do tipo TOLL (TLRs) constituem a mais importante família de PRRs. São receptores glicoproteicos que podem estar localizados na superfície ou interior de células sentinelas. Quando um PAMP se liga ao seu TLR, a célula recebe sinais que induzem a produção de moléculas pró-inflamatórias - citocinas, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6) e interferon- β (IFN- β) (Kawai e Akira, 2006).

As citocinas pró-inflamatórias (TNFs, IL-1, quimiocinas) possuem função de mediar a comunicação entre os leucócitos e têm efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos, possibilitando a comunicação do sistema imunológico com outros sistemas fisiológicos, permitindo o restabelecimento da homeostase frente à infecções (Adachi et al., 1994). A secreção destas moléculas por leucócitos e células endoteliais, principalmente, geram respostas sistêmicas que promovem reações de febre, neutrofilia, letargia e catabolismo proteico, com mobilização de aminoácidos para o aumento da síntese de proteínas envolvidas no sistema de defesa, como anticorpos e proteínas de fase aguda (Tizard, 2008).

Diferentes TLRs desencadeiam a produção de diferentes misturas de citocinas, e diferentes PAMPs desencadeiam respostas distintas. Além de estimular a inflamação, os TLRs estimulam células imunes relacionadas às vias da imunidade adaptativa (Tizard, 2014).

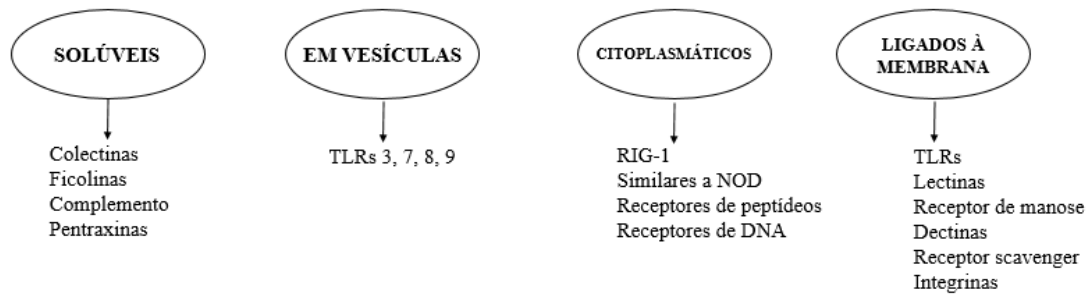


Figura 2. Exemplos de receptores de reconhecimento padrão e suas localizações (adaptado de Tizard, 2014).

Quando ocorre a ligação PAMPs–PRRs, as vias de sinalização das células sentinelas ativam os genes que levam à síntese e secreção de três importantes citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1. O TNF- α é produzido no início da inflamação, sendo que a seguir ocorrem as ondas de IL-1. Além das citocinas, as células sentinelas estimuladas secretam proteínas quimiotáticas, as quimiocinas, que atraem leucócitos aos sítios de invasão microbiana, bem como secretam lipídeos inflamatórios, como as prostaglandinas e leucotrienos (Murphy et al., 2010). Caso os PAMPs sejam oriundos de DNA ou RNA viral, as células sentinelas serão induzidas a secretarem duas citocinas específicas: IFN- α e IFN- β (Volman et al., 2008).

A inflamação aguda provoca, no local da infecção, calor, rubor, dor, aumento de volume e até perda de função tecidual. Imediatamente após a lesão, moléculas vasoativas (aminas: histamina; peptídeos: C3 e C5, cininas, neuropeptídeos; lipídeos vasoativos: leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas) promovem redução transitória do fluxo sanguíneo de capilares adjacentes ao tecido lesionado (Tizard, 2014). Posteriormente, ocorre a expressão de selectinas pelas células endoteliais, promovendo adesão com leucócitos, que reduzem a velocidade nos capilares, induzindo as células endoteliais a secretarem fator ativador plaquetário (FAP). Os leucócitos em rolamento pelas células endoteliais iniciam então a secreção de integrinas, e assim, ocorre uma cascata de eventos que induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e lipídeos inflamatórios, atraindo mais leucócitos ao local e aumentando a permeabilidade vascular, o que permite a passagem dos leucócitos

entre as células dos capilares para o tecido lesionado, processo chamado de diapedese (Osborn, 1990).

Os neutrófilos são de ação primária em tecido lesionado, uma vez que são as células mais móveis dos leucócitos sanguíneos (Rosales, 2018). Todos os leucócitos são atraídos por moléculas quimiotáticas por diferença de gradiente de concentração destas moléculas, ou seja, são atraídos para onde há maior concentração das mesmas. Dentre as moléculas quimiotáticas, as mais importantes são o peptídeo C5a do sistema complemento e outras quimiocinas, as quais são constituídas por aproximadamente 50 citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (8 a 10kDa) (Tizard, 2014).

Quando uma célula fagocítica (neutrófilos e macrófagos) chega ao local primário da infecção, ocorre eliminação do microrganismo estranho após fagocitose (interiorização e destruição). Primeiramente ocorre reconhecimento do organismo estranho, opsonizado ou não, por meio de interação com receptores específicos (receptor Fc (FcR) – microrganismos opsonizados por anticorpos; receptor de complemento (CR) – microrganismos opsonizados por peptídeos do sistema complemento; e ligação com PRRs específicos, como receptores de manose) e após internalização, o microrganismo é envolto por um fagossomo (vacúolo fagocitário) (Abbas et al., 2015).

A destruição de microrganismos fagocitados ocorre por meios oxidativos (explosão respiratória) ou não-oxidativos (liberação de enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos nos fagossomos citoplasmáticos). Na explosão respiratória, segundos após a ligação com o microrganismo, os fagócitos aumentam o consumo de oxigênio em quase 100 vezes, resultando na ativação da enzima de membrana NADPH oxidase, convertendo NADPH em NADP⁺, liberando elétrons e formando peróxido de hidrogênio que, por sua vez, é convertido a compostos bactericidas por ação da enzima mieloperoxidase, principalmente o OCl⁻ que ataca rapidamente moléculas biológicas por oxidação de suas proteínas, além de aumentar a atividade de enzimas lisossomais, as quais destroem paredes celulares bacterianas (Volman et al., 2008).

Fagócitos ativados por citocinas pró-inflamatórias expressam a enzima sintase de óxido nítrico (NO), que oxida NADPH, convertendo L-arginina para produzir grandes quantidades de NO e citrulina. O NO pode reagir com o ânion superóxido para produzir derivados tóxicos, tais como o peroxinitrito e o radical dióxido de nitrogênio, bem como se ligar a enzimas específicas (ribonucleotídeo redutase), impedindo a síntese de DNA e a respiração celular (Volman et al., 2008), resultando na destruição efetiva de bactérias, fungos, alguns helmintos, protozoários e células tumorais.

Os macrófagos são fagócitos menos móveis que neutrófilos, contudo, possuem meia vida maior, e assim, maior efetividade, além disso, diferentemente dos neutrófilos, podem repetir e manter a fagocitose e secretam diversas proteínas que exercem papel-chave na regulação da imunidade, principalmente citocinas: IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- α , além de enzimas lisossomais e componentes do complemento (Abbas et al., 2015).

O TNF- α , produzido no início da inflamação, é secretado por células sentinelas, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, após estímulo de seus receptores específicos TLRs, sendo que a maioria das células corporais possuem receptores para esta citocina (TNFR1), enquanto as células do sistema imune possuem um receptor específico (TNFR2) (Murphy et al., 2010). O TNF- α é um potente mediador da inflamação, mediando e prolongando a mesma em conjunto com a IL-1 β , e desencadeia a liberação de quimiocinas de células próximas, promove adesão, migração, atração e ativação de leucócitos, assim como liberação de proteínas de fase aguda por hepatócitos (Oliveira, 2011).

Após a secreção de TNF- α , ocorrem ondas de secreção de IL-1, que é produzida principalmente por macrófagos ativados, sendo que a IL-1 β é produzida em maior quantidade em comparação com a IL-1 α . Estas citocinas, uma vez na circulação, causam letargia, mal-estar, perda de apetite e agem nas células musculares mobilizando aminoácidos para a formação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, assim como imunoglobulinas por linfócitos B (Levinson, 2016). A IL-1 estimula a produção de proteínas de fase aguda e ativa linfócitos, principalmente T auxiliares-2 (Th-2), que produzem outras citocinas e estimulam linfócitos B a produzirem anticorpos (Tizard, 2014).

Sob a influência do TNF- α e IL-1 as células hepáticas aumentam a síntese e secreção de proteínas de fase aguda (PFA), com picos entre 24 e 48h. Dentre as PFA, citam-se os componentes do sistema complemento, PRRs solúveis, fatores de coagulação, inibidores de proteases e proteínas ligantes de ferro (Colditz, 2002; Wood, 2006). As PFA mais abundantes em suínos são principalmente a proteína C-reativa (PC) e a haptoglobina. A PC se liga à membrana celular de muitas células, inclusive de linfócitos, ativando-os, mas também se conjuga a neutrófilos e promove a fagocitose e remoção de células e microrganismos danificados, assim como inibe a produção de superóxido e degranulações neutrofílicas (Tizard, 2014). A haptoglobina possui função de ligar-se à hemoglobina livre, liberada pela destruição intravascular das hemácias, conservando o ferro corpóreo e prevenindo sua utilização na multiplicação bacteriana (Gutteridge, 1987).

Nos suínos, segundo Kushner (1990), as proteínas de fase aguda incluem ainda as glicoproteínas α 1-ácidas, ceruloplasminas e α 2-globulinas séricas. Algumas proteínas

diminuem seus níveis durante a inflamação aguda, sendo denominadas de proteínas de fase aguda negativa, que em suínos, incluem a albumina, α -lipoproteína, fetuína e a transferrina.

1.2.2 Sistema imune adaptativo

Os microrganismos invasores, especialmente os de baixa virulência, são rapidamente eliminados pela inflamação. Contudo, a inflamação exacerbada e contínua é danosa e desconfortável, e nem sempre capaz de conter os invasores. Assim sendo, o organismo animal, para ser efetivamente protegido, deve possuir sistemas de defesas que detectem e eliminem os invasores microbianos de forma eficaz, preferencialmente sem produzir dano tecidual e desconforto. Tal tarefa é inerente ao sistema imune adaptativo, que, para ser desencadeado, deve capturar o microrganismo estranho e processá-lo em fragmentos menores, que posteriormente serão apresentados às células que podem reconhecê-los, as chamadas células processadoras de antígenos (Levinson, 2016).

As principais células envolvidas na apresentação de antígenos exógenos são as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, sendo as células dendríticas as mais eficientes em processar e apresentar antígenos e somente elas podem estimular efetivamente linfócitos T *naïve* (nunca antes estimulados). As células dendríticas são atraídas ao local de infecção por moléculas PAMPs e DAMPs, e ativadas pelos mesmos estímulos que desencadeiam a inflamação (Tizard, 2014).

As células dendríticas e os macrófagos são células sentinelas e processadoras de antígeno, como resultado, o processamento antigênico pode ser iniciado ao mesmo tempo em que o invasor está sendo eliminado pelas defesas inatas. Após fagocitados, os microrganismos invasores serão processados intracelularmente e fragmentados em peptídeos menores, que serão acoplados aos receptores especializados de apresentação de antígeno, denominados moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), sendo posteriormente transportados até a superfície da célula, de modo que o desencadeamento da imunidade adaptativa se dá quando estes peptídeos ligados ao MHC são reconhecidos por receptores específicos de linfócitos (Tizard, 2008).

Os linfócitos, portanto, são células capazes de reconhecer e responder a antígenos estranhos, sendo diferenciados pelas moléculas de superfície celular, que são classificadas pelo sistema de grupamento de diferenciação (CD) em duas populações, os linfócitos T e B, responsáveis pela imunidade celular e humoral, respectivamente (Wood, 2006).

Os linfócitos são originários de precursores na medula óssea e maturados principalmente no interior de órgãos linfoides primários, os quais em suínos citam-se o timo e

placas de Peyer. Posteriormente, migram e vão residir em órgãos linfóides secundários, onde encontram e respondem à antígenos estranhos. Em suínos, os órgãos linfóides secundários são o próprio timo, tonsilas, baço, linfonodos periféricos e de mucosa e tecido linfóide associado à mucosa (MALT), como as placas de Peyer. Em suínos a estrutura dos linfonodos é invertida, ou seja, a região cortical é interna e a medular, externa (Rothkötter, 2009).

Quando maduros e ativados, os linfócitos podem se diferenciar em linfócitos T CD8 citotóxicos, capazes de destruir células infectadas, ou linfócitos CD4 auxiliares, capazes de ativar outras células (Fort, 2010). As principais subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th) são: Th1, que são estimulados por IL-12 e em resposta secretam IL-2 e IFN- γ e, de forma geral, promovem as respostas imunológicas mediadas por células, e Th2 que secretam IL-4, IL-13 e IL-10 e, de forma geral, promovem resposta imunológicas mediadas por anticorpos (Levinson, 2016).

Linfócitos T expressam receptores de antígenos (TCRs) compostos por duas cadeias peptídicas pareadas, α e β/γ e δ , capazes de se ligarem à peptídeos antigênicos acoplados à MHC de células apresentadoras de antígenos, sendo que há duas classes de moléculas MHC: I e II. As moléculas de MHC classe I são produzidas por todas as células nucleadas, ligando-se à antígenos endógenos (antígenos intracelulares - virais) e possuem função de apresentar antígenos endógenos aos linfócitos T CD8+, enquanto as moléculas do MHC classe II são restritas às células processadoras de antígeno especializadas (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) e se ligam à antígenos exógenos (antígenos extracelulares), cuja função é apresentar antígenos exógenos para os linfócitos T CD4+ (Thacker, 2004; Guedes e França, 2007). Os linfócitos também possuem receptores para citocinas, imunoglobulinas e peptídeos do sistema complemento (Abbas et al., 2015).

Os macrófagos também atuam como células apresentadoras de antígeno, porém, como também os fagocitam, são muito menos eficientes nesta função, em comparação às células dendríticas. Os linfócitos B atuam como células apresentadoras de antígenos, e são especialmente eficazes durante a resposta imune secundária, podendo expressar múltiplos receptores (BCR). Os linfócitos B podem reconhecer a maioria dos antígenos sem processamento prévio, porém, resposta efetiva ideal por este tipo celular normalmente requer a estimulação por linfócitos T auxiliares, assim como coestimulação por citocinas (Murphy et al., 2010).

Os linfócitos B respondedores podem se tornar células de memória e plasmócitos secretores de imunoglobulinas, que são os progenitores dos linfócitos B diferenciados para secretarem grandes quantidades de imunoglobulinas, sendo que a diferenciação dos linfócitos

B em plasmócitos ocorre nos centros germinativos dos linfonodos e outros órgãos linfoides secundários (Tizard, 2014). Os anticorpos são subdivididos em classes: IgG, a classe predominante no soro (85%) constituída por cinco subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4); IgM, correspondente à 12% das imunoglobulinas séricas, produzida somente após primeiro contato com um novo antígeno; IgA, correspondente à 3% das imunoglobulinas séricas, constituída por uma subclasse dimérica (IgAa e IgAb) e encontrada em secreções, como no muco, saliva, suor, leite e colostro; IgE, presente em baixa concentração no soro, envolvida em processos alérgicos e a IgD, ausente em suínos (Varley, 1995; Wood, 2006; Barcellos et al., 2007).

1.3 Aditivos utilizados na suinocultura

Com relação à legislação sobre os aditivos, há referências internacionais, dentre as quais destaca-se o Codex Alimentarius, que se constitui como um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), objetivando o estabelecimento de normas internacionais na área de alimentos. Os países da Organização Mundial do Comércio (OMC) são encorajados a harmonizar suas legislações nacionais com as internacionais (ANVISA, 2016).

No Brasil, a legislação sobre o uso dos aditivos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa (IN) 13/04 (alterada pela Instrução Normativa nº 44/15) e pelas regras dispostas no Decreto nº 6.296/07 e demais legislações relacionadas (MAPA, 2018). A IN 13/04 define como aditivo para produtos destinados à alimentação animal toda “substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais”. Os aditivos devem ser incluídos em quantidades estritamente necessárias para a obtenção do efeito desejado e de acordo com a IN 13/04, podem ser classificados, de acordo com suas funções e propriedades, nas seguintes categorias:

a) **Tecnológicos:** substância adicionada ao produto destinado à alimentação animal com fins tecnológicos. Incluem-se os aglomerantes, adsorventes, antioxidantes, conservantes, espessantes, antiumectantes, entre outros;

b) **Sensoriais:** substância adicionada ao produto para melhorar ou modificar as propriedades organolépticas ou as características visuais dos produtos. Incluem-se os corantes e pigmentantes, aromatizantes e palatabilizantes;

c) **Nutricionais:** substância utilizada para manter ou melhorar as propriedades nutricionais do produto. Incluem-se as vitaminas, aminoácidos, oligoelementos e uréia;

d) **Zootécnicos:** substância utilizada para influir positivamente na melhoria do desempenho dos animais. Incluem-se os prebióticos e probióticos, enzimas, simbióticos, nutracêuticos, ácidos orgânicos e melhoradores de desempenho;

e) **Anticoccidianos:** substância destinada a eliminar ou inibir protozoários.

O MAPA disponibiliza listas de aditivos que podem ser utilizados na alimentação animal e os que tiveram seu uso proibido. Dentre as substâncias proibidas, incluem-se vários antimicrobianos melhoradores de desempenho, sendo a colistina, molécula anteriormente muito utilizada na suinocultura, a última proibida até então (22/11/2016) (MAPA, 2017).

As condições comerciais modernas de produção de suínos, destacando-se o manejo de desmame, impõem várias condições de estresse aos animais, tendo como consequências alterações marcantes na fisiologia, microbiologia e imunologia intestinal e sistêmica. Estas alterações geram prejuízos econômicos, já que prejudicam o desenvolvimento dos animais, causando morbidade e/ou mortalidade (Pluske, 2013).

Para reduzir os prejuízos econômicos da queda de desempenho no período pós-desmame, compostos antimicrobianos farmacológicos e minerais [exemplos: óxido de zinco (ZnO) e sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$)], têm sido incluídos em larga escala nas dietas pós-desmame de suínos (Verstegen e Williams, 2002). Contudo, tem sido questionado o uso exacerbado destes compostos pelo fato de poderem levar ao surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos existentes, resultar na presença de resíduos em produtos cárneos e determinar reações de hipersensibilidade em humanos (Palermo Neto, 2012), bem como causar poluição ambiental, devido ao acúmulo de metais no solo e lençol freático (Lusk et al., 2006). Tendo em vista esta preocupação, a União Europeia implementou proibição total no uso de antimicrobianos em doses subterapêuticas para animais a partir de janeiro de 2006, e seguindo o exemplo europeu, vários países e regiões produtoras têm sofrido pressão pela diminuição ou total proibição no uso destes compostos em dietas de animais.

Estudos mais recentes também têm mostrado que há correlação positiva entre o uso de doses farmacológicas de minerais como Zn e Cu e a propagação de genes de resistência

bacteriana, especialmente em estirpes virulentas para animais e humanos (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*), enfatizando o problema de uso destes minerais em conjunto com antimicrobianos em dietas animais, em função da possibilidade de contaminação ambiental com bactérias patogênicas super-resistentes (Cavaco et al., 2011; Hölzel et al., 2012; Ji et al., 2012; Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2018).

Sendo assim, a busca por novas estratégias de produção, visando melhorias na saúde e desenvolvimento animal, com diminuição no uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho, é essencial para a sustentabilidade da suinocultura (Pluske, 2013). Dentre as novas estratégias, destacam-se o uso de compostos bioativos naturais, como os prebióticos, probióticos, simbióticos, ácidos orgânicos e fitogênicos (Miguel et al., 2004).

1.3.1 Antimicrobianos melhoradores de desempenho

Os antimicrobianos usados no tratamento de doenças infecciosas podem ser categorizados em compostos obtidos a partir de microrganismos - os antibióticos - e os obtidos de forma sintética, apresentando assim componentes químicos sintéticos e semi-sintéticos – os quimioterápicos (Mota et al., 2010). Os antimicrobianos podem possuir atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral e antitumoral. Os resultados benéficos do uso destes compostos no tratamento de doenças são provenientes da morte microbiana (efeito microbiocida) ou inibição de crescimento microbiano (efeito microbiostático). Os mecanismos de ação principais dos antimicrobianos são: inibição da síntese proteica; inibição da síntese de ácidos nucleicos; alteração de vias metabólicas; alteração da permeabilidade da membrana externa, e inibição da síntese da parede celular (Salabi et al., 2013).

Alguns antimicrobianos possuem largo espectro de ação, tendo atividade microbiocida ou microbiostática contra diversos microrganismos, e outros possuem curto espectro de ação, sendo mais específicos para determinados grupos bacterianos. Os antimicrobianos, de acordo com seus modos de ação, classificam-se como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, espectrograminas, macrolídeos, lincosaminas, nitroimidazólicos, tetraciclinas, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas e oxazolidinonas (ANVISA, 2016).

Segundo Barcellos et al. (2009), existem quatro formas de medicação com o uso de antimicrobianos: melhoradora de desempenho, metafilática, profilática e terapêutica. Na função de “melhorador de desempenho”, um antimicrobiano é utilizado em doses baixas de princípio ativo antibacteriano, sendo que o principal modo de ação seria reduzindo a incidência de doenças subclínicas. A medicação “metafilática” se define como uso de

antimicrobianos para tratamento de infecções em animais após os primeiros sinais clínicos da doença, tendo a vantagem dos animais entrarem em contato com o patógeno, estimulando a resposta imune adaptativa. O uso de antimicrobianos de modo “profilático” ocorre quando há uma probabilidade alta de certa doença se manifestar em indivíduos de determinada faixa etária, aplicando-se a medicação em doses terapêuticas por um período curto de tempo, tomando-se como exemplo os “pulsos” de antimicrobianos adicionados às dietas de leitões em fase crítica de pós-desmame. A medicação “terapêutica” ocorre quando é necessário tratar um indivíduo já acometido com a(s) infecção(ões) (Barcellos et al., 2009).

O sucesso do uso de antimicrobianos na medicina veterinária se deu na década de 1940, e os resultados benéficos do seu uso em baixas dosagens como melhoradores de desempenho foram se tornando evidentes, de forma que em 1951 o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso de antimicrobianos na alimentação animal sem necessidade de prescrição veterinária (Gonzales et al., 2012). Dentre os benefícios observados com a utilização de compostos antimicrobianos como melhoradores de desempenho na suinocultura, citam-se: aumento do ganho diário de peso, melhora na conversão alimentar, redução da mortalidade, da ocorrência de diarreias e da ocorrência de infecções clínicas e subclínicas (Cromwell, 2002).

Principalmente na fase pós-desmame, os leitões são acometidos por patógenos entéricos, que aumentam a incidência de diarreias, causando piora nos índices zootécnicos (Pluske et al., 2003). O uso de antimicrobianos em doses subclínicas nesta fase traz benefícios sobre a saúde e desempenho animal, devido à capacidade destes compostos em modular a microbiota intestinal através da redução da carga microbiana patogênica, evitando assim danos que patógenos poderiam causar, como modificações na estrutura do epitélio, competição por nutrientes, produção de metabólitos que deprimem as capacidades de digestão e absorção e, conseqüentemente, o desenvolvimento animal (Miguel et al., 2004).

Desde o banimento europeu ao uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho no ano de 2006, muitos países produtores têm restringido o uso destes compostos na alimentação animal, inclusive o Brasil. Segundo a ANVISA (2017), o uso racional de antimicrobianos é uma das metas definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o século XXI. Até a presente data, os antimicrobianos melhoradores de desempenho permitidos no Brasil são: avilamicina, bacitracina, enramicina, flavomicina, halquinol, lasalocida, lincomicina, monensina sódica, narasina, salinomicina, tiamulina, tilosina e virginiamicina (MAPA, 2017).

Contudo, recentemente, em Portaria Nº 171 (13/12/2018) da Secretaria de Defesa Agropecuária, ligada ao MAPA, publicada no Diário Oficial da União (19/12/2018), informa-se sobre a “*intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos*”. Em tal portaria declara-se que “*o uso dos antimicrobianos tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos será proibido*”. A partir da Portaria Nº15 (01/02/2019), abriu-se prazo de 45 dias para manifestações técnicas que possam refutar tal decisão de proibição. A Portaria considera os compromissos assumidos pelo governo brasileiro com a OMS e com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) com relação à preservação da efetividade de antibióticos, através de restrição completa de todas as classes de antimicrobianos importantes na medicina humana para promoção de crescimento de animais produtores de alimentos.

O halquinol (5,7-dicloro-8-quinolinol, 5-cloro-8-quinolinol e 7-cloro-8-quinolinol), do grupo dos antimicrobianos quinolonas, possui amplo espectro de ação contra bactérias (gram positivas e gram negativas), fungos e alguns protozoários, em suínos e em aves (Jukes e Swick, 1996). As quinolonas são inibidores da síntese de DNA por atingirem complexos da enzima topoisomerase, responsável por regular a estabilidade da molécula de DNA durante seu processo de replicação, de modo que determina interrupção da replicação e do crescimento celular (ação bacteriostática), com posterior indução de apoptose celular (Kohanski et al., 2010; Salabi et al., 2013).

A utilização de doses subterapêuticas de halquinol e de outros antimicrobianos nas dietas animais objetivam reduzir ou impedir a multiplicação exacerbada de microrganismos no TGI, evitando prejuízos à digestibilidade dos nutrientes da dieta e à conversão dos mesmos em proteína animal. Assim, o uso destas substâncias promovem melhorias na eficiência alimentar, diminuem a mortalidade, morbidade e previnem infecções (Cromwell et al. 2002; Sørensen et al., 2009; Cheng et al., 2014). O antimicrobiano halquinol, nas últimas décadas, vem se tornando alternativa frente à outros antimicrobianos utilizados na nutrição de suínos e aves, uma vez que possui ação não-microbiocida e baixa absorção intestinal (Heseltine e Campbell, 1960), tendo menores efeitos sistêmicos e chances de induzir resistências bacterianas (Cardoso, 2000). Contudo, faltam estudos epidemiológicos à campo e a longo prazo com o uso desta substância e de outros antimicrobianos, utilizando-se nutrição balanceada e de qualidade às diferentes categorias animais da granja, as quais adotem programas de manejo adequados e medidas de biossegurança, a fim de comparar a realidade vivida 60 anos atrás com a atual (Aarestrup et al., 2010).

Com relação aos efeitos deletérios do uso de antimicrobianos, um estudo realizado por Kalghatgi et al. (2013) demonstrou que em células epiteliais humanas alguns bactericidas de classes específicas, como as quinolonas, levam à aumento do estresse oxidativo mitocondrial, com produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, danos às membranas celulares e aos tecidos. As quinolonas possuem alto nível de atividade contra uma extensa gama de bactérias (Jukes e Swick, 1996), assim, também podem reduzir a microbiota intestinal benéfica, que possui importante função na manutenção da saúde intestinal e, indiretamente, na saúde geral do hospedeiro, tendo em vista que alterações na microbiota intestinal podem induzir imunossupressão indireta e maior demanda por produção e maturação de leucócitos (Kalghatgi et al., 2013).

A crescente preocupação com o uso de antimicrobianos na alimentação animal tem desafiado os cientistas a buscarem aditivos alternativos, que tragam não somente benefícios à saúde e desempenho dos animais, como também garantam segurança na produção e consumo de produtos cárneos. Estudos indicam que o uso de probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos e fitogênicos são capazes de trazer benefícios semelhantes ao uso dos antimicrobianos, representando assim alternativas possíveis de serem utilizadas a campo (Menten, 2002).

1.3.2 Prebióticos

Prebióticos são compostos que podem ser intencionalmente adicionados à dieta ou estarem presentes naturalmente no alimento, não são digeridos ou absorvidos, porém são fermentados seletivamente por bactérias benéficas no trato gastrointestinal (TGI) dos animais, promovendo assim melhorias à saúde e desempenho. Entre os compostos prebióticos, citam-se alguns carboidratos (oligossacarídeos e polissacarídeos), alcoóis derivados de açúcares, peptídeos, proteínas e lipídeos (Gibson e Roberfroid, 1995), contudo, os oligossacarídeos não digestíveis (ONDs) vêm sendo preferencialmente estudados (Mosenthin e Bauer, 2000).

Dentre os ONDs com capacidade prebiótica mais estudados estão os frutoligossacarídeos (FOS), β -glucanos, galactoligossacarídeos (GOS) e os mananoligossacarídeos (MOS), que possuem um ou mais dos seguintes modos de ação: são fermentados por bactérias benéficas do TGI dos animais, modulando benéficamente a microbiota (Mathew et al., 1993; Gebbink et al., 1999; Macfarlane e Cummings, 1999; Strickling et al., 2000); impedem a fixação de bactérias patogênicas específicas (Baumler et al., 1997); adsorvem micotoxinas das dietas (Šrobárová et al., 2005; Yiannikouris et al., 2004a,b); estimulam o sistema imune local entérico e o sistema imune de forma sistêmica

(Herre et al. 2004; Gantner et al., 2003; Willment et al., 2003; Brown et al., 2002) e melhoram o desempenho e saúde dos animais (Bengmark, 1998; Xuan et al., 2001; Mappley et al., 2012; Guerra-Ordaz et al., 2013).

A capacidade de fermentação dos ONDs por bactérias benéficas no TGI do hospedeiro, com destaque para bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, resulta na produção de substâncias estimulatórias para o sistema imune, bem como de ácidos orgânicos, que reduzem o pH do meio e controlam indiretamente a proliferação de bactérias patogênicas (Silva e Nörnberg, 2003).

Alguns dos ONDs possuem afinidade por sítios de ligação específicos de células imunes não específicas, aumentando suas capacidades de reconhecer e eliminar patógenos, bem como de secretar citocinas pró e anti-inflamatórias e, conseqüentemente, de induzir de forma mais eficaz a síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) (Yasui e Ohwaki, 1991; Silva e Nörnberg, 2003; Kogan e Kocher, 2007).

Muitos estudos têm demonstrado benefícios do uso de prebióticos em dietas de leitões desmamados, tanto na forma isolada quanto combinada, porém, nem sempre resultados benéficos têm sido evidenciado devido, principalmente, as variações nas condições experimentais e imposição de desafios sanitários (Miguel et al., 2004).

1.3.2.1 β -glucanos

Os β -glucanos são polissacarídeos com ligações β -glicosídicas, constituintes da parede celular de leveduras, fungos e cereais, sendo que, dependendo da sua origem, se diferenciam por diferentes tipos de ligação entre as unidades glicosídicas e por suas ramificações (Magnani, 2008). Como principal fonte de β -glucanos têm-se a parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo composto por unidades variadas de polímeros de glicose com ligações do tipo $\beta(1-3)$ e cadeias laterais com ligações tipo $\beta(1-6)$ (Magnani, 2008).

Estudos têm demonstrado que o uso de fontes ricas em β -glucanos, ou a própria molécula isolada, trazem benefícios à saúde e desempenho animal, devido aos seus efeitos imunomodulatórios, antitumorais, antimutagênicos, antiinflamatórios, entre outros (Robertsen, 1999; Kogan e Kocher, 2007; Magnani, 2008). Segundo Kumar et al. (2005), o β -glucano derivado da parede celular de leveduras, talvez pelas diferenças estruturais de suas cadeias, são capazes de promover maiores benefícios.

A molécula de β -glucano é considerada imunomoduladora, sendo capaz de modificar respostas biológicas, já que possui a capacidade de ligação com receptores de membrana específicos de células fagocíticas, tornado-as mais ativas e eficazes (Robertsen, 1999). Além

do efeito imunomodulador, como um OND, este polissacarídeo é fermentado seletivamente por bactérias benéficas no TGI do animal, controlando de forma indireta o desenvolvimento exacerbado de bactérias patogênicas e também indiretamente promovendo melhorias sobre a saúde do intestino (Pretus et al., 1991).

Os β -glucanos, uma vez em contato com as placas de Peyer intestinais, que se constitui em tecido linfoide associado à mucosa (*mucosa-associated lymphoid tissue* – MALT), mais especificamente tecido linfoide associado à mucosa do trato gastrointestinal (*gut-associated lymphoid tissue* – GALT), são internalizados pelas células M e fagocitados pelos macrófagos. Após a fagocitose das moléculas de β -glucanos, ocorre degradação lenta gerando partículas menores fragmentadas, que caem na corrente sanguínea e se ligam à receptores de membrana específicos de granulócitos, atingindo diferentes órgãos e tecidos do corpo (Vetvicka et al., 1997; Novak e Vetvicka, 2008).

Os receptores conhecidos com afinidade para moléculas de β -glucanos são os receptores tipo scavenger, lactosilceramida, CR3 e a dectina-1, sendo os dois últimos os principais. O CR3 é um receptor de membrana (encontrado em diversos tipos celulares, como macrófagos e neutrófilos) do peptídeo C3 do sistema complemento, o qual, quando ativado, se liga à superfície microbiana, marcando o patógeno para posterior destruição por leucócitos (Vetvicka et al., 1997; Vetvicka, 2011). Segundo Vetvicka (2011), quando um iC3b, que é o produto da clivagem proteolítica do peptídeo C3, se liga aos CR3 de fagócitos e células *Natural Killer*, há opsonização das moléculas de β -glucanos, com posterior estímulo à degranulação citotóxica, entretanto, isso requer o reconhecimento de polissacarídeos específicos pela proteína de ligação lectina, componente do receptor CR3, para diferenciação de microrganismos de células do hospedeiro. Os polissacarídeos solúveis dos β -glucanos de leveduras têm a capacidade de se ligar às lectinas do CR3 e desencadear estímulo à degranulação, sendo importante para maior capacidade de citotoxicidade de células tumorais (Vetvicka et al., 1997; Vetvicka, 2011).

A dectina-1 é um receptor de membrana encontrado em macrófagos, sendo importantes na detecção e fagocitose de fungos, podendo se associar à outros receptores, como TLR-2 (importante família de receptor de reconhecimento padrão - PRR), que se liga à um padrão molecular associado à patógeno (PAMP) de origem fúngica, transmitindo um sinal à célula para produção de moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas (Vetvicka, 2011). As células fagocíticas e células capilares estimuladas por PAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados à lesões) secretam citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 e TNF, sendo que estas citocinas, sobretudo TNF, estimulam processos intracelulares dos

próprios fagócitos, como a explosão respiratória, após fagocitose, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que promovem lise celular dos compostos fagocitados pela peroxidação de lipídeos de membranas (Tizard, 2014).

O receptor de superfície lactosilceramida é um glicoesfingolipídio, que interage com a molécula de β -glucano promovendo a explosão respiratória e sua função oxidativa de membrana, induz a produção da citocina fator nuclear kappa B (NF κ B) e a produção da MIP-2 (quimiocina) pelas células do epitélio alveolar (Wakshull et al., 1999; Hahn et al., 2003).

Estudos têm demonstrado a capacidade de β -glucanos, suplementados em dietas de suínos jovens e adultos, promover maior proteção dos tecidos epiteliais, e assim, maior proteção contra infecções virais e bacterianas que acometem os tratos respiratório, reprodutivo e gastrointestinal, assim como melhorar os índices de desempenho (Kogan e Kocher, 2007). Em estudo com leitões em fase de creche desafiados com LPS de *E. coli*, Wu et al. (2018) observaram que os animais que receberam β -glucano apresentaram maior ganho diário de peso durante as semanas 4 e 5 do experimento, resultando em maior peso final. Comparando os momentos antes e após o desafio, somente os animais do grupo controle tiveram aumento significativo da temperatura retal e da IL-6 sérica, demonstrando que o β -glucano foi capaz de promover maior efetividade imunológica com concomitante melhoria no desempenho dos animais.

Schoenherr et al. (1994) e Dritz et al. (1995) demonstraram resultados positivos no desempenho de leitões alimentados com dietas contendo β -glucano, e, neste sentido, Mendes et al. (2010) avaliando níveis crescentes de β -glucano (60, 120, 180 e 240 ppm) na dieta de leitões em fase de creche, verificaram efeito linear positivo para ganho diário de peso, com aumento de 3,2% na dose de 240ppm. Li et al. (2005) em estudo com leitões recém-desmamados desafiados com ovoalbumina e alimentados com dietas contendo 50ppm de β -glucano, observaram melhoria em parâmetros imunes dos leitões que receberam o prebiótico, com redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias, demonstrando assim maior efetividade imunológica, evitando possíveis danos teciduais com um prolongamento desnecessário da inflamação. Stuyven et al. (2010) constataram melhoria na imunidade humoral de leitões que receberam β -glucanos na dieta, pois promoveu aumento na concentração da IgM sérica.

Por outro lado, Hiss e Sauerwein (2003) e Ledur et al. (2012) não verificaram melhora no desempenho e nas variáveis imunológicas de suínos com a inclusão de β -glucanos nas dietas e Mao et al. (2005), incluindo 500 e 1000ppm de β -glucano extraído da erva *Astragalus membranaceus* também não obtiveram respostas significativas no desempenho de leitões. As

divergências nas respostas fisiológicas ao uso de β -glucanos podem estar relacionadas às diferentes propriedades físico-químicas dos β -glucanos que, por sua vez, determinam efeitos biológicos diversos, dependendo de sua estrutura, ramificações e peso molecular (Vetvicka et al., 2014).

1.3.2.2 Mananoligossacarídeos

Mananoligossacarídeo (MOS) é um oligossacarídeo obtido da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que representa de 25 a 50% da parede celular (Moran, 2004). A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é formada por glucanas (β -D-(1,3) e β -D-(1,6)-glucana), mananas (mananoproteínas, sendo a β -D-manana a porção de carboidrato) e quitina, em quantidade aproximada de 1% do peso (Kogan e Kocher, 2007).

O MOS é fermentando seletivamente no intestino grosso dos animais, promovendo modulação da microbiota intestinal, além disto, estudos também indicam ação deste prebiótico no estímulo ao sistema imune e adsorção de micotoxinas (Kogan e Kocher, 2007), modos de ação que resultam em melhorias no ambiente intestinal e integridade do epitélio, favorecendo o desempenho (Silva e Nörnberg, 2003).

Especificamente, o MOS também possui capacidade de adsorção de certas bactérias patogênicas gram-negativas com fímbrias tipo-1 específicas para manose, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, bloqueando sítios de ligação específicos das fímbrias destas bactérias, impedindo assim sua fixação e posterior produção de metabólitos tóxicos que danificam o epitélio intestinal. A fixação destas bactérias no epitélio intestinal se dá através da interação das fímbrias com as glicoproteínas da superfície de enterócitos, as quais são ricas em manose (receptores de lectina) (Firon et al., 1983).

Os modos de ação específicos do MOS na melhora da imunidade ainda não estão bem elucidados, contudo, estudos com várias espécies têm comprovado esse efeito (Savage et al., 1996; Newman e Newman, 2001; Kogan e Kocher, 2007). Segundo Ofek et al. (1995), o MOS interage com receptores específicos e manose de células fagocíticas, estimulando a fagocitose destas células sem que haja opsonização prévia, como ocorre com os β -glucanos. A ativação de leucócitos específicos pela ligação de manana com receptores de manose das células pode servir como estímulo para as fases iniciais da resposta imune (Miguel et al., 2004).

A suplementação de 1000ppm de MOS em dietas de leitões desmamados aumentou a imunidade específica contra o vírus da doença de Aujeszky (Notcha et al., 2009) e aumentou a atividade de linfócitos após exposição dos animais à imunógenos (Nochta et al., 2010). De

maneira semelhante, em estudo de White et al. (2002) houve aumento na concentração de IgG sérica em leitões alimentados com manana oriunda de levedura e Davis et al. (2002; 2004) demonstraram que o uso de MOS em dietas de leitões aumentou a porcentagem de linfócitos T maduros no TGI destes animais.

Em estudo que avaliou inclusão de 2000ppm de MOS em dietas de leitões desmamados, Valpotić et al. (2018) observaram aumento significativo na porcentagem de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e maior atividade fagocitária de neutrófilos no sangue periférico dos animais. De forma semelhante, a suplementação dietética com MOS foi capaz de aumentar a resistência à doenças em leitões, uma vez que promoveu maior apresentação antigênica, promovendo assim resposta imune adaptativa mais rápida e eficiente (Halas e Nocht, 2012).

Estudos de Kim et al. (2000) e Davis et al. (2002) comprovaram benefícios no desempenho de leitões, quando adicionaram MOS fosforilados nas dietas. Zhao et al. (2012) verificaram diminuição no escore de diarreia de leitões que consumiram dietas com MOS, porém, não observaram diferenças nos teores de IgG, glóbulos brancos e vermelhos e de linfócitos no soro dos leitões, comparados aos animais alimentados com dietas contendo ou não antibióticos. Resultados semelhantes para as variáveis de desempenho têm sido verificados em pesquisas comparando a inclusão de MOS e de antibióticos nas dietas de leitões, demonstrando que este oligossacarídeo foi capaz de substituir os antimicrobianos das dietas (Utiyama et al., 2006; Corassa et al., 2012).

1.3.2.3 Frutoligossacarídeos

Os frutoligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos que podem ser encontrados na natureza, ou serem obtidos de forma sintética (Marubashi et al., 2010). Consistem em polímeros de frutose compostos de 1-kestose, nistose e frutofuranosil nistose, em que as unidades de frutossil são ligadas na posição $\beta(2,1)$ da sacarose (Yun, 1996).

Comercialmente, os FOS podem ser categorizados em dois grupos em função do método de obtenção. Pode ser produzido por hidrólise enzimática de inulina, que ocorre naturalmente em diversas plantas, principalmente em chicória, alcachofra, beterraba, aspargo, alho, cebola, yacon, entre outras (Yamashita et al., 1984; Goto et al., 1995; Yun, 1996), consistindo de uma a sete unidades lineares de frutossil, podendo conter ou não uma unidade final de glicose, ou por transfrutossilacção enzimática de resíduos de sacarose, consistindo em cadeias lineares e ramificadas de frutossil (uma a cinco unidades) (Hidaka et al., 1986, Hartemink et al., 1997).

O FOS tem poder adoçante semelhante à sacarose e estudos têm demonstrado sua ação prebiótica para humanos e animais, pelo fato de ser capaz de modular benéficamente a microbiota intestinal. Este oligossacarídeo é fermentado seletivamente por bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* (efeito bifidogênico) e *Acidophilus* no TGI dos animais, que, por sua vez, produzem ácidos orgânicos, diminuindo o pH do intestino grosso e controlando a proliferação de bactérias patogênicas e putrefativas (*E. coli*, *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp.), que têm o meio próximo ao neutro como ideal para multiplicação (Wang e Gibson, 1993, Spiegel et al., 1994, Gibson e Roberfroid, 1995, Gibson et al., 1995; Hartemink et al., 1997). A modulação da microbiota pelo FOS melhora as condições de saúde intestinal, preservando o epitélio e mantendo as capacidades de digestão e absorção, propiciando melhor desempenho animal (Silva e Nörberg, 2003).

Budiño et al. (2010), avaliando níveis de inclusão de FOS (0,2; 0,4 e 0,6%) na dieta de leitões, estimou que o nível ótimo de adição para maximizar o ganho diário de peso dos animais nos primeiros 12 dias pós-desmame foi de 0,31%. Comparando a inclusão de parede celular de levedura (rica em β -glucanos e MOS), FOS, parede celular de levedura + FOS e um antimicrobiano melhorador de desempenho em dietas de leitões, Zhao et al. (2012) relataram que os prebióticos, juntos ou isolados, determinaram resposta semelhante ao antimicrobiano, quanto à melhora no ganho diário de peso dos animais no período de 0-14 dias pós-desmame.

Em estudo de Xu et al. (2002), foi comprovada a capacidade do FOS promover melhorias na integridade e saúde intestinal de suínos. Os autores avaliaram a inclusão de 2000, 4000 e 6000ppm de FOS em dietas de fêmeas suínas em crescimento (peso inicial médio de 20,8kg), verificando que doses de 4000 e 6000ppm promoveram melhora na eficiência alimentar e ganho diário de peso. Ainda, para estas mesmas doses, houve aumento nas concentrações de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, além de diminuição nas populações de *E. coli* e *Clostridium*; maior atividade de enzimas digestivas no intestino e maior relação altura de vilos:profundidade de criptas no jejuno dos animais.

Avaliando doses de FOS de 100, 500 e 1000ppm nas dietas de leitões desmamados, Lei et al. (2018) observaram aumento linear do ganho diário de peso e do consumo diário de ração, bem como melhora da digestibilidade da dieta e maior contagem de bactérias ácido lácticas fecais. Trabalhando com leitões em aleitamento, Schokker et al. (2018) demonstraram que a administração de FOS via oral por 12 dias (2-14 dias de idade) foi capaz de exercer efeito bifidogênico no intestino grosso, melhorar as características morfométricas e modular a expressão gênica do epitélio do jejuno. Bactérias do gênero *Bifidobacterium* são capazes de

digerir e utilizar frutanos devido à alta capacidade de produção de enzimas β -frutofuranosidase (Imamura et al., 1994).

Por outro lado, outros estudos não demonstraram efeitos deste oligossacarídeo sobre o desempenho de suínos (Farnworth et al., 1992; Howard et al., 1995; Mikkelsen et al., 2003), sendo necessário mais estudos que comprovem sua eficácia.

1.3.2.4 Galactoligossacarídeos

Os galactoligossacarídeos (GOS) são produzidos a partir da lactose por atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase e os oligossacarídeos resultantes desta reação são formados por estruturas com ligações β -1,4 e β -1,6 (Macfarlane et al., 2008). Também podem ser obtidos por meio da enzima α -galactosidase, a partir da galactose, resultando em estruturas com ligações do tipo α (Góes e Ribeiro, 2002)

Poucos estudos foram feitos até então avaliando a inclusão de galactoligossacarídeos na dieta de suínos, porém, com humanos e ratos, têm-se mostrado efeitos benéficos deste prebiótico, pela sua capacidade em modular a microbiota intestinal, reduzir infecções bacterianas, promover melhorias na absorção de minerais e reduzir alergias (Sangwan et al., 2015).

Bactérias benéficas do TGI de leitões apresentam alta capacidade de fermentação de moléculas de GOS, como demonstrado em estudo feito por Tzortzis et al. (2005) com leitões desmamados. Os autores avaliaram os efeitos da inclusão de GOS e da associação de GOS e inulina, observando aumento das colônias de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e que a dose de 4% de GOS aumentou a população de *Bifidobacterium* e a concentração de ácido acético, com consequente redução no pH do cólon.

Tsukahara et al. (2009) avaliaram o uso de GOS nas doses de 1,17 e 0,03%, em dietas de leitões desmamados, e demonstraram que a utilização deste prebiótico, quando comparada à uma dieta controle, foi capaz de diminuir a infiltração de eosinófilos no intestino delgado dos animais. A infiltração intestinal exacerbada deste leucócito indica reações alérgicas agudas, que podem reduzir o potencial de desenvolvimento dos animais. Além disto, houve aumento no ganho diário de peso do dia 3 ao dia 10 do estudo, e melhoria na conversão alimentar do dia 0 ao dia 10.

Estudos ainda sugerem que o consumo de substâncias prebióticas específicas por leitões, como o GOS, é capaz de alterar benéficamente a microbiota dos animais, com maior produção e absorção de ácidos graxos de cadeia curta (Smiricky-Tjardes et al., 2003; Fleming et al., 2017). Segundo estudo de Fleming et al. (2017), o consumo de GOS foi capaz de

aumentar a produção de serotonina pelo sistema nervoso e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) pela microbiota intestinal de leitões, aumentando a concentração destes ácidos no cólon, sangue e cérebro. A maior secreção destes compostos foi associada à menores indicadores de estresse pós-contenção, podendo-se inferir que estes benefícios podem tornar o animais bioquimicamente menos susceptíveis ao estresse, e assim, aos danos fisiológicos causados pelo mesmo.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão de combinações de prebióticos (MOS, β -glucano, FOS e GOS), em substituição à antimicrobiano melhorador de desempenho, em dietas de leitões em fase de creche, sobre o desempenho, incidência de diarreia, saúde intestinal (morfometria do intestino delgado, concentração de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo do cólon, microbiologia do conteúdo do ceco), perfil hematológico (hemograma completo) e imunológico (concentrações de imunoglobulinas, citocinas, proteínas de fase aguda e explosão respiratória).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, V. F.; EMBORG, H.; JACOBSEN, E.; WEGENER, H. C. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, 726-733, 2010.

ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2018. 544p.

ADACHI, Y.; OKAZAKI, M.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.17, p.1554– 1560, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Codex Alimentarius**. 2016. In: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/10d276cf-99d0-47c1-80a5-14de564aa6d3>. (Acessado em 01 jun. de 2018).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Plano de Ação de Vigilância Sanitária em Resistência os Antimicrobianos**. 2017. In: <http://www.ismp-brasil.org/site/wp-content/uploads/2018/01/Plano-de-a----o-nacional-em-AMR.pdf>. (Acessado em 01 jun. de 2018).

BARCELLOS, D.E.S.N.; BOROWSKI, S.M.; ALMEIDA, M.N. Programas de vacinação para diferentes sistemas de produção. In: XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES, 13., 2007, Toledo. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. p.54-67.

BARCELLOS, D.E.S.N.; MARQUES, B.M.I.P.P.; MORES, T.J.; COELHO, C.F.; BOROWSKI, S.M. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos na suinocultura. **Acta Scientia Veterinarie**, v.37, p.151-155, 2009.

BARTELS, H.A.; PENZ Jr, A.M. Nutrição de leitões nas fases pré e pós desmame. In: I Simpósio Internacional de Nutrição de Monogástricos, XII Semana de Zootecnia, 1., Rio de Janeiro, 1996. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. Fimbrial adhesions of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.412, p.149–158, 1997.

BENGMARK, S. Immunonutrition: role of biosurfactants fiber, and probiotic bacteria. **Nutrition**, v.14, p.585–594, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Instrução normativa N° 13**. 2004. In: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>. (Acessado em 01 jun. de 2018).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente**. 2017. In: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf>. (Acessado em 01 jun. de 2018).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Tabela de aditivos autorizados para uso em produtos destinados à alimentação animal- geral com exceção dos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas**. 2011. In: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/alimentacao-animal/aditivos>. (Acessado em 01 jun. de 2018).

BROWN, H.; SPEER, V.C.; QUINN, L.Y.; HAYS, V.M.; CATRON, D.V. Studies on colostrum-acquired immunity and active antibody production in baby pigs. **Journal of Animal Science**, v.20, p.323-328, 1961.

BROWN, G.D.; TAYLOR, P.R.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; WILLIAMS, D.L.; MARTINEZ-POMARES, L.; WONG, S.Y.; GORDON, S. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v.196, p.407–412, 2002.

BUDIÑO, F.E.L.; CASTRO JÚNIOR, F.G.; OTSUK, I.P. Adição de frutoligossacarídeo em dietas para leitões desmamados: desempenho, incidência de diarreia e metabolismo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.2187-2193, 2010.

CARDOSO, M.A.B. **A utilização da droga halquinol® como promotor de crescimento e coadjuvante no controle da coccidiose**. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

CAVACO, L.; AGERSØ, Y.; MORDHORST, H.; AARESTRUP, F. M. Adjustment of pH of enrichment media might improve selective isolation of MRSA from pig samples. In: 2nd ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary

and Public Health Implications. 2.; 2011, Washington. **Anais...** Washington, American Society for Microbiology, 2011. p.48-49.

CHAMONE, J. M. A.; MELO, M. T. P.; AROUCA, C. L. C.; BARBOSA, M. M.; SOUZA, F. A.; SANTOS, D. Fisiologia digestiva de leitões. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.7, p.1353- 1363, 2010.

CHENG, G.; HAO, H.; XIE, S; WANG, X.; DAI, M.; HUANG, L.; YUAN, Z. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p.1-15, 2014.

COLDITZ, I.G. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. **Livestock Production Science**, v.75, n.3, p.257–268, 2002.

CORASSA, A.; LOPES, D.C.; BELLAYER, C. Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos e probióticos para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Arquivo Zootecnia**, v. 61 n. 235, p. 467-476, 2012.

CROMWELL, G.L. Why and how antibiotics are used in swine production. **Animal Biotechnology**, v.13, p.7–27, 2002.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 579p.

DAVIS, M.E.; MAXWELL, C.V.; BROWN, D.C.; RODAS, B.Z.; JOHNSON, Z.B.; KEGLEY, E.B.; HELLWIG, D.H.; DVORAK, R.A. Effect of dietary mannan oligosaccharides and(or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2887-94, 2002.

DAVIS, M. E.; MAXWELL, C. V.; ERF, G. F.; BROWN, D. C.; WISTUBA, T. J. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1882-1891, 2004.

DELFORGE, J.L. New concepts in the use of acidulents in animal feeds. In: Virginiamycin Symposium, 1987, Sicília. **Anais...** Sicília, 1987. p.56.

DRITZ, S. S.; SHI, J.; KIELIAN T. L.; GOODBAND R. D.; NELSEN, J. L.; TOKACH M. D.; CHENGAPPA, M. M.; SMITH, J. E.; BLECHA, F. Influence of dietary β -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to streptococcus suis infection in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 73, p.3341–3350, 1995.

EFIRD, R.C.; ARMSTRONG, W.D.; HERMAN, D.L. The development of digestive capacity in young pigs: effects of age and weaning system. **Journal of Animal Science**, v.55, p.1380–1387, 1982.

FARNWORTH, E.R., MODLER, H.W., JONES, J.D., CAVE, N., YAMAZAKI, H., RAO, A.V. Feeding Jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v.72, p.977–980, 1992.

FLEMING, A.S.; MONAIKUL, S.; PATSAVAS, A.J.; WAWORUNTU, R.V.; BERG, B.M.; DILGER R.N. Dietary polydextrose and galactooligosaccharide increase exploratory behavior, improve recognition memory, and alter neurochemistry in the young pig. **Nutritional Neuroscience**, v.18, p.1-14, 2017.

FORT, M. Atualidades no Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2). **Revista Suínos & Cia**, v.35, p.26-39, 2010.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydratespecificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. **Carbohydrate Research**, v.120, p.235–249, 1983.

GANTNER, B.N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S.J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v.197, p.1107–1117, 2003.

GEBBINK, G.A.R.; SUTTON, A. L.; RICHERT, B. T.; PATTERSON, J. A.; KELLY, D. T.; VERSTEGEN, M.W.A.; BOSCH, M.; COBB, M.; KENDALL, D. C.; DECAMP, S.; BOWERS, K. Effects of addition of fructooligosaccharide (FOS) and sugar beet pulp to weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health. In: Swine Day Report, 5., 1999, Purdue. **Anais...** Purdue: Purdue University, 1999. p. 6.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401–1412, 1995.

GIBSON, G.R.; BEATTY, E.R.; WANG, X.; CUMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, p.975-982, 1995.

GÓES, S. P.; RIBEIRO, M. L. L. Alfa-galactosidase: general aspects and its application on soybean oligossacharides. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23, p.111-119, 2002.

GONZALES, E.; MELLO, H.H.C.; CAFÉ, M.B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, v.13, p.48-53, 2012.

GOTO, K.; FUKAI K.; HIKIDA, J.; NANJO, F.; HARA, Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from Yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.59, p.2346 -2347, 1995.

GUEDES, R.M.C; FRANÇA, S.A. Imunologia do trato digestivo de suínos. In: XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES, 2007, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. p.44-53.

GUERRA-ORDAZ, A.A.; MOLIST, F.; HERMES, R.G.; GÓMEZ DE SEGURA, A.; PÉREZ, J.F.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J.; TCHORZEWSKA, M.A.; COLLINS, J.W. Effect of inclusion of lactulose and *Lactobacillus plantarum* on the intestinal environment and performance of piglets at weaning. **Animal Feed Science and Technology**, v.185, p.160–168, 2013.

GUTTERIDGE, J.M. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.917, p.219-223, 1987.

HAHN, P.Y.; EVANS, S. E.; KOTTOM, T. J.; STANDING, J. E.; PAGANO, R. E.; LIMPER, A.H. Pneumocystis carinii cell wall β -glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 2043-2050, 2003.

HALAS, V.; NOCHTA, I. Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. **Animals**, v.2, p.261-274, 2012.

HARTEMINK, R.; VAN LAERE, K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.367–374, 1997.

HERRE, J.; MARSHALL, A. J.; CARON, E.; EDWARDS, A. D.; WILLIAMS, D. L.; SCHWEIGHOFFER, E.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; SOUSA, C. R.; HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. **Molecular Immunology**, v. 40, p.869-876, 2004.

HESELTINE, W.W.; CAMPBELL, P.J. Laboratory studies on chlorhydroxyquinoline. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p.1-3, 1960.

HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKUNAGA, T.; TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria and Microflora**, v.5, p.37-50, 1986.

HISS, S.; SAUERWEIN, H. Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.87, p.2–11, 2003.

HOWARD, M. D.; GORDON, D. T.; PACE, L. W.; GARLEB, K. A.; KERLEY, M. S. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.21, p.297–303, 1995.

HÖLZEL, C. S.; MULLER, C.; HARMS, K. S.; MIKOLAJEWSKI, S.; SCHAFER, S.; SCWAIGER, K.; BAUER, J. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. **Environmental Research**, v.113, p.21-27. 2012.

IMAMURA, L.; HISAMITSU, K.; KOBASHI, K. Purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. **Biological Pharmacological Bulletin**, v.17, p.596-602, 1994.

JENSEN, B.B. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. **Journal of Animal Feed Science**, v.7, p.45–64, 1998.

JL, D.; WANG, Y.; WANG, L.; CHEN, L.; HU, B.; TANG, G.; XIN, J.; SONG, T.; WEN, T.; SUN, Y.; PAN, Y.; LIU, Z. Analysis of heavy pollution episodes in selected cities of northern China. **Atmospheric Environment**, v. 50, p. 338-348, 2012.

JUKES, T.; SWICK, R.A. Role of growth promotants in poultry and swine feed. **American Soybean Association**, v.11, p.14-24, 1996.

KALGHATGI, S.; SPINA, C.S; COSTELLO, J.C; LIESA, M.; MORONES-RAMIREZ, J. R.; SLOMOVIC, S.; MOLINA, A.; SHIRIHAI, O. S.; COLLINS, J. J.. Bactericidal

Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. **Science Translational Medicine**, v.5, p.1-11, 2013.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nature Immunology**, v.7, p.131-137, 2006.

KIM, J. D.; HYUN, Y.; SOHN, K. Effects of mannanoligosaccharide and protein levels on growth performance and immune status in pigs weaned at 21 d of age. **Korean Journal of Animal Science and Technology**, v.42, p.489-498, 2000.

KELLY, D.; SMITH, J.A.; McCRAKEN, K.J. Digestive development of the early-weaned pig. In: 2. Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. **British Journal of Nutrition**, v.65, p.181-188, 1991.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v.109, p.161-165, 2007.

KOHANSKI, M.; DWYER, D.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.423-35, 2010.

KUMAR, V.; SAURABH, S.; SAHU, N. P.; PAL, A.K. Glucan, a feed Additive to Manage Aquatic Animal Health. **Aqua Feeds: Formulation & Beyond**, v.2, p.9-11, 2005.

KUSHNER, I. C-reactive protein and the acute-phase response. **Hospital Practice**, v.25, p.13-28, 1990.

LEDUR, V.S.; RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M.; GIANFELICI, M.F.; VIEIRA, M.M.; GRANDI, J.; MACHINSKY, T.G. Respostas fisiológicas e de desempenho de leitões suplementados com β -glucanos e desafiados imunologicamente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.434-442, 2012.

LEI, X.J.; KIM, Y.M.; PARK, J.H.; BAEK, D.H.; NYACHOTI, C.M.; KIM, I.H. Effects of levan-type fructan on growth performance, nutrient digestibility, diarrhoea scores, faecal shedding of total lactic acid bacteria and coliform bacteria, and faecal gas emission in weaning pigs. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v.98, p.1539-1544, 2018.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13.ed. Porto Alegre: Amgh, 2016.

LI, J.; XING, J.; LI, D.D.; WANG, X.; ZHAO, L.; LV, S.; HUANG, D. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned piglets. **Archives of Animal Nutrition**, v.59, p.303-313, 2005.

LUDKE, J.V.; BERTOL, T.M.; SCHEUERMANN, G.N. Manejo da alimentação. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L.A.C. **Suinocultura Intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Concórdia: Embrapa-CNPSA, 1998. p. 64-90.

LUSK, J.L.; NORWOOD, F.B.; PRUITT, J.R. Consumer demand for a ban on antibiotic drug use in pork production. **American Journal of Agricultural Economics**, v.88, p.1015-1033, 2006.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: PHILLIPS, S.F., PEMBERTON, J.H., SHORTER, R.G. (Eds.). **The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease**. Nova York: Raven Press, 1991. p.51–94.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Seminário de Ciências Agrárias**, v.29, p.631-650. 2008.

MANNERS, M. J. The development of digestive function in the pig. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.35, p.49–55, 1976.

MAO, X. F.; PIAO X. S.; LAI C. H. Li, D.F., XING, J.J., SHI, B.L. Effects of beta-glucan obtained from the Chinese herb *Astragalus membranaceus* and lipopolysaccharide challenge on performance, immunological, adrenal, and somatotropic responses of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.83, p.2775-2782, 2005.

MAPPLEY, L.J.; TCHÓRZEWSKA, M.A.; NUNEZ, A., WOODWARD, M.J.; BRAMLEY, P.M.; LA RAGIONE, R.M. Oral treatment of chickens with *Lactobacillus reuteri* LM1 reduces *Brachyspira pilosicoli*-induced pathology. **Journal of Medical Microbiology**, v.62, p.287–296, 2012.

MARUBASHI, T. Intestine: intestinal microflora management tools for healthy environment. **Revista PorkWord**, v.58, p.152-155, 2010.

MATHEW, A.G.; SUTTON, A.L.; SCHEIDT, A.B.; PATTERSON, J.A.; KELLY, D.T.; MEYERHOLTZ, K.A. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1503-1509, 1993.

MENDES, C. B. S; FONTES, D. O; GUEDES, R. M. C.; SILVA, F.C.O.; SILVA, M.A.; OLIVEIRA, J.S.V.; FERNANDES, I.S.; FONTES, F.A.P.V. Suplementação de betaglucano a dietas de leitões de 21 a 60 dias de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.696-705, 2010.

MENTEN, J. F. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2002. p.251-276.

MIGUEL, J.C.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; PETTIGREW, J.E. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos®) for improving nursery pig performance. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, p.296–307, 2004.

MIKKELSEN, L.L., JAKOBSEN, M., JENSEN, B.B. Effect of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets post weaning. **Animal Feed Science and Technology**, v.109, p.133–150, 2003.

MILLER, B.; STOKES, C. The neonatal and postweaned pig. In: COLE, D.J.A.; WISEMAN, J.; NABUURS, M.J.A.; HOOGENDOORN, A.; VAN DER MOLEN, E.J. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. **Research Veterinary Science**, v.55, p.78–84, 1993.

MORAN, C. A. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 2004, Lexington. **Anais...** Lexington: Alltech, 2004. p. 280-296.

MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The potential use of prebiotics in pig nutrition. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION, 2000, Seoul. **Anais...** Seoul: Seoul National University, 2000. p.515-528.

MOTA, L.M.; VILAR, F.C.; DIAR, L.B.; NUNES, T.F.; MORIGUTI, J.C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina**, v. 43, p. 164–172, 2010.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

NEWMAN, K.E.; NEWMAN, M.C. Evaluation of mannan oligosaccharides on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. **Journal of Animal Science**, v.79, n. 1, 2001.

NOCHTA, I.; TUBOLY, T.; HALAS, V.; BABINSZKY, L. The effect of different levels of dietary mannanoligosaccharide on specific cellular and humoral immune response in weaned piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.93, p.496-504, 2009.

NOCHTA, I.; HALAS, V.; TOSSENBERGER, J.; BABINSZKY, L. Effect of different levels of mannan oligosaccharide supplementation on the apparent ileal digestibility of nutrients, N-balance and growth performance of weaned piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, p.747-756, 2010.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of Immunotoxicology**, v.5, p.47-57, 2008.

OFEK, I.; GOLDBAR, J.; KEISARI, Y.; SHARON, N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.239-276, 1995.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, p.255-265, 2011.

OSBORN, L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell**, v.62, p.3-6, 1990.

PALERMO NETO, J. Uso de antimicrobianos em suinocultura e desenvolvimento de resistência bacteriana: Uma análise de risco. **PorkWorld (2012)** – disponível em: <<http://www.porkworld.com.br/artigos/post/uso-de-antimicrobianos-em-suinocultura-edesenvolvimento-de-resistencia-bacteriana-uma-analise-de-risco>>. Acesso em: 24 maio 2017.

PRETUS, H.A.; ENSLEY, H.E.; MCNAMEE, R.B.; JONES, E.L.; BROWDER, I.W.; WILLIAMS, D.L. Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 257, p.500–510, 1991.

PROHÁSZKA, L.; BARON, F. The predisposing role of high dietary protein supplies in enteropathogenic *E. coli* infections of weaned pigs. **Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B**. v.27, p.222–232, 1980.

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

PLUSKE, J.R.; LE DIVIDICH, J.; VERSTEGEN, M.W.A. **Weaning the pig: Concepts and consequences**. Wageningen Academic Publishers, 2003, 432 p.

PLUSKE, J.R. Feed-and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, p.1–7, 2013.

PUPPA, J.M.R. Saúde intestinal dos leitões: o papel de alguns agentes reguladores. In: Simpósio Brasil Sul de Suinocultura, 2008. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008. p. 13-27.

RICE, P.J.; LOCKHART, B.E.; BARKER, L.A.; ADAMS, E.L.; ENSLEY, H.E.; WILLIAMS, D.L. Pharmacokinetics of fungal (1-3) beta-D-glucans following intravenous administration in rats. **International Immunopharmacology**, v.4, p.1209-1215, 2004.

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish Shellfish Immunology**, v.9, p.269–290, 1999.

ROOKE, J.A.; BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock Production Science**, v.78, p.13–23, 2002.

ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Frontiers in Physiology**, v.9, p.1-17, 2018.

ROTHKÖTTER, H.J. Anatomical particularities of the porcine immune system—A physician's view. **Developmental & Comparative Immunology**, v.33, p.267-272, 2009.

ROY, M.; GIBSON, G.R. **Probiotics and prebiotics – microbial in menu**. C-H-O Carbohydrates, v.9, 6p. 1998.

SALABI, E.I.; WALSH, T. R.; CHOUCANI, C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.39, p.113-122, 2013.

SANGWAN, V.; TOMAR, S.K.; ALI, B.; SINGH, R.R.B.; SINGH, A.K. Galactooligosaccharides reduce infection caused by *Listeria monocytogenes* and modulate IgG and IgA levels in mice. **International Dairy Journal**, v. 51, p. 58-63, 2015.

SAVAGE, T.F.; COTTER, P.F.; ZAKRZEWSKA, E.I. The effect of feeding a mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgA and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, v.75, p.143, 1996.

SCHOENHERR, W.D.; POLLMANN, D.S.; COALSON, J.A. Titration of MacroGard-S on growth performance of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v.72, p.57, 1994.

SCHOKKER, D.; FLEDDERUS, J.; JANSSEN, R.; VASTENHOUW, S.A.; BREE, F.M.; SMITS, M.A.; JANSMAN, A.A.J.M. Supplementation of fructooligosaccharides to suckling piglets affects intestinal microbiota colonization and immune development. **Journal of Animal Science**, 2018. (no prelo) DOI: 10.1093/jas/sky110

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p. 55-65, 2003.

SINKORA, M.; BUTLER, J.E. The ontogeny of the porcine immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.273-283, 2009.

SMIRICKY-TJARDES, M.R.; FLICKINGER, E.A.; GRIESHOP, C.M.; BAUER, L.L.; MURPHY, M.R.; FAHEY, G.C. In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2505–2514, 2003.

SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L.A.C. **Suinocultura Intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Concórdia: Embrapa-CNPSA, 1998. 388p.

SØRENSEN, M.T.; VESTERGAARD, E.M.; JENSEN, S.K.; LAURIDSEN, C.; HØJSGAARD, S. Performance and diarrhoea in piglets following weaning at seven weeks of age: Challenge with *E. coli* O 149 and effect of dietary factors. **Livestock Science**, v.123, p.314-321, 2009.

SPIEGEL, J.E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V. H.; SCHMITT, D.F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v.48, p.85-89, 1994.

ŠROBÁROVÁ, A.; KOGAN, G.; EGED, Š. Yeast polysaccharide affects fusaric acid content in maize root rot. **Chemistry & Biodiversity**, v.2, p.1685–1690, 2005.

STRICKLING, J. A.; HARMON, D. L.; DAWSON, K. A.; GROSS, K. L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diet: Influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.205–219, 2000.

STUYEVEN, E. Effect of beta-glucans on ETEC infection of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p.60-66, 2010.

TANNOCK, G. W. The lactic microflora of pigs, mice and rats. In: **The Lactic Acid Bacteria**. WOOD, B.J.B. 1.ed. Londres: Elsevier Applied Science Publishers, 1992. v.2, p 21-48.

THACKER, P.A. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, p.1-12, 2013.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 9.ed. São Paulo: Elsevier, 2014.

TSUKAHARA, T.; INOUE, R.; SHIMOJO, N.; NAKAYAMA, K.; SAITO, S.; SATO, T.; ITOH, T.; FUJITA, K.; USHIDA, K. Alpha-Linked Galactooligosaccharide Suppresses Small Intestinal Eosinophil Infiltration and Improves Growth Performance in Weaning Pigs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, p.547-553, 2009.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K.; GEE, J. M.; GIBSON, G. R. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a

continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. **Journal of Nutrition**, v.135, p.1726–31, 2005.

UTIYAMA, C. E.; OETTING, L. L.; GIANI, P. A.; RUIZ, U.S; MIYADA, E.S. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.2359-2367, 2006.

VALPOTIĆ, H.; ZAJA, I.Z.; SAMARDZIJA, M.; HABRUN, B.; OSTOVIĆ, M; DURICIĆ, D.; MAČESIĆ, N.; MIKULEC, Z.; KOCILA, P.;SOBIECH, P.;VALPOTIĆ, I.; VINCE, S. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide and clinoptilolite modulates innate and adaptive immune parameters of weaned pigs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.21, p.83-93, 2018.

VARLEY, M.A. The Neonatal Pig Development and Survival. In: HERPIN, H.R.; KELLEY, K.W. (Eds.). **Immunology and Neonatal Mortality**. Guildford: CABI, 1995. p.39-55.

VERSTEGEN, M.W.A.; WILLIAMS, B.A. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. **Animal Biotechnology**, v.13, p.113–127, 2002.

VETVICKA, V.; THORNTON, B.P.; WIEMAN, T.J.; ROSS, G.D. Targeting of natural killer cells to mammary carcinoma via naturally occurring tumor cell-bound iC3b and β -glucan-primed CR3 (CD11b/CD18). **The Journal of Immunology**, v.159, p.599-605, 1997.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, v.2, p.115-119, 2011.

VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The effects of β -glucan on pig growth and immunity. **Open Biochemistry Journal**, v.1, p.89-93, 2014.

VOLMAN, J.J.; RAMAKERS, J.D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behaviour**, v.94, p.276-284, 2008.

WAKSHULL, E.; BRUNKE-REESE, D.; LINDERMUTH, J.; FISETTE, L.; NATHANS, R.S.; CROWLEY, J.J.; TUFTS, J.C.; ZIMMERMAN, J.; MACKIN, W.; ADAMS, D.S. PGG-glucan, a soluble β -(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid β -(1,3)-glucan receptor. **Immunopharmacology**, v. 41, p. 89-107, 1999.

WANG, X.; GIBSON, G.R. Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.373–380, 1993.

WHITE, L. A.; NEWMAN, M. C.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2619- 2628, 2002.

WILLIAMS, D.L. Overview of (1-3) beta-D-glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v.6, p.247-250, 1996.

WILLMENT, J.A.; LIN, H.H.; REID, D.M.; TAYLOR, P.R.; WILLIAMS, D.L.; WONG, S.Y.; GORDON, S. BROWN, G.D. Dectin-1 expression and function are enhanced on

alternatively activated and GM-CSF treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, v.171, p.4569–4573, 2003.

WOOD, P. **Understanding Immunology**. 2. ed. England: Pearson Education Limited, 2006. 328p.

WU, C.; XU, Q.; WANG, R.; QIN, L.; PENG, X.; HU, L.; LIU, Y.; FANG, Z.; LIN, Y.; XU, S.; FENG, B.; LI, J.; WU, D.; CHE, L. Effects of dietary β -glucan supplementation on growth performance, immunological and metabolic parameters of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Food & Function**, 2018. (no prelo) DOI: 10.1039/C7FO01980G.

XU, R.J.; WANG, F.; ZHANG, S.H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. **Livestock Production Science**, v.66, p.95–107, 2000.

XU, Z. R.; ZOU, X. T.; HU, C. H.; XIA, M. S.; ZHAN, X. A.; WANG, M. Q. Effects of Dietary Fructooligosaccharide on Digestive Enzyme Activities, Intestinal Microflora and Morphology of Growing Pigs. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.15, p. 1784-1789, 2002.

XUAN, Z.N.; KIM, J.D.; HEO, K.N.; JUNG, H.J.; LEE, J.H.; HAN, Y.K.; KIM, Y.Y.; HAN IN, K. Study on the development of a probiotics complex for weaned pigs. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.14, p.1425–1428, 2001.

YAMASHITA, K.; KAWAI, K.; ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, v.4, p.961-966, 1984.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.-G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.-P. Adsorption of zearalenone by β -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1195–1200, 2004a.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.-G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J.-P. Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties towards Zearalenone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p3666–3673, 2004b.

YASUI, H.; OHWAKI, M. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1187- 1195, 1991.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.

ZHANG, R.; WANG, X.; GU, J.; ZHANG, Y. Influence of zinc on biogas production and antibiotic resistance gene profiles during anaerobic digestion of swine manure. **Bioresource Technology**, v.244, p.63-70, 2017.

ZHAO, P.Y.; JUNG, J.H.; KIM, I.H. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 833-839, 2012.

ZHAO, W.; SU, J.Q.; AN, X.L.; HUANG, F.Y.; RENSING, C.; BRANDT, K.K.; ZHU, Y.G. Feed additives shift gut microbiota and enrich antibiotic resistance in swine gut. **Science of the Total Environment**, v. 621, p.1224-1232, 2018.

CAPÍTULO 2

O capítulo 2 intitulado “**Prebióticos em substituição à antimicrobiano sobre a saúde intestinal e desempenho de leitões recém-desmamados**” foi escrito de acordo com as normas do Periódico “Animal Feed Science and Technology”.

Prebióticos em substituição à antimicrobiano sobre a saúde intestinal e desempenho de leitões recém-desmamados

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar a inclusão dos prebióticos mananoligossacarídeo (MOS), β -glucano, frutoligossacarídeo (FOS) e galactoligossacarídeo (GOS) em substituição à antimicrobiano, em dietas de leitões recém-desmamados, sobre o desempenho, incidência de diarreia e saúde intestinal. Foram realizados dois experimentos (Exp.), com 120 leitões recém-desmamados (média de 21 dias e $6,85 \text{ kg} \pm 0,83 \text{ kg}$ - Exp. 1) e 40 leitões recém-desmamados (média de 21 dias e $7,03 \pm 0,53 \text{ kg}$ - Exp. 2), distribuídos em delineamento em blocos ao acaso, com cinco tratamentos e oito repetições. Os tratamentos foram: CON= dieta basal (DB) + 120 ppm de halquinol; M β = DB + MOS e β -glucano (3,0 kg/t); F₉G₁= DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 9:1); F₇G₃= DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 7:3); F₅G₅= DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 5:5). No Exp. I, no período de 0-15d, os animais dos tratamentos CON e F₉G₁ apresentaram melhor ($P < 0,05$) conversão alimentar (CA) que os animais do tratamento M β . No período de 0-28d, os animais do tratamento F₉G₁ apresentaram tendência de melhor ($P < 0,10$) CA. No período total de experimento (0-41d), os animais do tratamento CON apresentaram melhor ($P < 0,05$) CA em comparação aos animais do tratamento F₇G₃, não diferindo dos demais animais. No Exp. II, no duodeno, houve maior ($P < 0,05$) altura de vilos (AV) nos animais dos tratamentos CON, M β e F₉G₁ em relação aos animais do tratamento F₇G₃ e também maior ($P < 0,05$) área de superfície de vilos (AS) nos animais dos tratamentos M β e F₉G₁ em relação aos animais do tratamento F₇G₃. No jejuno, houve maior ($P < 0,05$) relação altura de vilos:profundidade de cripta (AV:PC) nos animais que receberam o tratamento CON comparados aos animais do tratamento F₇G₃. Não houve diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os tratamentos para a quantificação de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo do cólon e microbiologia do conteúdo cecal dos animais. Desta forma, conclui-se que as combinações de prebióticos testadas, com exceção da proporção do tratamento F₇G₃, promovem melhorias à saúde intestinal e desempenho animal, de forma semelhante ao uso de antimicrobiano, para leitões em fase de creche.

Palavras-chave: aditivos, desmame, saúde, suínos

Prebiotics in substitution to antimicrobial on intestinal health and performance of weanling pigs

ABSTRACT: The aim of the study was to evaluate the inclusion of prebiotics mannanoligosaccharide (MOS), β -glucan, fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) in substitution to antimicrobial, in diets of weanling pigs, on growth performance, diarrhea incidence and intestinal health. Two experiments (Exp.) were carried out, using 120 weaned piglets (21 days and 6.85 ± 0.83 kg in average – Exp. I) and 40 weaned piglets (21 days and 7.03 ± 0.53 kg in average – Exp. II) in a completely randomized block design with five treatments and eight replicates. The treatments were: CON = basal diet (BD) + 120 ppm of halquinol; M β = BD + MOS and β -glucan (3.0 kg/t); F₉G₁ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS: GOS ratio 9:1); F₇G₃ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS: GOS ratio 7:3); F₅G₅ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS:GOS ratio 5:5). In Exp. I, in the first evaluated period (0-15d), the animals of CON and F₉G₁ treatments presented better ($P < 0.05$) feed conversion ratio (FCR) compared to the animals of M β treatment. In the period of 0-28d, the animals from F₉G₁ treatment tended to improve ($P < 0.10$) FCR. In the total experiment period (0-41d), animals fed CON treatment showed better ($P < 0.05$) FCR compared to the animals fed F₇G₃, not differing from the other treatments. In the Exp. II, in the duodenum, there was higher ($P < 0.05$) villus height (VH) in animals from CON, M β and F₉G₁ treatments compared to those of F₇G₃ treatment and also higher ($P < 0.05$) villus surface area (SA) for the animals fed M β and F₉G₁ compared to animals of F₇G₃ treatment. In the jejunum, there was a higher ($P < 0.05$) villus height crypt depth ratio (VH:CD) in the animals fed CON treatment compared to the animals from F₇G₃ treatment. There were no statistical differences ($P > 0.05$) among the treatments to the short chain fatty acids of the colon content and microbiology of cecal content of the animals. Thus, it is concluded that the prebiotics combinations tested, with exception of the F₇G₃ proportion, lead to improvement on intestinal health and animal performance, similar to antimicrobial effects to nursery piglets.

Keywords: additives, health, swine, weaning

1. Introdução

O banimento ou redução do uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho por diversos países têm pressionado os demais a também adotarem estas medidas, devido ao surgimento de cepas bacterianas patogênicas resistentes aos antimicrobianos existentes na medicina humana e veterinária (Meek et al., 2015). A restrição do uso destes compostos em dietas animais é especialmente preocupante na fase pós-desmame na suinocultura, uma vez que, comercialmente, os leitões são desmamados em idade em que o desenvolvimento da maturidade fisiológica e imunológica é insatisfatório (Brown et al., 1961; Pluske et al., 2003).

Nesta fase os animais não possuem secreção satisfatória de ácido clorídrico estomacal e enzimas intestinais (Strube et al., 2013), tornando o ambiente gastrintestinal propício à proliferação exacerbada de cepas bacterianas específicas, como *Escherichia coli*, *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp., principais agentes etiológicos de quadros diarreicos em leitões (Zimmerman et al., 2012). Estas alterações na microbiota, associadas à redução no consumo de ração na fase pós-desmame, geram desordens nas taxas de *turnover* das células epiteliais intestinais, com consequente alteração da morfometria intestinal e redução da área digestiva e absorptiva (Yang et al., 2014; Lee et al., 2016), ocasionando prejuízo no desempenho dos animais (Lee et al., 2016).

Deste modo, estudos com novos aditivos alimentares, como os prebióticos, probióticos, simbióticos e extratos herbais têm recebido atenção como alternativas ao uso dos antimicrobianos (Sethiya, 2016; Kiczorowska et al., 2017). Os compostos prebióticos, que não são digeridos ou absorvidos, porém servem como substrato à cepas bacterianas benéficas no trato gastrintestinal (TGI) dos animais (Roberfroid, 2007), possuem efeitos comprovados benéficos no desempenho e saúde intestinal de leitões (Wang et al., 2009; Tsukahara, 2009; Che et al., 2010; Zhao et al., 2012; Lei et al., 2018; Schokker et al., 2018; Wu et al., 2018), contudo, faltam estudos com possíveis combinações e efeitos sinérgicos de diferentes moléculas prebióticas.

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes prebióticos (mananoligossacarídeo, β -glucano, frutoligossacarídeo e galactoligossacarídeo) como possíveis substituidores do antimicrobiano halquinol, sobre o desempenho, a incidência de diarreia e saúde intestinal de leitões recém-desmamados.

2. Material e Métodos

2.1. Instalação experimental e animais

Os experimentos foram realizados na Unidade de Pesquisa da Área de Suinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Campus de Botucatu, SP, e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo número 133/2016). O Exp. I objetivou avaliar o desempenho e incidência de diarreia dos leitões, enquanto o Exp. II objetivou avaliar a morfometria do intestino delgado, microbiologia do conteúdo do ceco e concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) do conteúdo do cólon dos animais. Os leitões foram alojados em baias suspensas, com piso anterior concretado e posterior ripado plástico, com área de 1,70 m², equipadas com bebedouro tipo chupeta, comedouro tipo calha e campânulas com resistência elétrica.

2.2 Delineamento e dietas experimentais

Para o Exp. I foram utilizados 120 leitões recém-desmamados com idade média de 21 dias (6,85kg $\pm$ 0,83kg) e o período experimental foi de 41 dias. No Exp. II, foram utilizados 40 leitões recém-desmamados com idade média de 21 dias (7,03kg $\pm$ 0,64kg) e o período experimental foi de 14 dias. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental de blocos ao acaso, com cinco tratamentos, oito repetições e três (Exp. I) ou um (Exp. II) animal(ais) por baia (unidade experimental). Os tratamentos foram: **CON**: dieta basal (DB) com adição halquinol (clorohidroxiquinolina 60%) como melhorador de desempenho (120 ppm); **M β** : DB + MOS e β -glucano (3,0 kg/t); **F₉G₁**: DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0kg/t) (relação FOS:GOS de 9:1); **F₇G₃**: DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS de 7:3); **F₅G₅**: DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS de 5:5). Os níveis de inclusão dos aditivos testados nas dietas foram estabelecidos em experimentos anteriores do grupo de pesquisa (dados não publicados) e são apresentados na Tabela 3. Adotou-se o programa de alimentação em três fases: dieta pré-inicial 1; dieta pré-inicial 2 e dieta inicial, sendo as dietas isonutritivas formuladas de modo a atender as exigências nutricionais mínimas dos animais, de acordo com Rostagno et al. (2011) (Tabelas 1 e 2) e fornecidas à vontade.

Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais nas fases pré-inicial I, pré-iniciais II e iniciais

Ingredientes	Pré-inicial I	Pré-inicial II	Inicial
Milho, moído	52,240	57,842	56,884
Soja, farelo (45%)	19,000	22,000	29,000
Plasma sanguíneo	4,000	2,500	-
Soro de leite	7,500	2,500	-
Sacarose	4,000	4,000	4,000
Maltodextrina	2,000	-	-
Óleo de soja	2,900	3,000	2,500
Farelo de glúten de milho (60%)	2,500	2,500	1,500
Calcário calcítico	0,675	1,800	1,500
Fosfato bicálcico	1,900	0,770	1,500
Cloreto de sódio	0,280	0,450	0,830
L-Lisina HCl (78%)	0,700	0,610	0,510
DL-Metionina (99%)	0,250	0,190	0,405
L-Treonina (98%)	0,240	0,185	0,116
L-Triptofano (98%)	0,060	0,045	0,115
L-Isoleucina (99%)	0,135	0,060	0,020
L-Valina (99%)	0,175	0,110	0,015
Óxido de Zinco (73%)	0,340	0,200	0,200
Cloreto de colina (60%)	0,090	0,090	0,090
Adsorvente ¹	0,250	0,250	0,250
Antioxidante (BHT)	0,015	0,015	0,015
Mistura mineral ²	0,100	0,100	0,100
Mistura vitamínica ³	0,150	0,150	0,150
Inerte (caulim) ⁴	0,180	0,180	0,180
Clorohidroxiquinolina (60%) ⁵	0,020	0,020	0,020
Prebióticos ⁶	0,300	0,300	0,300
TOTAL	100,000	100,000	100,000

¹Adsorvente NOTOX®; ²Premix mineral fornecendo por kg de ração: 100mg Fe, 10mg Cu, 0,45mg Se, 40mg Mn, 80mg Zn, 1mg Co, 1,5mg I, 79,70mg S, 0,30mg Mg; ³Premix vitamínico fornecendo por kg de ração: 9000 UI vit. A, 2700 UI vit. D3, 48 UI vit. E, 2,5mg vit. K, 2,03mg vit. B1, 6mg vit. B2, 3mg vit. B6, 30mg vit. B12, 0,9mg ácido fólico, 14,03mg ácido pantotênico, 30mg niacina, 0,12mg biotina; ⁴Inerte caulim somente utilizado nas dietas experimentais CON; ⁵Melhorador de desempenho halquinol (clorohidroxiquinolina 60%) somente utilizado nas dietas experimentais CON; ⁶Nas dietas experimentais Mβ, F₉G₁, F₇G₃, F₅G₅ foram incluídos, respectivamente: 0,30% de MOS+β-glucano; 0,20% de MOS+β-glucano, 0,09% de FOS e 0,01% de GOS; 0,20% de MOS+β-glucano, 0,07% de FOS e 0,03% de GOS; 0,20% de MOS+β-glucano, 0,05% de FOS e 0,05% de GOS.

Tabela 2. Valores nutricionais calculados para as fases pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais¹

Nutrientes	Pré-inicial I	Pré-Inicial II	Inicial
Energia metabolizável, kcal/kg	3400	3375	3303
Proteína bruta, %	20,00	21,00	19,18
Cálcio, %	0,85	0,83	0,77
Fósforo disponível, %	0,50	0,45	0,40
Lisina digestível, %	1,45	1,33	1,17
Metionina digestível, %	0,41	0,37	0,33
Metionina + Cistina digestível, %	0,81	0,75	0,65
Treonina digestível, %	0,91	0,84	0,74
Triptofano digestível, %	0,26	0,24	0,21
Valina digestível, %	1,00	0,92	0,81
Isoleucina digestível, %	0,80	0,73	0,64
Leucina digestível, %	1,45	1,33	1,17

¹Valores nutricionais dos ingredientes propostos por Rostagno et al. (2011).

Tabela 3. Níveis de inclusão (%) de mananoligossacarídeo (MOS), β -glucano, galactoligossacarídeo (GOS), frutoligossacarídeo (FOS) e do antimicrobiano melhorador de desempenho nas dietas experimentais de leitões recém-desmamados

	Dietas experimentais, %				
	CON	M β	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
MOS + β -glucano	-	0,30	0,20	0,20	0,20
FOS	-	-	0,09	0,07	0,05
GOS	-	-	0,01	0,03	0,05
Halquinol (Clorohidroxiquinolina 60%)	0,02	-	-	-	-

2.3 Variáveis analisadas

2.3.1 Experimento 1

Desempenho animal: Para avaliação do desempenho, os animais, a ração fornecida e as sobras foram pesados no início e no final de cada fase do experimento, para determinar o ganho diário de peso, o consumo diário de ração e conversão alimentar.

Incidência de diarreia: Durante o período experimental (41 dias) cada leitão da baia foi observado todas as manhãs e tardes com a finalidade de determinar a incidência de diarreia. O monitoramento das fezes foi realizado quanto a sua consistência e aspecto, de acordo com a metodologia proposta por Heo et al. (2009) com modificações, com o uso de escores subjetivos numa escala de três pontos, sendo 1 = fezes normais (bem formadas), 2 = fezes pastosas e 3 = diarreia. Calculou-se a incidência média de diarreia (%), a partir da ocorrência de escore 3 para cada animal da baia (unidade experimental) nos dois períodos do dia durante os 41 dias de experimento, totalizando 246 observações em cada unidade experimental, usando a seguinte formula: [(ocorrência de escore 3 total da baia $\times$ 100) $\div$ 246

observações totais]. Posteriormente, transformaram-se os valores obtidos de incidência de diarreia percentual para arco-seno, para posterior análise estatística.

2.3.2 Experimento II

No 14º dia do experimento os animais foram sacrificados por meio de sangria posteriormente à eletronarcose para a coleta de amostras e posterior avaliação das seguintes variáveis:

Morfometria do intestino delgado: Porções de aproximadamente três centímetros do duodeno, jejuno e íleo foram coletadas e fixadas em 40 mL de solução de formol tamponado a 10% por 48h, e posteriormente enviadas à Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPEX – Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu. Após a desidratação em série crescente de alcoóis e da passagem por bateria de xilol, as amostras foram incluídas em parafina e microtomizadas para a montagem das lâminas histológicas. A coloração dos cortes foi realizada com hematoxilina-eosina (HE). Foram realizadas 30 leituras da altura das vilosidades (AV) e profundidade das criptas (PC) em cada um dos segmentos do intestino delgado, utilizando o microscópio Leica DM 750 equipado com câmera ICC 50, e o programa de análise de imagens ImageJ®. A partir dos resultados de AV e PC, foi calculada a relação AV:PC. As mensurações da área das placas de Peyer foram avaliadas nos cortes histológicos da submucosa do íleo corados com HE, segundo Behmer et al. (1976), nas mesmas lâminas confeccionadas para a medida de AV e PC, utilizando o mesmo microscópio para captura e registro das imagens e o mesmo programa de análise de imagens para as medidas. Em todas as lâminas, calculou-se a área de superfície de vilos (AS), de acordo com Argenzio et al. (1990).

Microbiologia intestinal: Após o abate, os cecos dos animais foram imediatamente retirados encaminhados ao laboratório de pesquisa da Inspeção de Alimentos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – DHVSP, FMVZ, Unesp, Botucatu, em caixas isotérmicas e refrigeradas. As amostras foram retiradas das embalagens e colocadas em recipientes estéreis. O ceco de cada animal foi aberto com auxílio de uma pinça e um bisturi ambos estéreis, pesado 25 gramas do conteúdo cecal em sacos estéreis e adicionados 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) a 0,1% formando a diluição 10^{-1} . A partir da primeira diluição iniciaram-se diluições seriadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de APT 0,1% até a diluição 10^{-9} . A contagem do grupo coliformes a 35º e *Escherichia coli* foi realizada com auxílio do Petrifilm (Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de *Escherichia coli*/Coliformes) a partir de 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} conforme a

especificação do fabricante. Para a contagem de bactérias ácidos lácticas e *Clostridium* Sulfito-Redutores utilizou-se a metodologia descrita por Hall et al. (2001) e Silva et al. (2001), respectivamente. O isolamento de *Salmonella* seguiu conforme a metodologia proposta por Andrews et al. (1995).

Concentração de ácidos graxos de cadeia curta: Para avaliação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo do cólon proximal, uma amostra de aproximadamente 2 g do conteúdo do cólon proximal foi retirada e congelada imediatamente após a coleta a -20°C para posterior análise no Laboratório de Bromatologia da USP – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Piracicaba. Após o descongelamento, as mesmas foram centrifugadas a 5.000 RPM a 10°C por 15 minutos, e o sobrenadante foi novamente centrifugado com ácido fórmico a 16%. O sobrenadante obtido foi pipetado e utilizado posterior determinação das concentrações de AGCC (ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico), que foram realizadas por meio de cromatografia gasosa (Erwin et al., 1961).

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento PROC GLM do SAS, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq P < 0,10$).

3. Resultados

3.1 Desempenho

No período de 0-15 dias, houve diferença ($P < 0,01$) entre os tratamentos para conversão alimentar (CA) (Tabela 4), de modo que os animais que receberam os tratamentos CON e F₉G₁ apresentaram melhor CA em relação aos leitões do tratamento Mβ. Para o período de 0-28 dias, houve tendência ($P = 0,0603$) de melhor CA para os animais do tratamento F₉G₁. Para todo o período experimental (0-41 dias), os animais do grupo CON apresentaram melhor ($P < 0,05$) CA em relação àqueles do tratamento F₇G₃, não diferindo ($P > 0,05$) dos demais tratamentos com inclusão dos prebióticos, e tendência ($P = 0,0521$) de redução da incidência de diarreia para os animais do tratamento F₉G₁ (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP), conversão alimentar (CA) e incidência de diarreia (ID) dos leitões durante o período experimental (41 dias)

Variáveis	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅	CV ¹	P
<i>Dias 0 a 15</i>							
CDR (g)	309	301	305	325	332	14,54	0,6049
GDP (g)	243	211	241	239	249	14,60	0,2503
CA	1,28 ^a	1,46 ^b	1,27 ^a	1,37 ^{ab}	1,38 ^{ab}	6,33	0,0007
<i>Dias 0 a 28</i>							
CDR (g)	535	514	531	563	573	10,04	0,1989
GDP (g)	343	322	345	347	356	11,55	0,5347
CA	1,56	1,60	1,54	1,63	1,61	4,06	0,0603
<i>Dias 0 a 41</i>							
CDR (g)	719	708	714	720	748	8,17	0,7021
GDP (g)	413	399	401	394	411	9,55	0,8443
CA	1,74 ^a	1,78 ^{ab}	1,78 ^{ab}	1,83 ^b	1,82 ^{ab}	3,35	0,0320
ID (%)	5,95	7,32	4,22	6,10	8,89	29,76	0,0521

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

¹CV = Coeficiente de variação (%).

3.2 Morfometria, microbiologia e concentração de ácidos graxos de cadeia curta

Os animais dos tratamentos CON, Mβ e F₉G₁ apresentaram maior (P<0,05) altura de vilos (AV) no duodeno em relação aos animais do tratamento F₇G₃, não diferindo (P>0,05) dos animais do tratamento F₅G₅, enquanto a área de superfície de vilos (AS) foi maior (P<0,05) nos leitões dos tratamentos Mβ e F₉G₁, comparado aos animais do tratamento F₇G₃. No jejuno, os animais do grupo CON apresentaram maior (P<0,05) relação altura de vilos:profundidade de criptas (AV:PC) em relação aos animais do tratamento F₇G₃, não diferindo (P>0,05) dos demais tratamentos. No íleo, houve tendência (P=0,0993) de diminuição da profundidade de criptas (PC) e tendência (P=0,0775) de aumento da AV:PC para os animais do tratamento F₅G₅ (Tabela 5).

Não houve efeito dos tratamentos (P>0,05) na composição da microbiota do conteúdo cecal (Tabela 6) e na concentração de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo do cólon proximal dos leitões (Tabela 7).

Tabela 5. Altura média de vilos (AV), profundidade média de criptas (PC), relação AV:PC, área de superfície de vilos (AS) e área de Placas de Peyer (PP) dos leitões aos 35 dias de idade

Variáveis	COM	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅	CV ¹	P
<i>Duodeno</i>							
AV, μm	392,99 ^a	412,58 ^a	387,21 ^a	321,02 ^b	373,37 ^{ab}	11,11	0,0101
PC, μm	124,67	135,03	125,02	133,03	130,37	15,16	0,8534
AV:PC	3,22	3,14	2,92	3,00	2,92	16,46	0,6901
AS, μm ² (×10 ⁵)	1,88 ^{ab}	2,04 ^a	2,11 ^a	1,38 ^b	1,74 ^{ab}	18,89	0,0100
<i>Jejuno</i>							
AV, μm	379,19	361,18	399,96	345,91	397,82	20,53	0,6451
PC, μm	111,18	114,16	118,68	116,09	112,09	13,02	0,8772
AV:PC	3,89 ^a	3,24 ^{ab}	3,36 ^{ab}	3,03 ^b	3,57 ^{ab}	14,31	0,0363
AS, μm ² (×10 ⁵)	1,04	0,98	1,21	1,01	1,30	28,64	0,2754
<i>Íleo</i>							
AV, μm	225,72	197,43	198,95	214,52	222,20	11,31	0,1628
PC, μm	91,92	98,01	89,44	90,04	84,17	9,97	0,0993
AV:PC	2,62	2,06	2,52	2,38	2,69	17,38	0,0775
AS, μm ² (×10 ⁵)	0,63	0,55	0,58	0,58	0,64	15,90	0,3655
PP, μm ²	245,57	226,55	217,21	264,58	244,22	17,10	0,2393

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

¹CV = Coeficiente de variação (%).

Tabela 6. Microbiologia do conteúdo do ceco dos leitões aos 35 dias de idade

Variáveis	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅	CV ¹	P
Colif. totais ² , UFC/g	4,28	3,81	4,15	3,70	3,67	21,09	0,4877
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	3,50	2,94	2,72	2,70	2,72	54,13	0,8251
Bactérias lácticas, UFC/g	8,02	7,32	7,09	7,34	7,41	18,58	0,7359
Clostr. sulf. red. ³ , UFC/g	2,04	1,97	1,70	1,93	2,16	40,91	0,8409
<i>Salmonella</i> sp.	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	-

¹CV = Coeficiente de variação (%); ²Colif. totais = Coliformes totais; ³Clostr. sulf. red. = *Clostridium* sulfito reductor.

Tabela 7. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo do cólon proximal dos leitões aos 35 dias de idade

Variáveis, mmol/L	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅	CV ¹	P
AGCC Tot. ²	53,100	64,970	52,840	55,080	55,470	47,03	>0,05
Acético	34,380	41,510	34,840	33,860	36,090	49,90	>0,05
Propiônico	10,510	13,340	8,950	11,500	10,580	44,34	>0,05
Butírico	6,930	8,650	5,780	8,200	7,350	49,14	>0,05

¹CV = Coeficiente de variação (%); ²AGCC Tot. = Ácidos graxos de cadeia curta totais.

4. Discussão

4.1 Desempenho

Pouco se sabe sobre os possíveis efeitos sinérgicos e benéficos da combinação das moléculas prebióticas de MOS, β-glucano, FOS e GOS nas dietas de leitões em período pós-desmame. Entretanto, estudos demonstraram melhorias sobre o desempenho e saúde animal

quando estes aditivos foram utilizados isolados ou em combinações de até duas moléculas prebióticas (Schoenherr et al., 1994; Dritz et al., 1995; Kim et al., 2000; Davis et al., 2002; Castillo et al., 2008; Tsukahara et al., 2009; Mao et al., 2010; Hayhoe, 2011; Corassa et al., 2012; Zhao et al., 2012; Lei et al., 2018). No período total deste experimento, as combinações de prebióticos, com exceção do F₇G₃, determinaram respostas de desempenho animal semelhantes ao uso do antimicrobiano halquinol, pois, provavelmente, um consumo por período maior destes compostos nas proporções utilizadas promoveu sinergismo de efeitos dos mesmos, o que se refletiu positivamente sobre o desempenho.

O consumo da combinação de prebióticos F₉G₁ (0,20% de MOS e β -glucano, 0,09% de FOS e 0,01% de GOS) melhorou a conversão alimentar (CA) dos animais no primeiro período avaliado (0-15 d), de forma semelhante ao antimicrobiano, assim como tendeu a melhorar a CA no período de 0-28 d, e também apresentou tendência em reduzir a incidência de diarreia. Sabe-se que os frutoligossacarídeos, assim como inulina e frutanos, têm sido reportados como prebióticos com potente capacidade bifidogênica, selecionando cepas bacterianas do gênero *Bifidobacterium* spp., que estimulam direta e indiretamente células epiteliais intestinais e a imunidade local, o que promove uma cascata de eventos que geram benefícios imunológicos sistêmicos (Rozeboom, 2005; Seifert e Watzl, 2007). Neste estudo não se avaliaram cepas bacterianas benéficas específicas, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., porém, pode-se inferir que o consumo da combinação F₉G₁ promoveu modulação benéfica da microbiota intestinal, selecionando especificamente cepas bacterianas benéficas e estimulatórias ao epitélio, gerando os benefícios sobre o desempenho e incidência de diarreia observados.

Durante o primeiro período avaliado, houve piora na conversão alimentar (CA) para os animais do grupo M β (tratamento com maior inclusão da mistura de MOS e β -glucano - 0,30%) em relação aos animais do grupo CON. Sabe-se que a molécula de β -glucano é imunomoduladora, uma vez que ativa e torna as células de defesa inespecíficas eficientes em fagocitar e eliminar microrganismos invasores (por meios oxidativos e não-oxidativos) (Vetvicka, 2011); e estudos indicam a possível capacidade imunomoduladora de certos mananoligossacarídeos (Torrecillas et al., 2014). Neste sentido, o resultado observado pode ter sido devido à superestimulação das células de defesa inespecíficas causada por esta proporção de prebióticos imunoestimulantes. Apesar deste efeito ser ainda pouco estudado em suínos, o uso de dosagens altas de imunostimulantes pode resultar em sobrecarga de receptores celulares ou fadiga imune relacionada à um alto custo energético da imunoestimulação contínua, o que vêm sendo descrito em estudos com estes prebióticos na

área de aquicultura (Sakai, 1999; Facol, 2007; Fernández-Montero et al., 2016; Solidum et al., 2016). Contudo, este efeito deletério de superestimulação foi diluído no período total experimental.

4.2 Morfometria, microbiologia e ácidos graxos de cadeia curta

Os resultados obtidos para morfometria intestinal demonstraram que os prebióticos estudados, de forma semelhante ao antimicrobiano melhorador de desempenho, agiram como agentes tróficos, provavelmente estimulando o processo mitótico e, conseqüentemente, promovendo aumento na migração de células das criptas para as vilosidades e aumento no tamanho das vilosidades (Pluske et al., 2003), com exceção da combinação de prebióticos do tratamento F₇G₃. Provavelmente, esta combinação de prebióticos (F₇G₃) promoveu desequilíbrio do processo de *turnover* das células intestinais, ocasionando maior apoptose celular e conseqüente acúmulo de células na região das criptas, levando à aumento em sua profundidade média (Pluske et al., 1997).

A ausência de efeitos sobre as variáveis microbiológicas e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) pode ter ocorrido devido à utilização de ingredientes altamente digestíveis na formulação das dietas dos animais (aminoácidos sintéticos, soro de leite, açúcar, maltodextrina e plasma sanguíneo), o que pode ter sido essencial para manutenção do equilíbrio de grandes grupos de bactérias comensais do intestino dos leitões (bactérias lácticas, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp.) e, conseqüentemente, um padrão semelhante de fermentação e geração de metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (Castillo et al., 2008). Também, o baixo desafio sanitário imposto aos leitões, devido ao ambiente experimental controlado, pode ter mascarado o potencial benéfico dos aditivos sobre estas variáveis (Miguel et al., 2004).

Ainda, todas as dietas foram formuladas com inclusão de óxido de zinco, o qual possui reconhecida capacidade bactericida contra bactérias gram-negativas, sobretudo *E. coli*, reagindo com a parede celular bacteriana, promovendo sua lise ou incapacidade de fixação ao epitélio intestinal (Sawai et al., 1998). Contudo, é essencial frisar a importância de estudos na área de avaliação de aditivos em dietas animais, tomando-se como base a formulação das dietas com o uso de ingredientes utilizados na prática na suinocultura, para que o efeito destes aditivos não sejam sub ou superestimados (Aarestrup et al., 2010).

Assim, conclui-se que as combinações de prebióticos testadas, com exceção da proporção do F₇G₃, promovem resultados semelhantes ao uso de antimicrobiano na saúde intestinal e desempenho animal, para leitões em fase de creche.

Referências

- Aarestrup, F. M., Jensen, V. F., Emborg, H., Jacobsen, E., Wegener, H. C., 2010. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. *American Journal of Veterinary Research*. 71, 726-733.
- Andrews, W. H., June, G.A., Sherrode, P.S., Hammack, T.S., Amaguana, R.M., 1995. *Salmonella*. In: FDA bacteriological analytical manual, 8th ed. P.5.01-5.20. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Argenzio, R.A., Liacos, J.A., Levy, M.L., Meuten, D.J., Lecce, J.G., Powell, D.W., 1990. Villous Atrophy, Crypt Hyperplasia, Cellular Infiltration, and Impaired Glucose-NA Absorption in Enteric Cryptosporidiosis of Pigs. *Gastroenterology*, 98, 1129-1140.
- Behmer, O.A, Tolosa, E.M.C, Neto, A.G.F., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, São Paulo.
- Brown, H., Speer, V.C., Quinn, L.Y., Hays, V.M., Catron, D.V., 1961. Studies on colostrum-acquired immunity and active antibody production in baby pigs. *Journal of Animal Science*, 20, 323-328.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Taylor-Pickard, J.A., Pérez, J.F., Gasa, J., 2008. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *Journal of Animal Science*. 86, 1, 94-101.
- Che, T.M., Johnson, R.W., Kelley, K.W., Dawson, K.A., Moran, C.A., Pettigrew, J.E., 2011. Effects of mannan oligosaccharide on cytokine secretions by porcine alveolar macrophages and serum cytokine concentrations in nursery pigs. *Journal of Animal Science*. 90, 657-668.
- Corassa, A., Lopes, D.C., Bellaver, C., 2012. Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos e probióticos para leitões de 21 a 49 dias de idade. *Arquivo Zootecnia*, 61, 235, 467-476.
- Davis, M.E., Maxwell, C.V., Brown, D.C., Rodas, B.Z., Johnson, Z.B., Kegley, E.B., Hellwig, D.H., Dvorak, R.A., 2002. Effect of dietary mannan oligosaccharides and(or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 80, 2887-94.
- Dritz, S.S., Shi, J., Kielian, T.L., Goodband, R.D., Nelssen, J.L.; Tokach, M.D., Chengappa, M.M., Smith, J.E., Blecha, F., 1995. Influence of dietary β -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to streptococcus suis infection in weanling pigs. *Journal of Animal Science*. 73, 3341-3350.
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 44, 9, 1768-1771.
- Falcon, D.R., 2007. β -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração. Dissertation thesis - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura. In: <<http://hdl.handle.net/11449/100230>>. 146p.

- Fernández-Montero, Á., Torrecillas, S., Izquierdo, M., Caballero, M.J., Milne, D.J., Secombes, C.J., Sweetman, J., Silva, P., Acosta, F., Montero, D., 2018. Increased parasite resistance of greater amberjack (*Seriola dumerili* Risso 1810) juveniles fed a cMOS supplemented diet is associated with upregulation of a discrete set of immune genes in mucosal tissues. *Fish & Shellfish Immunology*. 86, 35-45.
- Hall, P.A., Ledenbach, L., Flowers, R.S., 2001. Acid-producing microorganisms. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th edition, Washington, American Public Health Association. 4, 201-207.
- Hayhoe, M., Archbold, T., Wang, Q., Yang, X., Fan, M., 2011. Efficacy of prebiotics on growth performance in replacing antibiotics in weanling pigs. *Canadian Journal of Animal Science*. 91, 481-482.
- Heo, J.M., Kim, J.C., Hansen, C.F., Mullan, B.P., Hampson, D.J., Pluske, J.R. 2009. Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Journal of Animal Science*. 87, 9, 2833-2843.
- Kiczorowska, B., Samolińska, W., Al-Yasiry, A.R.M., Kiczorowski, P., Winiarska-Mieczan, A., 2017. The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition – a review. *Annals of Animal Science*. 17, 605–625.
- Kim, J. D., Hyun, Y., Sohn, K., 2010. Effects of mannanoligosaccharide and protein levels on growth performance and immune status in pigs weaned at 21 d of age. *Korean Journal of Animal Science and Technology*. 42, 489–498.
- Lee, I.K., Kye, Y.C., Kim, G., Kim, H.W., Gu, M. J., Umboh, J., Maaruf, K., Kim, S.W., Yun, C.H., 2016. Stress, Nutrition, and Intestinal Immune Responses in Pigs — A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 29, 1075–1082.
- Lei, X.J., Kim, Y.M., Park, J.H., Baek, D.H., Nyachoti, C.M., Kim, I.H., 2018. Effects of levan-type fructan on growth performance, nutrient digestibility, diarrhoea scores, faecal shedding of total lactic acid bacteria and coliform bacteria, and faecal gas emission in weaning pigs. *Journal of the Science and Food Agriculture*. 98, 1539-1544.
- Mao, X. F.; Piao X. S.; Lai C. H., Li, D.F., Xing, J.J., Shi, B.L., 2005. Effects of beta-glucan obtained from the Chinese herb *Astragalus membranaceus* and lipopolysaccharide challenge on performance, immunological, adrenal, and somatotrophic responses of weanling pigs. *Journal of Animal Science*. 83, 2775-2782.
- Meek, R.W., Vyas, H., Piddock, L.J.V., 2015. Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use?. *PLOS Biology*. 13, 1-11.
- Miguel, J.C., Rodriguez-Zas, S.L., Pettigrew, J.E., 2004. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos®) for improving nursery pig performance. *Journal of Swine Health and Production*, 12, 296–307.
- Pluske, J.R.; Hampson, D.J.; Williams, I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*. 51, 215-236

Pluske, J.R.; Le Dividich, J.; Verstegen, M.W.A., 2003. Weaning the pig: Concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

Roberfroid, M.B., 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*. 137, 2493–2502.

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição de alimentos e exigências nutricionais. Imprensa Universitária/UFV, Viçosa.

Rozeboom, D.W., Shaw, D.T., Tempelman, R.J., Miguel, J.C., Pettigrew, J.E., Connolly, A., 2005. Effects of mannan oligosaccharide and an antimicrobial product in nursery diets on performance of pigs reared on three different farms. *Journal of Animal Science*. 83, 11, 2637–2644.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants, *Aquaculture*. 172, 63–92.

Sawai, J., Shoji, S., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., Shimizu, M., Kojima, H. 1998. Hydrongen Peroxide as an Antibacterial Factor in Zinc Oxide Powder Slurry. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86, 5, 521–522.

Schoenherr, W.D., Pollmann, D.S., Coalson, J.A., 1994. Titration of MacroGard-S on growth performance of nursery pigs. *Journal of Animal Science*. 72 (Suppl. 2), 57.

Schokker, D., Fledderus, J., Jansen, R., Vastenhouw, S.A., Bree, F.M., Smits, M.A., Jansman, A.A.J.M., 2018. Supplementation of fructooligosaccharides to suckling piglets affects intestinal microbiota colonization and immune development. *Journal of Animal Science*. Doi: 10.1093/jas/sky110.

Seifert, S.; Watzl, B., 2007. Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *Journal of Nutrition*. 137, 2563–2567.

Sethiya, N., 2016. Review on Natural Growth Promoters Available for Improving Gut Health of Poultry: An Alternative to Antibiotic Growth Promoters. *Asian Journal of Poultry Science*. 10, 1–29.

Silva, N., Junqueira, V.C.A, Silveira, N.S.A., 2001. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela.

Solidum, S.N., Sanares, C.R., Andrino-Felarca, K.G., Corre, V., 2016. Immune responses and resistance to vibriosis of juvenile Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* fed with high dose mannan oligosaccharide and β -glucan. *AACL Bioflux*. 9., 239–249.

Strube, M.L., Meyer, A.S., Boye, M., 2013. Mini review: basic physiology and factors influencing exogenous enzymes activity in the porcine gastrointestinal tract. *Animal Nutrition and Feed Technology*. 13, 441–459.

Torrecillas, S., Montero, D., Izquierdo, M., 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish & Shellfish Immunology*. 36, 525–544.

Tsukahara, T., Inoue, R., Shimojo, N., Nakayama, K., Saito, S., Sato, T., Itoh, T., Fujita, K., Ushida, K., 2009. Alpha-Linked Galactooligosaccharide Suppresses Small Intestinal Eosinophil Infiltration and Improves Growth Performance in Weaning Pigs. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 72, 547-553.

Vetvicka, V., 2011. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World Journal of Clinical Oncology*. 2, 115-119.

Wang, Y., Cho, J.H., Chen, Y.J., Yoo, J.S., Huang, Y., Kim, H.J., Kim, I.H., 2009. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. *Livestock Science*. 120, 35–42.

Wu, C., Xu, Q., Wang, R., Qin, L., Peng, X., Hu, L., Liu, Y., Fang, Z., Lin, Y., Xu, S., Feng, B., Li, J., Wu, D., Che, L. Effects of dietary β -glucan supplementation on growth performance, immunological and metabolic parameters of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Food & Function*, 2018. DOI: 10.1039/C7FO01980G.

Yang, Y., Torchinsky, M.B., Gobert, M., Xiong, H., Xu, M., Linehan, J. L., Alonzo, F., Ng, C., Chen, A., Lin, X., Sczesnak, A., Liao, J., Torres, V.J., Jenkins, M.K., Lafaille, J.J., Littman, D. R., 2014. Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature*. 510, 152–156.

Zhao, P.Y., Jung, J.H., Kim, I.H., 2012. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. *Journal of Animal Science*. 90, 833-839.

Zimmerman, J.J., Benfield, D.A., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Stevenson, G.W., Torremorell, M., 2012. Diseases of Swine: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arteri virus). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of swine*. 10th ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing, p. 461-486.

CAPÍTULO 3

O capítulo 3 intitulado “**Prebióticos promovem melhorias nos parâmetros hematológicos e imunológicos de leitões recém-desmamados**” foi escrito de acordo com as normas do Periódico “Animal Feed Science and Technology”.

Prebióticos promovem melhorias nos parâmetros hematológicos e imunológicos de leitões recém-desmamados

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar a inclusão dos prebióticos mananoligossacarídeo (MOS), β -glucano, frutoligossacarídeo (FOS) e galactoligossacarídeo (GOS) em substituição à antimicrobiano melhorador de desempenho, em dietas de leitões recém-desmamados, sobre variáveis hematológicas e imunológicas. Foram utilizados 40 leitões recém-desmamados (21 dias e $7,22 \pm 0,53$ kg) distribuídos em delineamento em blocos ao acaso, com cinco tratamentos e seis repetições (explosão respiratória) ou oito repetições (demais variáveis). Os tratamentos foram: CON = dieta basal (DB) + 120 ppm de halquinol; M β = DB + MOS e β -glucano (3,0 kg/t); F₉G₁ = DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 9:1); F₇G₃ = DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 7:3); F₅G₅ = DB + MOS e β -glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS 5:5). No 14º dia do experimento os leitões receberam injeção via intramuscular de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (O55:B5), e o sangue foi coletado nos momentos anterior à aplicação, três horas, 24 horas e 15 dias após aplicação de LPS. Antes do desafio os animais do grupo M β apresentaram maior ($P < 0,05$) produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), comparados aos do grupo CON, enquanto a produção de óxido nítrico (NO) foi maior ($P < 0,05$) nos animais dos tratamentos F₇G₃ e F₅G₅, comparados àqueles do tratamento CON. Os animais nos tratamentos M β , F₇G₃ e F₅G₅ reduziram ($P < 0,05$) a produção de NO após o desafio. Após o desafio com LPS ocorreu aumento ($P < 0,05$) na produção de proteína C-reativa (PC) nos animais dos grupos M β e F₉G₁, em comparação aos animais dos grupos F₇G₃ e F₅G₅, e no nível de TNF- α nos animais dos grupos F₉G₁ e F₅G₅, em comparação aos do grupo CON. Houve aumento ($P < 0,05$) na produção de PC nos leitões dos grupos CON, M β e F₉G₁, comparando os momentos antes e após aplicação. Conclui-se que leitões alimentados com dietas contendo prebióticos com maior concentração de FOS (F₉G₁) estão mais preparados para resposta imunológica inespecífica por ocasião de desafio imunológico.

Palavras-chave: aditivos, imunidade, saúde, suínos

Prebiotics lead to improvements on immunological and hematological parameters of weanling pigs

ABSTRACT: The aim of the study was to evaluate the inclusion of prebiotics mannanoligosaccharide (MOS), β -glucan, fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) in substitution of antimicrobial growth promoter, in diets of weanling pigs, on the hematological and immunological variables. It were used 40 weaned piglets (21 days and 7.22 ± 0.53 kg in average) distributed in a completely randomized block design with five treatments and six replicates (respiratory burst) or eight replicates (other variables). The treatments were composed: CON = basal diet (BD) + 120 ppm of halquinol; M β = BD + MOS and β -glucan (3.0 kg/t); F₉G₁ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS: GOS ratio 9:1); F₇G₃ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS: GOS ratio 7:3); F₅G₅ = BD + MOS and β -glucan (2.0 kg/t) + FOS and GOS (1.0 kg/t) (FOS:GOS ratio 5:5). On the 14th day of the experiment, the piglets received intramuscular injection of *E. coli* LPS (O55:B5), and the animals' blood was collected at the moments prior to immunization and three hours, 24 hours and 15 days after immunization. Prior to the immunization, animals from M β group showed higher ($P<0.05$) hydrogen peroxide (H₂O₂) production, compared to those from group CON, and the nitric oxide (NO) production was higher ($P<0.05$) in the animals from treatments F₇G₃ e F₅G₅, compared to those from CON treatment. Animals from the treatments M β , F₇G₃ e F₅G₅ reduced ($P<0.05$) NO production after challenge. After LPS challenge there was an increase ($P<0.05$) in the production of C-reactive protein (CP) in piglets fed with M β and F₉G₁, in comparison to the animals from F₇G₃ e F₅G₅ groups, and also in the level of TNF- α in the animals of F₉G₁ e F₅G₅ groups, compared to those of CON group. There was an increase ($P<0.05$) in CP production on piglets from CON, M β and F₉G₁ groups, comparing the moments before and after immunization. It is concluded that piglets fed prebiotics with higher concentration of FOS (F₉G₁) are better prepared for a nonspecific immune response during immunological challenge.

Keywords: additives, health, immunity, swine

1. Introdução

A crescente preocupação quanto ao surgimento de cepas bacterianas resistentes aos fármacos existentes, em função da utilização exacerbada de antimicrobianos especialmente como melhoradores de desempenho animal, tem resultado em restrições ou banimento do seu uso em alguns países (Meek et al., 2015). Este fato tem imposto a busca por substâncias capazes de substituir os antimicrobianos, principalmente compostos bioativos naturais, dentre os quais destacam-se os prebióticos, que servem como substrato às bactérias benéficas no intestino, promovendo melhorias à saúde e desempenho animal (Gaggia et al., 2010).

A capacidade de fermentação seletiva dos prebióticos por bactérias benéficas no trato gastrointestinal (TGI) do hospedeiro, com destaque para bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, resulta na produção de substâncias estimulatórias para o sistema imune, bem como de ácidos orgânicos, que reduzem o pH do meio e controlam indiretamente a proliferação de bactérias patogênicas (Roberfroid et al., 2010; Rastall e Gibson, 2015). Estudos com modelos animais e humanos têm demonstrado grande capacidade bifidogênica de substâncias prebióticas, com destaque para os galactoligossacarídeos (GOS), frutoligossacarídeos (FOS), frutanos e inulina (Gibson et al., 1995; Dewulf et al., 2012; Maathuis et al., 2012; Li e Kim et al., 2013; Ladirat et al., 2014; Lepczyński et al., 2015). Estes compostos possuem alta seletividade fermentativa por *Bifidobacterium* no TGI (Gibson et al., 1995; Ladirat et al., 2014), que produzem metabólitos estimulatórios ao epitélio intestinal, trazendo assim grandes benefícios à saúde do hospedeiro (Fukuda et al., 2011; Sagar et al., 2014).

Algumas substâncias prebióticas, como os mananoligossacarídeos (MOS) e os β -glucanos, possuem afinidade por sítios de ligação de células imunes inespecíficas, aumentando suas capacidades de reconhecer e eliminar patógenos, bem como de secretar citocinas pró e anti-inflamatórias e, conseqüentemente, de conter mais eficientemente a invasão microbiana e ativar cascatas de eventos que ativam os mecanismos da resposta imune adaptativa (Vetvicka, 2011; Torrecillas et al., 2014). Contudo, faltam estudos que avaliem os possíveis efeitos sinérgicos destas diferentes moléculas prebióticas sobre a saúde de leitões em fase crítica de pós-desmame.

Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão de misturas de diferentes compostos prebióticos (mananoligossacarídeo, β -glucano, frutoligossacarídeo e galactoligossacarídeo) sobre os parâmetros imunológicos e hematológicos de leitões recém-desmamados, desafiados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

2. Material e Métodos

2.1 Instalação experimental e animais

O experimento foi realizado na Unidade de Pesquisa da Área de Suinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Campus de Botucatu, SP, e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo número 133/2016). Os leitões foram alojados em baias suspensas, com piso anterior concretado e posterior ripado plástico, com área de 1,70m², equipadas com bebedouro tipo chupeta, comedouro tipo calha e campânulas com resistência elétrica.

2.2 Delineamento e dietas experimentais

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos, oito repetições e um animal por baia (unidade experimental), totalizando 40 leitões recém-desmamados com idade média de 21 dias ($7,22 \pm 0,53$ kg). O período experimental foi de 30 dias.

Os tratamentos foram: **CON**: dietas com adição de halquinol (clorohidroxiquinolina 60%) como melhorador de desempenho (120 ppm); **Mβ**: dietas com adição de MOS e β-glucano (3,0 kg/t); **F₉G₁**: dietas com adição de MOS e β-glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS de 9:1); **F₇G₃**: dietas com adição MOS e β-glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS de 7:3); **F₅G₅**: dietas com adição MOS e β-glucano (2,0 kg/t) + FOS e GOS (1,0 kg/t) (relação FOS:GOS de 5:5). Os níveis de inclusão dos aditivos testados nas dietas foram estabelecidos em experimentos anteriores do grupo de pesquisa (dados não publicados) e são apresentados na Tabela 3.

Adotou-se o programa de alimentação em fases, sendo: Fase 1 - dieta pré-inicial 1; Fase 2 - dieta pré-inicial 2 e Fase 3 - dieta inicial. As dietas de cada uma das fases foram isoenergéticas, isoproteicas, formuladas de modo a atender as exigências nutricionais mínimas dos animais, de acordo com Rostagno et al. (2011) e oferecidas à vontade (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais nas fases pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais

Ingredientes	Pré-inicial I	Pré-inicial II	Inicial
Milho, moído	52,240	57,842	56,884
Soja, farelo (45%)	19,000	22,000	29,000
Plasma sanguíneo	4,000	2,500	-
Soro de leite	7,500	2,500	-
Sacarose	4,000	4,000	4,000
Maltodextrina	2,000	-	-
Óleo de soja	2,900	3,000	2,500
Farelo de glúten de milho (60%)	2,500	2,500	1,500
Calcário calcítico	0,675	1,800	1,500
Fosfato bicálcico	1,900	0,770	1,500
Cloreto de sódio	0,280	0,450	0,830
L-Lisina HCl (78%)	0,700	0,610	0,510
DL-Metionina (99%)	0,250	0,190	0,405
L-Treonina (98%)	0,240	0,185	0,116
L-Triptofano (98%)	0,060	0,045	0,115
L-Isoleucina (99%)	0,135	0,060	0,020
L-Valina (99%)	0,175	0,110	0,015
Óxido de Zinco (73%)	0,340	0,200	0,200
Cloreto de colina (60%)	0,090	0,090	0,090
Adsorvente ¹	0,250	0,250	0,250
Antioxidante (BHT)	0,015	0,015	0,015
Mistura mineral ²	0,100	0,100	0,100
Mistura vitamínica ³	0,150	0,150	0,150
Inerte (caulim) ⁴	0,180	0,180	0,180
Clorohidroxiquinolina (60%) ⁵	0,020	0,020	0,020
Prebióticos ⁶	0,300	0,300	0,300
TOTAL	100,000	100,000	100,000

¹Adsorvente NOTOX®; ²Premix mineral fornecendo por kg de ração: 100mg Fe, 10mg Cu, 0,45mg Se, 40mg Mn, 80mg Zn, 1mg Co, 1,5mg I, 79,70mg S, 0,30mg Mg; ³Premix vitamínico fornecendo por kg de ração: 9000 UI vit. A, 2700 UI vit. D3, 48 UI vit. E, 2,5mg vit. K, 2,03mg vit. B1, 6mg vit. B2, 3mg vit. B6, 30mg vit. B12, 0,9mg ácido fólico, 14,03mg ácido pantotênico, 30mg niacina, 0,12mg biotina; ⁴Inerte caulim somente utilizado nas dietas experimentais CON; ⁵Melhorador de desempenho halquinol (clorohidroxiquinolina 60%) somente utilizado nas dietas experimentais CON; ⁶Nas dietas experimentais Mβ, F₉G₁, F₇G₃, F₅G₅ foram incluídos, respectivamente: 0,30% de MOS+β-glucano; 0,20% de MOS+β-glucano, 0,09% de FOS e 0,01% de GOS; 0,20% de MOS+β-glucano, 0,07% de FOS e 0,03% de GOS; 0,20% de MOS+β-glucano, 0,05% de FOS e 0,05% de GOS.

Tabela 2. Valores nutricionais calculados para as fases pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais¹

Nutrientes	Pré-inicial I	Pré-Inicial II	Inicial
Energia metabolizável, Kcal/kg	3400	3375	3303
Proteína bruta, %	20,00	21,00	19,18
Cálcio, %	0,85	0,83	0,77
Fósforo disponível, %	0,50	0,45	0,40
Lisina digestível, %	1,45	1,33	1,17
Metionina digestível, %	0,41	0,37	0,33
Metionina + Cistina digestível, %	0,81	0,75	0,65
Treonina digestível, %	0,91	0,84	0,74
Triptofano digestível, %	0,26	0,24	0,21
Valina digestível, %	1,00	0,92	0,81
Isoleucina digestível, %	0,80	0,73	0,64
Leucina digestível, %	1,45	1,33	1,17

¹Valores nutricionais dos ingredientes propostos por Rostagno et al. (2011).

Tabela 3. Níveis de inclusão (%) de mananoligossacarídeo (MOS), β -glucano, frutoligossacarídeo (FOS), galactoligossacarídeo (GOS), e do antimicrobiano melhorador de desempenho nas dietas experimentais de leitões recém-desmamados

	Dietas experimentais, %				
	COM	M β	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
MOS + β -glucano	-	0,30	0,20	0,20	0,20
FOS	-	-	0,09	0,07	0,05
GOS	-	-	0,01	0,03	0,05
Halquinol (Clorohidroquinolina 60%)	0,02	-	-	-	-

2.3 Desafio imunológico e coletas de sangue

Todos os animais receberam injeção intramuscular de 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) (dose estabelecida em experimento prévio do próprio grupo de pesquisa – dados não publicados) da parede celular de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (SIGMA ALDRICH L2630, St. Louis, MO), dissolvidos em 1 mL de solução salina no 14º dia do período experimental (35 dias de idade média dos leitões). Neste procedimento foram utilizadas agulhas de 0,55 x 20 mm (24 G x 3/4”) acopladas às seringas de 1 mL.

As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia cava usando agulhas siliconizadas para coleta de sangue pelo sistema a vácuo de 25 x 8 mm (21 G x 1”), seguindo o seguinte protocolo: primeira coleta no momento anterior à aplicação da solução de LPS para quantificação dos parâmetros basais de todas as variáveis analisadas; segunda coleta três horas após o desafio com LPS para análises de hemograma completo, explosão respiratória e citocinas; terceira coleta 24 horas após o desafio com LPS para análise de proteínas de fase aguda (haptoglobina, albumina, globulinas e proteína C-reativa); quarta coleta 15 dias após o

desafio com LPS (30º dia experimental) para quantificação de imunoglobulinas séricas (IgA, IgM e IgG), utilizando-se os mesmos animais em todas as coletas.

2.4 Variáveis analisadas

2.4.1 Hemograma completo e citocinas

Para determinação dos parâmetros hematimétricos e leucométricos, coletou-se sangue dos animais utilizando-se tubos para coleta a vácuo de 4 mL contendo anticoagulante EDTA. A série hematimétrica e leucométrica global foi obtida com auxílio de um contador veterinário automático de células MC-6200 Vet (Shenzhen Maxcom Electronic, China), sendo a confirmação da leucometria específica realizada pela técnica de esfregaço sanguíneo por coloração diferencial pelo método panótico, segundo Dacie e Lewis (1995). A fórmula leucocitária absoluta foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias, por uma regra de três direta.

Para a quantificação de citocinas (IL-1 β e TNF- α), foram utilizados tubos para coleta a vácuo de 4 mL contendo ativador de coágulo, para posterior centrifugação e aquisição do soro. O soro obtido foi imediatamente conservado em freezer -80°C para posterior análise. A quantificação foi feita pelo teste de ELISA (*Enzyme Liked Immunosorbent Assay*), de acordo com o protocolo do fabricante do kit utilizado para cada citocina (Cloud-Clone Corp®).

2.4.2 Quantificação de proteínas de fase aguda

Para quantificação de proteínas de fase aguda, coletou-se sangue dos animais utilizando-se tubos para coleta a vácuo de 4 mL contendo ativador de coágulo. Posteriormente, o sangue foi centrifugado e o soro foi armazenado a -80°C para análises posteriores. A quantificação de haptoglobina foi realizada através de fracionamento das proteínas séricas no soro dos animais, para posterior diferenciação do peso molecular da haptoglobina, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio, proposta por Laemmli (1970), utilizando-se do sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI VERTICALELECTROPHORESIS CELLS® - BIO-RAD). Para identificação dos pesos moleculares foi utilizado marcador de peso molecular (SIGMA MARKER™, wide range 6,5 a 200 KDa, Sigma-Aldrich Biotechnology LP), e as concentrações da fração proteica de haptoglobina foram determinadas por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-9301, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão).

Para a quantificação da proteína C-reativa foi adotado o método imunoturbidimétrico, utilizando o kit comercial da Bioclin® para proteína C-reativa. Para a quantificação de proteínas totais foi utilizado o método do biureto e de albuminas o método espectrofotométrico do verde de bromocresol, segundo procedimentos analíticos descritos pela AOAC (1995). O teor de globulinas foi estimado pela diferença entre os resultados das frações de proteínas totais e de albuminas.

2.4.3 Imunoglobulinas

A quantificação de imunoglobulinas séricas foi realizada por nefelometria, de acordo com reação de precipitação, segundo procedimentos analíticos descritos pela AOAC (1995).

2.4.4 Explosão Respiratória

A explosão respiratória foi mensurada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) de acordo com Secombes (1990), com modificações. Coletou-se sangue de seis animais por tratamento, escolhidos aleatoriamente, antes e três horas após o desafio imunológico com LPS. Para a coleta de sangue, utilizou-se tubos de coleta a vácuo de 4 mL contendo anticoagulante EDTA. Imediatamente após a coleta, o sangue foi transferido para tubos Falcon de 15 mL contendo 7 mL de meio de cultura RPMI à 2% (RPMI 1640 médio suplementado com 0,3 g/L de glutamina, misturado na proporção de 2% de soro fetal bovino) e homogeneizado. Em outro tubo Falcon de 15 mL, pipetaram-se 3 mL de Percoll 51%. O sangue foi transferido lentamente para o tubo contendo Percoll e centrifugado à 1400 RPM por 20 minutos à 10°C. Posteriormente, o gradiente de leucócitos foi coletado com pipeta Pasteur, inserido em novo tubo Falcon, sendo as células ressuspensas em meio de cultura RPMI à 2%, sendo o conteúdo posteriormente homogeneizado. Em seguida, centrifugou-se à 1000 RPM por 10 minutos à 10°C. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e recuperou-se a camada de células em meio de cultura RPMI à 2% novamente, sendo os tubos posteriormente mantidos em estufa à 37°C por 10 minutos. Deste conteúdo, pipetou-se 50 µL em tubos de vidro previamente autoclavados e inseriu-se 450µL de corante Rosenfeld para corar os leucócitos. Pipetou-se o conteúdo em câmaras de NewBauer para contagem de monócitos, ajustando-se a concentração de células para $2,0 \times 10^6$ células/mL. Aliquotas de 100 µL desta suspensão foram distribuídas nos poços das placas de microcultura, os quais foram completados com meio de cultura RPMI à 0,1% sendo as placas posteriormente incubadas em estufa à 37°C por 2 horas. As placas foram lavadas com meio

RPMI para retirada de células não aderidas. Incubou-se novamente as placas com meio RPMI à 2% overnight em estufa à 37°C.

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por monócitos sanguíneos foi determinada por técnica de oxidação de phenol red (Pick e Keisari, 1980). Após incubação das culturas de células por 24 horas, coletou-se o sobrenadante dos poços das placas para posterior quantificação de produção de óxido nítrico (NO), sendo a camada de células aderidas aos poços da placas utilizada para a determinação de produção de H_2O_2 . Nos poços com as monocamadas de células aderidas, adicionou-se 100 μ L de solução tampão, realizando-se posteriormente a leitura em Elisa automático com filtro de 620 nm. Os resultados foram expressos em nmol de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células.

A produção de NO por monócitos sanguíneos foi determinada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess (Green et al., 1981), adicionando-se ao sobrenadante das amostras previamente incubadas 100 μ L de reagente de Griess (0,1% de reagente Need e 1% de sulfonilamida em 5% de solução H_3PO_4). As leituras foram realizadas em leitor automático Elisa com filtro de 540 nm. Os resultados foram expressos em μ mol de NO/ 2×10^5 células.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análises de variância multivariada para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparação de médias múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$). Para as variáveis plaquetas, eosinófilos e monócitos não houve normalidade dos dados, assim, foram apresentadas as medianas (Tabelas 4 e 5), e aplicada análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparação de médias múltiplas de Dunn ($P < 0,05$).

3. Resultados

A contagem de eritrócitos, após o desafio com LPS, foi menor ($P < 0,05$) para os animais que receberam as dietas F_9G_1 comparada à dos animais do grupo $M\beta$, não diferindo ($P > 0,05$) dos leitões dos demais tratamentos (Tabela 4). Antes do desafio imunológico com LPS, os animais dos tratamentos CON e F_7G_3 apresentaram maior ($P < 0,05$) amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) em relação aos animais dos demais tratamentos, porém, não diferiram entre si, enquanto o valor dessa variável foi maior ($P < 0,05$) nos leitões do tratamento $M\beta$, intermediário ($P < 0,05$) nos animais do tratamento F_9G_1 e menor ($P < 0,05$)

naqueles do tratamento F₅G₅. Após o desafio imunológico, os leitões dos grupos CON, M β e F₇G₃ apresentaram maior RDW em relação aos animais dos grupos F₉G₁ e F₅G₅ (P<0,05), e os animais do grupo F₇G₃ apresentaram maior RDW que aqueles do grupo M β (P<0,05), que não diferiu (P>0,05) dos animais do grupo CON (Tabela 4). Comparando os momentos de desafio com LPS, houve redução (P<0,05) na contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito e aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) nos animais que receberam o tratamento F₉G₁, e para contagem de plaquetas a redução (P<0,05) ocorreu nos animais dos grupos F₉G₁, F₇G₃ e F₅G₅ após o desafio (Tabela 4).

Tabela 4. Eritrograma e plaquetas dos leitões antes e três horas após o desafio com LPS

Variáveis	Momentos	CON	M β	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
Eritrócitos, 10 ⁶ /mm ³	Antes	6,249	6,323	6,073 [*]	6,329	6,174
	Após	5,926 ^{ab}	6,236 ^a	5,648 ^{b*}	5,964 ^{ab}	5,801 ^{ab}
Hemoglobina, g/dL	Antes	9,700	10,087	10,038 [*]	9,900	9,938
	Após	9,550	9,813	9,175 [*]	9,550	9,537
Hematócrito, %	Antes	31,875	33,250	33,250 [*]	32,625	32,750
	Após	31,375	32,125	29,750 [*]	31,125	30,875
VCM ¹ , fL	Antes	51,600	52,613	54,738	51,500	56,900
	Após	52,975	51,575	53,025	52,075	53,350
CHCM ² , %	Antes	30,287	30,262	30,250 [*]	30,325	30,150
	Após	30,400	30,525	30,875 [*]	30,625	30,725
RDW ³ , %	Antes	21,975 ^a	20,913 ^b	19,600 ^c	22,237 ^a	18,738 ^d
	Após	21,525 ^{ab}	20,775 ^b	19,300 ^c	21,738 ^a	18,613 ^c
Plaquetas, 10 ³ /mm ³	Antes	649,500	605,500	693,000 [*]	668,500 [*]	602,500 [*]
	Após	436,500	384,000	418,000 [*]	362,000 [*]	371,000 [*]

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Bonferroni (P>0,05).

Médias seguidas por *, na coluna, diferem entre os momentos antes e após desafio com LPS pelo teste de Bonferroni (P<0,05).

¹VCM = Volume corpuscular médio; ²CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média; ³RDW = Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos.

Quanto ao leucograma, antes do desafio com LPS, os leitões que receberam o tratamento F₅G₅ apresentaram menor (P<0,05) contagem de segmentados comparada com os leitões do grupo CON, não diferindo (P>0,05) dos leitões dos demais tratamentos. Todas as variáveis do leucograma foram reduzidas (P<0,05), após o desafio, para todos os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Leucograma dos leitões antes e três horas após o desafio com LPS

Variáveis, 10 ³ /mm ³	Momentos	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
Leucócitos	Antes	24,275 [*]	21,313 [*]	23,225 [*]	20,650 [*]	23,787 [*]
	Após	4,613 [*]	4,812 [*]	5,150 [*]	5,150 [*]	3,888 [*]
Segmentados	Antes	12,908 ^{a*}	10,104 ^{ab*}	10,096 ^{ab*}	8,380 ^{ab*}	7,942 ^{b*}
	Após	2,350 [*]	2,308 [*]	2,038 [*]	2,377 [*]	1,202 [*]
Linfócitos	Antes	10,047 [*]	10,109 [*]	11,530 [*]	11,114 [*]	13,221 [*]
	Após	2,208 [*]	2,425 [*]	3,020 [*]	2,676 [*]	2,656 [*]
Eosinófilos	Antes	0,107 [*]	0,233 [*]	0,297 [*]	0,179 [*]	0,354 [*]
	Após	0,012 [*]	0,030 [*]	0,018 [*]	0,000 [*]	0,000 [*]
Monócitos	Antes	0,948 [*]	0,784 [*]	1,125 [*]	0,816 [*]	0,734 [*]
	Após	0,012 [*]	0,000 [*]	0,015 [*]	0,061 [*]	0,000 [*]

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Bonferroni (P>0,05).

Médias seguidas por *, na coluna, diferem entre os momentos antes e após desafio com LPS pelo teste de Bonferroni (P<0,05).

Com relação à explosão respiratória, antes do desafio com LPS, os monócitos dos animais do grupo Mβ apresentaram maior (P<0,05) produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) comparada aos animais que receberam CON, não diferindo (P>0,05) dos demais tratamentos. Antes do desafio, os monócitos dos animais dos grupos F₇G₃ e F₅G₅ apresentaram maior (P<0,05) produção de óxido nítrico (NO) comparada aos animais do grupo CON, não diferindo (P>0,05) dos leitões dos demais tratamentos. Após a aplicação de LPS, ocorreu aumento (P<0,05) na produção de H₂O₂ nos leitões do grupo F₉G₁, enquanto a produção de NO diminuiu (P<0,05) nos animais dos grupos Mβ, F₇G₃ e F₅G₅, comparado com o momento anterior à aplicação (Tabela 6).

Tabela 6. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO) no sangue periférico dos leitões antes e três horas após o desafio com LPS

Variáveis	Momentos	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
H ₂ O ₂ ¹ , nmol	Antes	0,999 ^b	2,733 ^a	1,523 ^{ab*}	1,769 ^{ab}	1,933 ^{ab}
	Após	1,577	2,068	2,672 [*]	1,892	2,151
NO ² , μmol	Antes	12,917 ^b	24,291 ^{ab*}	19,639 ^{ab}	29,646 ^{a*}	27,685 ^{a*}
	Após	10,033	10,885 [*]	15,697	18,488 [*]	12,163 [*]

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Bonferroni (P>0,05).

Médias seguidas por *, na coluna, diferem entre os momentos antes e após desafio com LPS pelo teste de Bonferroni (P<0,05).

¹H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio; ²NO = Óxido nítrico.

Para as citocinas, após o desafio com LPS, os animais do grupo CON apresentaram menor (P<0,05) quantificação de fator de necrose tumoral-α (TNF-α) comparada à dos animais dos grupos F₉G₁ e F₅G₅, que não diferiram (P>0,05) dos animais dos grupos Mβ e F₇G₃. Com relação aos momentos avaliados, houve aumento (P<0,05) nas concentrações de IL1-β e de TNF-α após o desafio com LPS para todos os tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7. Citocinas séricas antes e três horas após o desafio com LPS

Variáveis, pg/ml	Momentos	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
IL1-β ¹	Antes	<1,56*	<1,56*	<1,56*	<1,56*	<1,56*
	Após	3,86*	4,40*	9,70*	6,03*	3,70*
TNF-α ²	Antes	<15,6*	<15,6*	<15,6*	<15,6*	<15,6*
	Após	43,10 ^a *	64,33 ^{ab} *	86,83 ^{bc} *	64,05 ^{ab} *	103,53 ^c *

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Bonferroni (P>0,05).

Médias seguidas por *, na coluna, diferem entre os momentos antes e após desafio com LPS pelo teste de Bonferroni (P<0,05).

¹IL1-β = Interleucina 1-β; ²TNF-α = Fator de necrose tumoral-α.

Não houve efeito dos tratamentos (P>0,05) em nenhuma das classes de imunoglobulinas avaliadas, entretanto ocorreu aumento (P<0,05) nas concentrações de IgA, IgM e IgG após o desafio nos leitões de todos os tratamentos, comparando com o momento anterior ao desafio (Tabela 8).

Tabela 8. Imunoglobulinas séricas dos leitões antes e 15 dias após o desafio com LPS

Variáveis, mg/dl	Momentos	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
IgA ¹	Antes	7,50*	7,75*	7,88*	7,56*	7,69*
	Após	11,13*	11,94*	11,31*	12,25*	10,38*
IgM ²	Antes	36,38*	41,63*	37,13*	39,88*	40,75*
	Após	45,50*	53,50*	45,13*	51,50*	53,00*
IgG ³	Antes	232,75*	245,50*	242,25*	269,38*	247,38*
	Após	275,38*	298,50*	293,63*	284,75*	313,38*

Médias seguidas por *, na coluna, diferem entre os momentos antes e após desafio com LPS pelo teste de Bonferroni (P<0,05).

¹IgA = Imunoglobulina isotipo A; ²IgM = Imunoglobulina isotipo M; ³IgG = Imunoglobulina isotipo G.

Após o desafio, os animais dos tratamentos Mβ e F₉G₁ apresentaram maior (P<0,05) quantificação de proteína C-reativa (PC), em comparação aos animais dos tratamentos F₇G₃ e F₅G₅, não diferindo (P>0,05) dos animais do grupo CON (Tabela 9). Com relação à haptoglobina, não houve efeito de tratamentos (P>0,05) e ocorreu aumento (P<0,05) na sua concentração após o desafio com LPS, comparado com os valores verificados antes do desafio. Entre os momentos de desafio, houve aumento (P<0,05) na concentração da proteína C-reativa (PC) após o desafio com LPS para os animais dos grupos CON, Mβ e F₉G₁ (Tabela 9).

Tabela 9. Proteína C-reativa e haptoglobina séricas dos leitões antes e 24 horas após o desafio com LPS

Variáveis	Momentos	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
PC ¹ , mg/dl	Antes	0,10*	0,10*	0,05*	0,00	0,10
	Após	0,42 ^{ab} *	0,50 ^a *	0,49 ^a *	0,32 ^b	0,28 ^b
Haptoglobina, g/dl	Antes	0,137*	0,101*	0,130*	0,098*	0,136*
	Após	0,260*	0,225*	0,261*	0,234*	0,260*

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($P > 0,05$).

Médias seguidas por *, na coluna, diferem entre os momentos antes e após desafio com LPS pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$).

¹PC = Proteína C-reativa.

Não houve efeito de tratamento ($P > 0,05$) para os teores de proteínas totais (PT), albumina (A), globulinas (G) e relação A/G. Entre os momentos de desafio, para as variáveis PT e A, independente do tratamento, os valores foram reduzidos ($P < 0,05$) após o desafio. Houve redução ($P < 0,05$) da concentração de G após desafio com LPS nos animais dos tratamentos Mβ e F₉G₁, e redução ($P < 0,05$) na relação A/G após o desafio com LPS nos animais dos grupos CON, F₇G₃ e F₅G₅ (Tabela 10).

Tabela 10. Proteínas totais, albumina, globulinas e relação albumina:globulina do soro dos leitões antes e 24 horas após o desafio com LPS

Variáveis	Momentos	CON	Mβ	F ₉ G ₁	F ₇ G ₃	F ₅ G ₅
PT ¹ , g/dl	Antes	4,81*	4,60*	4,80*	4,76*	4,85*
	Após	4,26*	4,05*	4,08*	4,18*	4,28*
Albumina, g/dl	Antes	3,10*	2,81*	2,94*	3,00*	3,05*
	Após	2,61*	2,38*	2,46*	2,53*	2,45*
Globulinas, g/dl	Antes	1,71	1,84*	1,84*	1,76	1,81
	Após	1,65	1,65*	1,61*	1,71	1,83
Alb/Glob ²	Antes	1,82*	1,54	1,66	1,71*	1,69*
	Após	1,60*	1,45	1,54	1,49*	1,35*

Médias seguidas por *, na coluna, diferem entre os momentos antes e após desafio com LPS pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$).

¹PT = proteínas totais; ²Alb/Glob = relação albumina:globulinas.

4. Discussão

4.1 Hemograma e leucograma

Apesar de verificadas variações em parâmetros hematimétricos e leucométricos em função dos tratamentos, os valores observados neste estudo se mantiveram dentro de limites fisiológicos considerados normais para a espécie suína segundo Miller et al. (1961), Tumbleson et al. (1986), Friendship e Henry (1992), Jain (1996), Kaneko et al. (1997), Feldman et al. (2000) e Tizard (2014).

Faltam estudos que abranjam os efeitos de diferentes prebióticos e doses dos mesmos sobre as variáveis hematológicas de suínos. Apesar da redução significativa pós-desafio na

quantificação de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito para os animais do tratamento F₉G₁, os animais deste mesmo tratamento apresentaram também aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), indicando que não houve prejuízo à concentração hemoglobínica celular, e por consequência, manteve-se a efetividade fisiológica das mesmas (Failace e Fernandes, 2015). Ainda, após o desafio, a redução na amplitude de distribuição de glóbulos vermelhos (RDW) para os animais do tratamento F₉G₁ e F₅G₅ demonstra que os animais destes tratamentos apresentaram maior homogeneidade no tamanho de eritrócitos, inferindo-se que a eritropoiese e maturação destas células se mantiveram dentro da normalidade (Failace e Fernandes, 2015).

Os efeitos do desafio com LPS tornam-se evidentes pelos resultados do leucograma, pois houve redução de leucócitos e de suas frações para todos os tratamentos após o desafio, sugerindo a migração dessas células para o tecido lesionado.

No período anterior ao desafio com LPS, a maior quantificação de segmentados (neutrófilos maduros) para os animais do grupo CON em relação aos animais do tratamento F₅G₅, e também de maneira geral (não significativa), indica que o uso de prebióticos pode ser benéfico, uma vez que o uso de antimicrobianos reduz a taxa de renovação de neutrófilos maduros no sangue, podendo, talvez, reduzir a atividade antimicrobiana deste tipo celular (Healy et al., 2002).

4.2 Explosão respiratória

No período anterior ao desafio, os monócitos dos animais do tratamento M β apresentaram maior produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) comparada à dos animais alimentados com dietas contendo antimicrobiano (CON). As dietas do tratamento M β apresentavam maior quantidade de mananoligossacarídeo e β -glucano (0,30% da mistura de MOS e β -glucano), e sendo o β -glucano uma molécula imunoestimulante, é diretamente capaz de ativar fagócitos através da interação destas moléculas com receptores específicos celulares (Baert et al., 2015), estimulando a atividade antimicrobiana (Sahoo et al., 2001; Rice et al., 2004; Vetvicka, 2011; Madrigal-Bujaidar et al., 2015). Os mananoligossacarídeos também interagem com o sistema imunológico do animal, podendo melhorar as respostas imunes inatas e adaptativas (Wismar et al., 2010; Che et al., 2011).

A produção de óxido nítrico (NO), no período anterior ao desafio, foi menor para os animais do grupo CON, comparada à dos animais dos tratamentos F₇G₃ e F₅G₅. Esta menor atividade antimicrobiana monocitária observada pelos animais alimentados com o antimicrobiano halquinol (CON), aliada à maior quantificação de neutrófilos maduros

(segmentados) (Tabela 5), sugere que o uso contínuo deste antimicrobiano, da classe das quinolonas, pode ser danoso às células, por induzir estresse oxidativo mitocondrial (Kalghatgi et al., 2013). Além disso, o uso exacerbado deste composto pode reduzir a população bacteriana benéfica da microbiota intestinal, induzindo imunossupressão indireta e maior demanda por produção e maturação de leucócitos (Kalghatgi et al., 2013; Becattini et al., 2016).

Por sua vez, no período pós-desafio, maior reatividade dos monócitos foi observada com utilização da combinação de prebióticos na proporção do tratamento F₉G₁ (0,20% de MOS e β -glucano; 0,09% de FOS e 0,01% de GOS), a qual induziu maior produção de H₂O₂. Ainda, após o desafio, somente os animais dos tratamentos CON e F₉G₁ mantiveram a produção de NO, sendo assim mais eficientes em manter a produção desta espécie reativa de nitrogênio em resposta à inflamação aguda causada pelo LPS.

Avaliando os resultados de explosão respiratória, pode-se inferir que os animais do grupo F₉G₁ foram mais eficientes no sentido de manter a reatividade imunológica inespecífica após o desafio com LPS, em comparação aos animais que receberam os demais tratamentos. A literatura têm demonstrado que o uso de FOS em dietas de suínos possui grande ação bifidogênica (Xu et al., 2002; Zhao et al., 2012; Lei et al., 2018; Schokker et al., 2018), selecionando cepas bacterianas comensais benéficas do intestino, que geram metabólitos que reduzem a população de cepas maléficas, e ainda estimulam o sistema imune local entérico, gerando uma cascata e eventos que promovem maior efetividade imunológica inespecífica e adaptativa (Seifert e Watzl, 2007).

4.3 Citocinas e imunoglobulinas

Os animais alimentados com as dietas F₉G₁ e F₅G₅ apresentaram maior secreção de TNF- α após o desafio com LPS, em relação aos leitões que receberam dieta com antimicrobiano (CON). Desta forma, a combinação de prebióticos nas concentrações específicas destes tratamentos foi eficaz em ativar as vias de sinalização para secreção desta citocina pelas células sentinelas adjacentes à inflamação causada pelo LPS, as quais incluem macrófagos e neutrófilos estimulados (Grivennikov et al., 2010). De forma semelhante, estudo de Li e Kim (2013) demonstrou aumento na concentração de TNF- α 2h após desafio com LPS, em leitões alimentados com prebiótico frutano.

O TNF- α é um potente regulador da inflamação, estimulando diversos tipos celulares envolvidos na imunidade inata e adaptativa (Blaser et al., 2016). Entretanto, produção exacerbada desta citocina pró-inflamatória pode ser danosa ao organismo por prolongar e

acentuar desnecessariamente a inflamação, desviando nutrientes em prejuízo à produção animal e ocasionando prejuízos aos tecidos acometidos (Tizard et al., 2014). Este efeito deletério pode ter ocorrido com os animais do grupo F₅G₅, os quais produziram maiores quantidades de TNF- α , porém sem melhorias sobre as demais variáveis imunológicas.

Correlacionando os resultados de explosão respiratória com os de quantificação de TNF- α , sabe-se que há íntima relação entre as espécies reativas de oxigênio, como o H₂O₂, e espécies reativas de nitrogênio, como o NO, na regulação da expressão de receptores de TNF- α em células sentinelas, e assim, de seus efeitos fisiológicos (Blaser et al., 2016). De forma interessante, observou-se neste estudo que os animais alimentados com antimicrobiano (CON) apresentaram menores produções de H₂O₂ e ON, e de forma similar, menor produção de TNF- α , indicando possível regulação negativa na produção de TNF- α . Os animais dos grupos M β , F₉G₁ e F₇G₃ apresentaram produções intermediárias de H₂O₂ e NO, e concomitante produção intermediária de TNF- α .

Neste estudo, após o desafio com LPS, houve aumento da secreção de IL-1 β pelos animais de todos os tratamentos, comparando ao período anterior ao desafio. Dentre as funções desta citocina, citam-se principalmente o estímulo à produção de proteínas de fase aguda e ativação de linfócitos, principalmente T auxiliares-2 (Th-2), os quais estimulam linfócitos B a produzirem anticorpos (Tizard, 2014). A influência desta citocina gerou aumento na secreção das imunoglobulinas, não resultando em diferenças entre suas concentrações para os tratamentos. Os valores encontrados para as frações de imunoglobulinas neste estudo estão de acordo com Saleh et al. (2015).

4.4 Proteínas de fase aguda e proteínas séricas

Sob a influência das citocinas pró-inflamatórias, as células hepáticas aumentam a síntese e secreção de proteínas de fase aguda (PFA), com picos entre 24 e 48h e posterior declínio, sendo que as mais abundantes e importantes em suínos são a proteína C-reativa (PC) e haptoglobina (Heegaard et al., 1998, Lampreave et al., 1994). Neste estudo, os valores de haptoglobina foram significativamente aumentados após o desafio com LPS, independente dos aditivos recebidos pelos animais, provando a eficiência do desafio imposto. A haptoglobina possui função de ligar-se à hemoglobina livre, liberada pela destruição intravascular das hemácias, conservando o ferro corpóreo e prevenindo sua utilização na multiplicação bacteriana (Gutteridge, 1987).

Por sua vez, comparando os momentos de desafio, houve aumento significativo da PC após a aplicação de LPS, para os animais dos grupos CON, M β e F₉G₁. O aumento desta

importante proteína de fase aguda frente à uma infecção é benéfica ao animal, uma vez que a PC possui atividades “pró-inflamatórias” e “anti-inflamatórias”, regulando eficientemente a inflamação, induzindo-a ou reprimindo-a, dependendo das situações fisiológicas (Szalai et al., 2002; Black et al., 2004). Os valores encontrados para PC e haptoglobina neste estudo estão de acordo com Saleh et al. (2015) e Feldman et al. (2000), respectivamente.

Algumas proteínas diminuem seus níveis durante a inflamação aguda, sendo denominadas de proteínas de fase aguda negativa. Em suínos, incluem a albumina, α -lipoproteína, fetuína e a transferrina (Alava et al., 1997). Observou-se que os níveis de proteínas totais e albumina foram reduzidos após o desafio com LPS, indicando mobilização proteica para a formação de citocinas, proteínas de fase aguda e imunoglobulinas. Os resultados encontrados para proteínas séricas podem ser considerados dentro da normalidade da espécie e categoria suína (Feldman et al., 2000; Tizard, 2014). A redução nos teores de globulinas séricas após o desafio para os animais dos tratamentos M β e F₉G₁ pode ser decorrente da maior utilização de aminoácidos da dieta para a síntese de citocinas e PFA, em razão do quadro de inflamação aguda desencadeado pela aplicação de LPS (Wilson e Svendsen, 1972; Spurlock et al., 1997).

De forma interessante, mesmo após mobilização aminoacídica para produção de componentes proteicos como citocinas, PFA e imunoglobulinas, os animais submetidos ao tratamento F₉G₁ foram mais eficientes na resposta imunológica inespecífica ao LPS, e, analisando estes resultados em conjunto com os resultados de desempenho (dados no Capítulo 2) conclui-se que esta mobilização de nutrientes foi eficiente e não afetou o crescimento dos animais.

De forma geral, este estudo trouxe resultados interessantes de possível sinergismo das moléculas prebióticas avaliadas, com destaque para a combinação do tratamento F₉G₁ (0,20% de MOS e β -glucano; 0,09% de FOS e 0,01% de GOS), o que promoveu maiores benefícios sobre a saúde dos animais; de forma semelhante ou até melhorada em comparação ao uso do antimicrobiano halquinol. A literatura têm demonstrado que o consumo de FOS, inulina e frutanos promove notórias melhorias sobre a saúde intestinal de humanos e animais, especialmente em indivíduos jovens, beneficiando a saúde e prevenindo contra doenças (Seifert e Watzl, 2007). Os mecanismos que desencadeiam estas respostas benéficas incluem efeitos indiretos, como modulação benéfica da microbiota intestinal, produção aumentada de AGCCs e imunorreguladores e, talvez, de outros metabólitos bacterianos (Gibson et al., 2010; Fransen et al., 2017). Contudo, outros estudos que avaliem os efeitos fisiológicos do sinergismo de moléculas prebióticas são necessários, a fim de se determinar doses e misturas

ótimas de cada molécula, as quais promovam benefícios sobre a saúde dos animais, reduzindo assim, a necessidade de utilização de antimicrobianos de forma exacerbada.

De forma geral, os resultados deste estudo demonstraram que os animais alimentados com dietas contendo maior quantidade de FOS (F₉G₁) apresentaram maior efetividade na resposta imune frente ao desafio causado pela endotoxina LPS, possibilitando o uso desta combinação em substituição ao antimicrobiano halquinol, visando melhorias na saúde de leitões em período pós-desmame.

Referências

- Alava, M.A., González-Ramón, N., Heegaard, P., Guzylack, S., Toussaint, M.J.M., Lipperheide, C., Madec, F., Gruys, E., Eckersall, P.D., Lampreave, F., Piñeiro, A., 1997. Pig-MAP, porcine acute phase proteins and standardisation of assays in Europe. *Comparative Haematology International*. 7, 208–213.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1995. Official methods of the Association of the Agricultural Chemists. sixteenth ed. Washington, DC.
- Baert, K., Sonck, E., Goddeeris, B.M., Devriendt, B., Cox, E., 2015. Cell type-specific differences in β -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Developmental & Comparative Immunology*. 48, 192-203.
- Becattini, S., Taur, Y., Pamer, E.G., 2016. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 22, 458-478.
- Black, S., Kushner, I., Samols, D., 2004. C-reactive protein. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 48487-48490.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T.W., Brenner, D., 2016. TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends in Cell Biology*, 26, 249-261.
- Che, T.M., Johnson, R.W., Kelley, K.W., Dawson, K.A., Moran, C.A., Pettigrew, J.E., 2011. Effects of mannan oligosaccharide on cytokine secretions by porcine alveolar macrophages and serum cytokine concentrations in nursery pigs. *Journal of Animal Science*. 90, 657–668.
- Dacie, J.D., Lewis, S.M. 1995. *Practical Hematology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Dewulf, E. M., Cani, P.D., Claus, S.P., Fuentes, S., Puylaert, P.G., Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Thissen, J.P., Delzenne, N.M., 2012. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*. 62, 1112–1121.
- Failace, R., Fernandes, F., 2015. *Hemograma: Manual de Interpretação*. Artmed, Porto Alegre.
- Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, N. C., 2000. *Schalm's veterinary hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Fransen, F., Sahasrabudhe, N.M., Elderman, M., Bosveld, M., ElAidy, S., Hugenholtz, F., Borghuis, T., Kousemaker, B., Winkel, S., van der Gaast-de Jongh, C., de Jonge, M.I., Boekschoten, M.V., Smidt, H., Schols, H.A., de Vos, P., 2017. β 2 $\rightarrow$ 1-Fructans modulate the immune system in vivo in a microbiota-dependent and independent fashion. *Frontiers in Immunology*. 8, 1-14.

Friendship, R. M., Henry, S.C. Cardiovascular system, hematology, and clinical chemistry. In: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'allaire, S., Taylor, D.J. *Diseases of Swine*, 1992. Ames: Iowa State University Press, 3-11.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., Taylor, T.D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H., 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 469, 543-547.

Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. 146, 15-28.

Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington, R., 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin Functional Foods*. 7:1-19.

Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X., Cummings, J.H., 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108, 975-982.

Green, L.C., Luguriaga, V.R., Wager, D.A., Rand, W., Istfan, N., Yeung, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78, 7764-7768.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*. 140, 883-889.

Gutteridge, J.M., 1987. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 917, 219-223.

Healy, D.P., Silverman, P.A., Neely, A.N., Holder, I.A., Babcock, G.E., 2002. Effect of antibiotics on polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Pharmacotherapy*. 22, 578-585.

Heegaard, P.M., Klausen, J., Nielsen, J.P., González-Ramón, N., Piñeiro, M., Lampreave, F., Alava, M.A., 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 119, 365-373.

Jain, N.C., 1996. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Lea and Febiger, Philadelphia.

Kalghatgi, S., Spina, C.S, Costello, J.C, Liesa, M., Morones-Ramirez, J. R., Slomovic, S., Molina, A., Shirihai, O.S., Collins, J.J., 2013. Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial

Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Science Translational Medicine*. 5, 1-11.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego.

Ladirat, S.E., Schoterman, M.H.C., Rahaoui, H., Mars, M., Schuren, F.H.J., Gruppen, H., Schols, H A., 2014. Exploring the effects of galacto-oligosaccharides on the gut microbiota of healthy adults receiving amoxicillin treatment. *British Journal of Nutrition*. 112, 536–546.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Lampreave, F., González-Ramón, N., Martínez-Ayensa, S., Hernández, M.A., Lorenzo, H.K., García-Gil, A., Piñeiro, A., 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis*. 15, 672-676.

Lepczyński, A., Herosimczyk, A., Ozgo, M., Skomiał, J., Taciak, M., Barszcz, M., Berezecka, N., 2015. Dietary supplementation with dried chicory root triggers changes in the blood serum proteins engaged in the clotting process and the innate immune response in growing pigs. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 66, 47-55.

Lei, X.J., Kim, Y.M., Park, J.H., Baek, D.H., Nyachoti, C.M., Kim, I.H., 2018. Effects of levan- type fructan on growth performance, nutrient digestibility, diarrhoea scores, faecal shedding of total lactic acid bacteria and coliform bacteria, and faecal gas emission in weaning pigs. *Journal of the Science and Food Agriculture*. 98, 1539-1544.

Li, J., Kim, I.H., 2013. Effects of levan-type fructan supplementation on growth performance, digestibility, blood profile, fecal microbiota, and immune responses after lipopolysaccharide challenge in growing pigs. 91, 5336-5343.

Madrigal-Bujaidar, E., Morales-González, J.A, Sánchez, G.M, Izquierdo-Vega, J.A., Reyes-Arellano, A., Álvarez, G.I., Pérez-Pasten, R., Madrigal-Santillán, E., 2015. Prevention of aflatoxin B1-induced DNA breaks by β -D-glucan. *Toxins (Basel)*. 7, 2145-2158.

Maathuis, A.J., van den Heuvel, E.G., Schoterman, M.H., Venema, K., 2012. Galacto-oligosaccharides have prebiotic activity in a dynamic in vitro colon model using a (13) C-labeling technique. *The Journal of Nutrition*. 142, 1204-1212.

Meek, R.W., Vyas, H., Piddock, L.J.V., 2015. Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use?. *PLOS Biology*. 13, 1-11.

Miller, E.R., Ulrey, D.E., Ackermann, I., Schmidt, D.A., Luecke, R.W., Hoefer, J.A., 1961. Swine hematology from birth to maturity. II. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *Journal of Animal Science*. 20, 890-897.

Pick, R., Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*, 38, 61-170.

Rastall, R. A., Gibson, G. R., 2015. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*. 32, 42–46.

Rice, P.J., Lockhart, B.E., Barker, L.A., Adams, E.L., Ensley, H.E., Williams, D.L., 2004. Pharmacokinetics of fungal (1-3) beta-D-glucans following intravenous administration in rats. *International Immunopharmacology*. 4, 1209-1215.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan K., Coxam, V., Davicco, M.J., Leotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects of metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 104, 1–63.

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição de alimentos e exigências nutricionais. Imprensa Universitária/UFV, Viçosa.

Sagar, S., Vos, A.P., Morgan, M.E., Garssen, J., Georgiou, N.A., Boon, L., Kraneveld, A.D., Folkerts, G., 2014. The combination of *Bifidobacterium breve* with non-digestible oligosaccharides suppresses airway inflammation in a murine model for chronic asthma. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1842, 573–583.

Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., 2001. Effect of dietary β -1, 3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish and Shellfish Immunology*. 11, 683-95.

Saleh, M.A.D, Amorim, A.B, Grecco, H.A.T, Berto, D.A., Padovani, C.R., Orsi, R.O., Tse, M.L.P., 2015. Effects of $\beta(1\rightarrow3,1\rightarrow6)$ -D-glucan and density of diets on the blood profiles of immunologically challenged weaned piglets. *International Journal of Biological Micromolecules*. 80, 659-667.

Schokker, D., Fledderus, J., Jansen, R., Vastenhouw, S.A., Bree, F.M., Smits, M.A., Jansman, A.A.J.M., 2018. Supplementation of fructooligosaccharides to suckling piglets affects intestinal microbiota colonization and immune development. *Journal of Animal Science*. Doi: 10.1093/jas/sky110.

Secombes, C.J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Van Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven.

Seifert, S., Watzl, B., 2007. Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of Nutrition*. 137, 2563-2567.

Spurlock, M.E., Frank, G.R., Willis, G.M., Kuske, J.L., Cornelius, S.G., 1997. Effect of dietary energy source and immunological challenge on growth performance and immunological variables in growing pigs. *Journal of Animal Science*. 75, 720-726.

Szalai, A. J., VanCott, J. L., McGhee, J. R., Volanakis, J. E., Benjamin, W. H., Jr., 2000. *Infection and Immunity*. 68, 5652–5656.

Tizard, I.R. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*., 2014. Elsevier: São Paulo.

Torrecillas, S., Montero, D., Izquierdo, M., 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish & Shellfish Immunology*. 36, 525-544.

Tumbleson, M.E., Schmidt, D.A., Scholl, E., 1986. Hematology and clinical chemistry. In: Leman, A.D., Straw, B.E., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Penny, R.H.C., Scholl, E. *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University Press, 27-44.

Vetvicka, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug., 2011. *World Journal of Clinical Oncology*. 2, 115-119.

Wilson, M.R., Svendsen, J., 1972. Immunity to *Escherichia coli* in pigs: Serum gamma globulin levels, indirect hemagglutinating antibody titres and bactericidal activity against *E. coli* in pigs up to five weeks of age. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 36, 38-43.

Wismar, R., Brix, S., Frokiaer, H., Nygaard, L.H., 2010. Dietary fibers as immunoregulatory compounds in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1190, 70–85.

Xu, Z.R., Zou, X.T., Hu, C.H., Xia, M.S., Zhan, X. A., Wang, M.Q., 2002. Effects of Dietary Fructooligosaccharide on Digestive Enzyme Activities, Intestinal Microflora and Morphology of Growing Pigs. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 15, 1784-1789.

Zhao, P.Y., Jung, J.H., Kim, I.H., 2012. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. *Journal of Animal Science*. 90, 833-839.

IMPLICAÇÕES

O presente estudo traz contribuições para a comunidade de suinocultores e pesquisadores da área de nutrição de suínos, já que demonstrou que combinações de prebióticos estudadas agiram semelhantemente ao antimicrobiano halquinol, amplamente utilizado como melhorador de desempenho na suinocultura brasileira, na resposta imune e no desempenho de leitões recém-desmamados.

O uso exacerbado de antimicrobianos trouxe um problema de saúde pública mundial: surgimento de estirpes bacterianas resistentes aos antimicrobianos existentes na medicina humana e veterinária. Contudo, a redução ou banimento do uso destes compostos em dietas animais, sobretudo animais jovens, trouxeram problemas de aumento da morbidade e mortalidade. Neste contexto, o estudo e a identificação de compostos, principalmente bioativos naturais, é de suma importância para substituir o uso de antimicrobianos, trazendo benefícios de melhorias sobre saúde intestinal e sistêmica, e assim, melhorias sobre o desempenho animal e maior retorno econômico ao produtor.

Deve-se enfatizar que a utilização de aditivos de forma isolada nunca é totalmente eficaz na melhoria da qualidade sanitária e produtiva da granja. Manejos produtivos profiláticos devem ser seguidos rigorosamente pelos produtores, para que o uso dos aditivos, de forma geral, seja uma ferramenta adicional ao incremento na produtividade da suinocultura.

Novos experimentos avaliando as combinações de prebióticos podem ser realizados a fim de acompanhar os animais do desmame à terminação, com a hipótese de que as melhorias sobre a saúde trazidas com a inclusão de prebióticos em dietas de leitões em fase de creche podem reduzir os dias para o abate, e assim, reduzir os gastos com a manutenção destes animais na propriedade. Ainda, torna-se interessante a investigação do uso de pulsos de prebióticos, em períodos mais curtos de utilização e em momentos mais críticos à saúde dos animais, a fim de se avaliar e comparar a eficácia de uso deste aditivo com fim profilático.