UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ADITIVOS NAS RAÇÕES DE LEITÕES E SEUS EFEITOS NO INTESTINO DELGADO

Regis Kamimura

Orientador: Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes

GOIÂNIA
2013

sistema de bibliotecas ufg

PRPG
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[x] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação: ADITIVOS NAS RAÇÕES DE LEITÕES E SEUS EFEITOS NO INTESTINO DELGADO

Nome completo do autor: Regis Kamimura

Título do trabalho: **ADITIVOS NAS RAÇÕES DE LEITÕES E SEUS EFEITOS NO INTESTINO DELGADO**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Regis Kamimura
Assinatura do(a) autor(a)[2]

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)[2]

Data: 02 / 12 / 2017

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

[2] A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em maio de 2017

REGIS KAMIMURA

ADITIVOS NAS RAÇÕES DE LEITÕES E SEUS EFEITOS NO INTESTINO DELGADO

Tese apresentada à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração:
Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes

Co-orientadores: Prof. Dr. Eurípedes Laurindo Lopes
Prof.ª Dr.ª Andréa Luciana dos Santos- UFMT
Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti- UFU

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Eurípedes Laurindo Lopes- UFG
Prof.ª Dr.ª Cristine dos Santos Settimi Cysneiro- UFG

GOIÂNIA

2013

CIP

Kamimura, Regis.
K15a Aditivos nas rações de leitões e seus efeitos no intestino delgado [manuscrito]: / Regis Kamimura. - 2013.
100 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes
Co-orientadores: Andréa Luciana dos Santos, Eurípedes Laurindo Lopes, Marcelo Emílio Beletti
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Medicina Veterinária, 2013.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
1. Leitões (suínos) – Ração 2. Suinos (leitões) – Nutrição 3. Leitões (suínos) – Alimentação I. Título.

CDU: 636.4

via - secretaria

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

UFG
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ATA NÚMERO **162** DE DEFESA DE TESE DE **DOUTORADO** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **REGIS KAMIMURA.** Às **13h00min** do dia **13/12/2013**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **REGIS KAMIMURA,** intitulada "**Aditivos nas rações de leitões e seus efeitos no intestino delgado**", apresentada para obtenção do **Título de Doutor em Ciência Animal,** junto à Área de Concentração: **Produção Animal** desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora **Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes**, iniciando os trabalhos, concedeu, a palavra ao (a) candidato (a) **REGIS KAMIMURA** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a argüir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

BANCA EXAMINADORA	**APROVADO (A) /REPROVADO (A)**
Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes	APROVADO
Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho - UNIUBE/MG	APROVADO
Profa. Dra. Márcia Nunes Bandeira Roner - UFS/SE	APROVADO
Profa. Dra. Regiani Nascimento G. Pôrto - EVZ/UFG (memoria)	Aprovado
Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira – ICB/UFG	APROVADO

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **REGIS KAMIMURA,** HABILITADO. (**Habilitado (a) ou não Habilitado (a)**). Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

BANCA EXAMINADORA	**ASSINATURA**
Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes	Romão NUNES
Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho - UNIUBE/MG	
Profa. Dra. Márcia Nunes Bandeira Roner - UFS/SE	
Profa. Dra. Regiani Nascimento G. Pôrto - EVZ/UFG (memoria)	
Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira – ICB/UFG	

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Cx. Postal 131, Campus II – Samambaia, GOIÂNIA-GO, CEP: 74001-970 Tel 62 3521-1586 Fax: 3521-1583
home page: http://ppgca.vet.ufg.br/ e-mail: ppgcaevzufg@gmail.com

Banca

REGIS KAMIMURA

Tese defendida e aprovada em **13/12/2013** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes
(ORIENTADOR (A))

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho - UNIUBE/MG

Profa. Dra. Márcia Nunes Bandeira Roner - UFS/SE

Profa. Dra. Regiani Nascimento G. Pôrto - EVZ/UFG (memoria)

Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira – ICB/UFG

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus Pais Michiaharu Kamimura e Jades Cardoso Kamimura, sempre presentes.

A minha amada e querida esposa, aos meus filhos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelos bons caminhos percorridos da Vida e grande aprendizagem com a vivência diária.

A minha querida e amada família, sempre apoiou e incentivou no processo de Educação continuada.

Ao meu orientador Romão da Cunha Nunes pelo incentivo e amizade.

Aos professores co-orientadores Andréa Luciana dos Santos, Eurípedes Laurindo Lopes, Marcelo Emílio Beletti.

Aos professores Vânia Maria Arantes, Humberto Eustáquio Coelho, Cristine dos Santos Settimi Cysneiros, Reginaldo Nassar Ferreira, Jurij Sobestiansky, Regiane Nascimento Gagno Porto.

A todos professores da UFG, grandes amigos e contribuidores de novas visões técnicas, e trocas de ideias cientificas.

Aos técnicos e administrativos da UFG na disponibilidade em ajudar e servir nas dúvidas, e pela convivência.

Aos meus colegas da Pós-graduação em Ciência animal da UFG, em especial a Cristiane Ferreira Prazeres Marchini, Juliana Bonifácio de Alcântara, Priscila, Luiz Augusto de Souza, Sérgio Fonseca Ferreira,

As professores e técnicos do laboratório de Histologia do ICBIM da UFU,

As amigas Camila Perdoncini Carvalho e Sara Hissae Hiraiwa colaboradoras no laboratório de Histologia, onde crescemos juntos na ciência e na convivência.

A todos funcionários e técnicos da granja de suínos em possibilitar a pesquisa. Em especial ao Felipe Mainardi e a Kellem Lopes do Carmo

Ao Antônio Abud Júnior e família pela amizade, apoio, acolhimento e caronas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB – Alcian Blue

APC – Antimicrobianos promotores de crescimento

CC – Célula caliciforme

CP – Célula de Paneth

FOS - Fruto-oligossacarídeos

GALT – *Gut associated lymphoid tissue*

GRSC - Granja de reprodutores suídeos certificada

GOS – Galactoligossacarídeo

ID – Intestino delgado

IG – Intestino grosso

IgA – Imunoglobulina A

LMR - Limite máximo de resíduo

MALT – *Mucosa-associated Lymphoid Tissue*

MI – Microbiota intestinal

MOS – Manano-oligossacarídeo

PAS – *Periodic acid shiff*

PBS – *Phosfate buffered saline*

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

TA – Temperatura ambiente

TGI – Trato gastrointestinal

TTI – Tempo de transito intestinal

TOS –Trans-galactoligossacarídeos

μL – Microlitro

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das dietas basais nas fases pré-inicial 1 (PI1), pré-inicial 2 (PI 2), Inicial 1 (I 1) e Inicial 2 (I 2), para leitões desmamados. 31

Capítulo 3

Tabela 1– Composição percentual e calculada das dietas basais nas fases pré-inicial 1 (PI 1), pré-inicial 2 (PI 2), Inicial 1 (I 1) e Inicial 2 (I 2), para leitões desmamados. 47

Capítulo 4

Tabela 1 –Composição percentual e calculada das dietas basais nas fases pré-inicial 1 (PI 1), pré-inicial 2 (PI 2), Inicial 1 (I 1) e Inicial 2 (I 2), para leitões desmamados.....66

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1 Porcentagem de PCNA positiva na região da cripta do ID de leitões aos 65 dias de idade submetidos a cinco tratamentos 37

Capítulo 3

Figura 1- Desenho esquemático de uma célula caliciforme 48

Figura 2-Jejuno de leitão com 65 dias idade, A- PAS positivo e B- imagem binária de A, construída por threshold 49

Figura 3 - Porcentagem de células caliciformes coradas por PAS no duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) de leitões aos 65 dias de idade submetidos a cinco diferentes tratamentos..... 51

Figura 04 -Porcentagem de células caliciformes coradas por Alcian Blue no duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C)..... 53

Figura 05 -Porcentagem de células caliciformes coradas por PAS e Alcian Blue no duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) 54

Capítulo 4

Figura 1- Células de Paneth ponta das setas, coradas com Hematoxilina plúmbica..... 69

Figura 2- Comprimento linear do corte do Duodeno de leitão com 65 dias.....70

Figura 3- Imagem de duodeno de leitão capturada de microscópio confocal com destaque em vermelho células de Paneth com anticorpo primário policlonal Crp5 e secundário Alexa 555, em azul núcleos marcados com DAPI pela técnica de imunoistoquímica 71

Figura 4. Contagem de células de Paneth/mm linear de mucosa do duodeno de leitões aos 65 dias de idade submetidos a cinco tratamentos 72

SUMÁRIO

RESUMO XIV
ABSTRACT XV
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS 1
1 INTRODUÇÃO 1
2 MICROBIOTA INTESTINAL 2
3 ADITIVOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO PARA SUÍNOS 3
3.1 Antimicrobianos Promotores de Crescimento (APC) 4
3.2 Probióticos 7
3.3 Prebióticos 9
3.4 Simbióticos 10
4 CÉLULAS DE DEFESA LOCAL DO INTESTINO DELGADO DE SUÍNOS 11
4.1 RENOVAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO DA MUCOSA INTESTINAL 11
4.2 Células Caliciformes no Intestino Delgado de Leitões 12
4.3 Células de Paneth na Mucosa Duodenal de Suínos 13
4.4 Mecanismo de proteção do trato gastrointestinal 15
5 OBJETIVO GERAL 16
REFERÊNCIAS 17
CAPÍTULO 2 – DINÂMICA CELULAR DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO DE LEITOES DE 65 DIAS DE IDADE, ALIMENTADOS COM PROBIÓTICO, PREBIÓTICO, SIMBIÓTICOS E ANTIMICROBIANO COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO 26
RESUMO 26
CHAPTER 2 – DYNAMIC CELL OF THE SMALL INTESTINE MUCOSA FROM 65 DAYS OLD MALE PIGLETS FED PROBIOTICS, PREBIOTICS, SYNBIOTICS AND ANTIMICROBIAL AGENT ASGROWTH PROMOTERS 27
Abstract 27
1 INTRODUÇÃO 28
2 MATERIAL E MÉTODOS 30
2.1 Local e animais 30
2.2 Colheita dos Fragmentos de Intestino Delgado e reação de Imunoistoquímica para PCNA 32
2.3 Delineamento Experimental 33
2.4 Análise Estatística 34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
4 CONCLUSÃO 38
REFERÊNCIAS 39
CAPÍTULO 3 – QUANTIDADE E PERFIL DE MUCO DAS CÉLULAS CALICIFORMES NO INTESTINO DELGADO DE LEITÕES COM 65 DIAS DE IDADE ALIMENTADOS COM DIFERENTES DIETAS 42

RESUMO 42
CHAPTER 3 - NUMBER AND PROFILE OF GLOBET CELL'S MUCOUS FROM THE SMALL GUT OF PIGLETS WITH 65 DAYS AGE FED BY DIFFERENT DIETS 43
ABSTRACT 43
1 INTRODUÇÃO 44
2 MATERIAL E MÉTODOS 46
2.1 Local e Animais 46
2.2 Porcentagem de Células Caliciformes 48
2.3 Delineamento Experimental 49
2.4 Análise Estatística 50
3 RESULTADO E DISCUSSÃO 50
4 CONCLUSÃO 57
REFERÊNCIAS 58
CAPÍTULO 4 – CÉLULAS DE PANETH DA MUCOSA DUODENAL DE LEITÕES SUBMETIDOS À DIETAS COM DIFERENTES ADITIVOS ALIMENTARES. 61
RESUMO 61
CHAPTER 4 - PANETH´S CELLS IN DUODENAL MUCOSAL FROM PIGLETS SUBMITTED TO DIETS WITH DIFFERENT PROMOTER ADDITIVES 62
ABSTRACT 62
1 INTRODUÇÃO 63
2 MATERIAL E MÉTODOS 65
2.1 Local e Animais 65
2.2 Imunoistoquímica para detectar criptdina na região de cripta 67
2.3 Quantidade de Células de Paneth na Mucosa do Duodeno de Leitões 67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 70
4 CONCLUSÃO 74
REFERÊNCIAS 75
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS 78

RESUMO

A microbiota intestinal é alterada por diversos fatores, sendo a dieta o que mais influência, assim como os aditivos moduladores do microbioma. Objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos dos aditivos promotores de crescimento na dieta, sobre a porcentagem de células caliciformes com mucina ácida e neutra no intestino delgado de suínos, por modularem a microbiota e atuar na imunidade intestinal, avaliou a porcentagem de células intestinais em proliferação pela técnica de imunoistoquímica por PCNA, certificar e quantificar a presença de células de Paneth por coloração específica e por imunoistoquímica, relatos da literatura cita a ligação de probióticos com o epitélio intestinal via células de Paneth e caliciformes. O experimento foi conduzido em uma GRSC, aplicando o DIC. Utilizaram-se 480 leitões machos castrados, em cinco tratamentos, com dez leitões por gaiola, com oito repetições e no tratamento basal realizou-se 16 repetições. Sendo, T1=dieta basal, denominado de controle negativo, T2=T1+ antimicrobiano Avilamicina, T3=T1+probiótico *Scchacaromyces cerevisae* T4=T1+prebiótico MOS, T5=T1+probiótico *Scchacaromyces cerevisae* + o prebiótico MOS, foram abatidos com 65 dias de idade. A dieta foi à base de milho e farelo de soja mais um suplemento mineral e vitamínico. Ocorreram alterações com maior aumento na quantidade de células caliciformes com muco neutro comparativamente com aquelas de muco ácido e com o controle negativo. Não houve alterações expressivas para as células com muco ácido. A porcentagem de células no intestino delgado em proliferação pela técnica de imunoistoquímica para PCNA não apresentou alterações significativas, confirmou-se a presença de células de Paneth por colorações especiais e por imunoistoquímica. A quantidade de células de Paneth do duodeno alteraram-se em função dos aditivos utilizados, em comparação ao controle negativo que teve a maior quantidade, com a adição de antimicrobiano houve a menor quantidade, com prebiótico e simbiótico ocorreu redução mais branda, o que sugere ter ocorrido uma imunomodulação Os aditivos promotores de crescimento nas rações são tecnologias que favorecem ganhos significativos e podem ser recomendados, pois os resultados são compensatórios em produtividade. Além de promover uma melhor saúde intestinal em função de uma microbiota mais saudável e mais apta à criação de leitões na fase de creche

Palavras-chave: Célula de Paneth. Muco. Leitão. Promotor de Crescimento, Saúde Intestinal.

ABSTRACT

Gut microbiota is changed by various factors, being the diet which has the highest influence, as well as the modulating additives of the microbiome. The purpose of this work was to evaluate the effects of growth promoting additives in the diet on the percentage of goblet cells with acid and neutral mucin in small intestine of pigs, the percent of gut cells in proliferation by the technique of immunohistochemistry by PCNA, to certify and quantify the presence of Paneth's cells by specific staining and by immunohistochemistry, since that cell has a great importance in the immunity and in the gut microbiota. The experiment was conducted in a certified swine breeding farm (CSBF), applying the CRD (completely randomized design). Four hundred and eighty castrated male piglets were used, in five treatments, with ten piglets by cage, eight repetitions, and in the basal treatment 16 repetitions were used, being T1=basal diet, denominated negative control, T2=T1+antimicrobial agent, T3=T1+probiotic, *Saccharomyces cerevisiae,* T4=T1+prebiotic MOS, T5=T1+probiotic *Saccharomyces cerevisiae* + the prebiotic MOS. The diet was based on corn and soybean meal plus a supplement of minerals and vitamins. There were changes with higher increase in quantity of goblet cells, calculated by millimeter of gut mucosa with neutral mucus compared to those with acid mucus and to the negative control. There were no expressive changes for cells with acid mucus. The percentage of proliferating cells in small intestine by the immunehistochemistry technique for PCNA did not show significant changes and the presence of Paneth's cells was confirmed by special staining and by immunehistochemistry. The quantity of Paneth's cells of duodenum changed according to additives used, in comparison with the negative control which had a greater quantity. With the addition of antimicrobial agent there was a lesser quantity. With the prebiotics and synbiotics occurred milder reduction and this suggests that immunomodulation occurred. Besides promoting a better gut health due to a healthier and more appropriate microbiota to the rearing of piglets in the nursery phase, the addition of growth promoters in feeds favors significant gains and can be recommended, since the results are compensatory in productivity.

Key words: Paneth's cells. Mucus. Piglet. Growth Promoter. Gut Health.

.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Neste século, o uso dos aditivos antimicrobianos é um dos assuntos mais pesquisados em nutrição animal por diversos fatores, tais como: consumidores conscientes por alimentos saudáveis, consciência ambiental, riscos à saúde humana e até por necessidade de adequação ao mercado importador.

Países importadores têm imposto fortes restrições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal.

O rápido crescimento da população mundial e o desenvolvimento econômico, associados à urbanização têm expressivo impacto para atender o crescente contingente por demanda alimentar. Faz-se necessária maior eficiência produtiva a fim de suprir esta demanda, pois a carne suína corresponde a 40% do consumo mundial de proteína animal (GHELER *et al*., 2009). Os riscos de perdas nas exportações relacionadas aos produtos de baixa qualidade e saúde precária dos animais levam a uma concorrência por novos mercados consumidores de carne suína mais saudável e alimento seguro (OECD-FAO, 2009).

Face ao alto impacto da nutrição no custo de produção de suínos, para se obter a dieta equilibrada e balanceada à base de milho e farelo de soja, faz-se necessária a complementação com aditivos e aminoácidos essenciais para uma adequada nutrição, em busca da melhor saúde intestinal. Neste contexto, ALDRIDGE *et al.* (2005) afirmaram que a saúde intestinal influência a saúde sistêmica e consequentemente o desempenho dos animais, ressaltando que a maioria das bactérias são benéficas ao hospedeiro, embora os consumidores geralmente relacionem bactérias às doenças e infecções.

O mercado mundial de carnes busca comprar produtos de origem segura. Neste conceito está intrínseca a ausência de resíduos (APC), os quais foram bastante utilizados na criação de aves e suínos.

2 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal (MI) é composta por diferentes micro-organismos, principalmente bactérias, fungos, protozoários e alguns vírus (SAVAGE, 1977; MARINHO *et al*., 2008). As bactérias, como principal grupo podem ser classificadas em transientes e residentes. As transientes são ingeridas e excretadas sem danos, permanecendo temporariamente no intestino, enquanto as residentes, também denominadas de indígenas, colonizam a mucosa do intestino e multiplicam-se (PLUSKE *et al.,* 2002; KELLY *et al*., 2004).

Mais de 400 espécies de micro-organismos compõem a microbiota intestinal e devem estar em equilíbrio com o hospedeiro. O estabelecimento desta nos mamíferos ocorre desde o período neonatal, após o nascimento e durante seu desenvolvimento, sob forte influência da dieta e do meio ambiente (NOVAK *et al*., 2001; KAMIMURA *et al*., 2006).

A microbiota do TGI é bastante complexa, é um ecossistema com cerca de 500 espécies, cada uma formada por diferentes cepas, conseguiu-se isolar menos de 50% destas (BJÖRKSTÉN, 2006)

Mais de 75% do peso seco de produtos fecais são compostos por células bacterianas e cada grama contém, aproximadamente, 1×10^{11} micro-organismos, contendo 50 a 200 gêneros conhecidos, atribuindo-se ao intestino o conceito de ser um complexo ecossistema microbiano (DUNNE, 2001).

TRABULSI & SAMPAIO (2000) classificaram a MI em autóctone, correspondente à indígena, micro-organismos residentes permanentes, e alóctone, os que se encontram fora de seu meio natural, de passagem rápida, transitórios com a dieta, não sendo capazes de colonizar como os anteriores.

Estima-se que 90% da MI sejam compostas por bactérias benéficas, aeróbicas ou anaeróbicas, produtoras de ácido láctico, como os *Lactobacillus spp e Bifidobacterium spp*, formadoras de ácido lático e de ácido acético como produtos finais principais do metabolismo de carboidratos (JAY, 2005). Outras são exclusivamente aeróbicas, como *Bacterióides spp, Fusobacterium spp e Eubacterium spp.* Nos 10% restantes desta composição, estão às bactérias potencialmente patogênicas ao hospedeiro, destacando-se *Escherichia coli* e *Clostridium* spp, entre outras.

A convivência com a microbiota intestinal é tanto necessária, quanto benéfica para a saúde do animal (CRESTANI, 2008). A presença de bactérias no intestino é obrigatória

para o desenvolvimento de diversas funções do TGI- trato gastrointestinais Se os animais viverem em ambiente estéril, os movimentos peristálticos não se desenvolvem adequadamente afetando a função motora do intestino (VANDEPLAS *et al*., 2011).

Além de contribuir para o desenvolvimento do TGI, a MI desempenha um papel fundamental na degradação de polissacarídeos e fornece uma importante ação na defesa contra a invasão de microrganismos patogênicos, por competir e reduzir a colonização dos mesmos (VANDEPLAS *et al*., 2011; Yu, 2012) Também é necessária para o desenvolvimento adequado do sistema imunológico, essencial para o desenvolvimento de tecido linfoide, como as placas de Peyer e para a produção de imunoglobulina A (KOSIEWICZ *et al*., 2011).

O uso de animais *germ free* tem contribuído com informações importantes sobre as relações da MI com a fisiopatologia do hospedeiro. A MI tem importantes funções nutritiva, trófica, protetora e imunomoduladora no organismo hospedeiro (GUARNER & MALAGELADA 2003)

Qualquer fator que provoque desequilíbrio, como mudança na alimentação, alterações climáticas, aumento do desafio intestinal, enterites, diarreia ou qualquer outra situação desfavorável, pode resultar em diminuição das populações bacterianas úteis e em proliferação das indesejáveis, o que se reflete sobre a saúde e sobre o desempenho animal (MATHEW *et al*.,1993).

Substâncias provenientes destes micro-organismos, tais como: peróxidos de hidrogênio, ácidos orgânicos, e enzimas como a ß-glucoronidase e hidrolases de sais biliares, inibem o crescimento de bactérias patogênicas, levando à eubiose (JIN *et al*., 1997; FERKET *et al*., 2002). Algumas bactérias produzem substâncias que interferem sobre toxinas bacterianas, como enzimas digestivas e metabólitos neutralizantes, favorecendo a imunidade da mucosa intestinal contra as bactérias patogênicas (COPPOLA & TURNERS, 2004; CRESTANI, 2008).

3 ADITIVOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO PARA SUÍNOS

O processo de desmame é um período único e difícil na vida do leitão, pois o animal sofre estresse gerado pela separação materna, mudança de ambiente físico e social, além da

substituição na forma física da dieta, quando acontece a remoção do leite. Associadas ao processo de desmame, as alterações na morfologia intestinal e a redução na atividade das enzimas do intestino delgado provocam distúrbios digestivos e diminuição da capacidade de absorção (PLUSKE, 2001).

As substâncias químicas mais utilizadas legalmente na produção animal são os antibióticos ou antimicrobianos promotores de crescimento, justificáveis pelo conjunto de razões relacionadas com a prevenção ou tratamento de doenças infecciosas específicas e com a promoção do crescimento (CRUZ & FERREIRA, 2009).

3.1 Antimicrobianos Promotores de Crescimento (APC)

Historicamente, os APC são utilizados nas rações de monogástricos com o objetivo de permitir maior ganho de peso, melhorar a conversão alimentar e a saúde do plantel. A eficácia do uso de antimicrobianos para suínos está bem documentada no *Nutrient Requeriments of Swine* (NRC, 1998). Um levantamento de 1194 experimentos envolvendo 32.555 suínos indicou que os antimicrobianos melhoraram o ganho de peso em 16,4% de leitões, 10,6% em suínos em crescimento e 4,2% de suínos na fase de terminação.

Em suínos confinados o uso de antibióticos como promotores de crescimento iniciou em 1940 (AARESTRUP, 2012).

No Brasil, o MAPA faz a regulamentação de uso dos APC. Na lista de 2013 constam alguns liberados para uso em suínos como avilamicina, bacitracina de zinco, bacitracina metileno disalicilato, enramicina, eritromicina, espiramicina flavomicina, sulfato de colistina, halquinol (clorohidroxiquinolina) e lincomicina. A avilamicina pertence ao grupo dos antibióticos oligossacarídeos, produzidos pela espécie *Streptomyces viridochromogenes*, sendo utilizada exclusivamente como aditivo melhorador do desempenho animal, não sendo usada como medicação terapêutica em medicina veterinária e medicina humana

Os antibióticos têm sido utilizados na nutrição animal nas últimas quatro décadas para melhorar o desempenho de crescimento, a eficiência alimentar e protegê-los dos efeitos adversos dos micro-organismos entéricos patogênicos e não patogênicos (FERKET et al., 2002). São muito eficientes na fase inicial da vida dos leitões, em especial, no período pós-desmame, coincidente com o fim da imunidade passiva, anteriormente, provida via colostro e depois pelo leite materno. Além do estresse do desmame, momento crucial do ponto de

vista fisiológico, o maior desafio alimentar de todas as fases da criação é a transição da dieta sem o leite materno, pois ocorre a maior ingestão de contaminantes do ambiente.

O banimento da utilização dos antibióticos promotores de crescimento para leitões desmamados na Dinamarca, em janeiro de 2000, resultou em aumento significativo na diarreia pós-desmame (CALLESEN, 2004). Este fato incrementou a busca por estratégias nutricionais preventivas contra o desgaste corporal provocado pela diarreia.

Com a possibilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, a Comissão Europeia, pelo princípio da precaução, decidiu proibir a inclusão dos antibióticos promotores de crescimento na ração dos animais em acordo com o regulamento CE N°. 1831/2003 (HUYGHEBAERT et al., 2011).

Os APC ainda são utilizados na suinocultura e avicultura na maioria das vezes e também em outras criações animais, devido à dificuldade de manutenção do ambiente criatório livre de patógenos, e ao alto desafio de campo. Eles melhoram a produtividade animal e reduzem o custo de produção (CRESTANI, 2008; PALERMO NETO, 2011). Embora os mecanismos de ação exatos dos antimicrobianos como promotores de crescimento não estejam esclarecidos, seu uso gera resultados em ganho de peso, conversão alimentar e melhora a uniformidade de aves e suínos (PALERMO NETO, 2011).

A FAO/WHO (2002) afirmou que a administração destes compostos aos animais de produção pode gerar resíduos nos produtos obtidos para alimentação humana. Segundo PRICE (2005), o uso inadequado de antibióticos na criação de animais contribuiu para o aumento da prevalência de micro-organismos resistentes nos humanos. Ponderando os riscos inerentes aos mesmos, o seu uso é regulamentado de modo a respeitar a segurança alimentar.

De acordo com BREMNER & JOHNSTON (2002), existem cinco razões para a preocupação com a presença de resíduos nos alimentos e produtos de origem animal:

1) Resistência: Em geral, quanto maior a utilização de um antibiótico específico, maior é o risco emergencial, e de propagação da resistência contra ele, tornando assim o medicamento cada vez menos eficaz.

2) Toxicidade: Os fármacos e/ou seus metabólitos de maneira geral são tóxicos para a maioria dos seres vivos, desde bactérias até organismos mais complexos como os seres humanos, provocando efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos e/ou causando danos tóxicos agudos.

3) Alergia e Hipersensibilidade: A hipersensibilidade à penicilina é a alergia mais conhecida, sendo que alguns indivíduos podem reagir de forma aguda e os resíduos nos produtos de origem animal como carne e leite podem desencadear estados alérgicos difíceis de serem diagnosticados em humanos.

4) Os resíduos antimicrobianos podem alterar o processo nos produtos embutidos ou derivados de leite fermentados, interferir no processo de fabricação acarretando perdas econômicas e tecnológicas.

5) Barreiras comerciais: a detecção de resíduos nos produtos de origem animal é um importante motivo para se criar entraves comerciais, devido ao rigor das exigências entre os países importadores.

É importante salientar que o uso prudente não significa o não uso de antimicrobianos, ou seja, deve-se evitar o uso excessivo, indiscriminado e incorreto. Quatro abordagens terapêuticas são indicadas para animais de produção, conforme objetivos de uso, dose e duração do tratamento (PFIZER, 2007): (1) promotor de crescimento nas rações; (2) uso profilático para prevenir doenças individuais, ou de grupo; (3) uso metafilático como tratamento de grupos, no surgimento da doença, visando o controle precoce do avanço da enfermidade; (4) uso terapêutico, por uso no tratamento de animais doentes, individuais ou grupos.

A administração dos APC gera excelentes resultados, cuja ação modula a microbiota intestinal por controlar as potenciais doenças, promovendo melhor saúde intestinal e maior aproveitamento energético revertido em ganho de peso e conversão alimentar.

PALERMO NETO (2013) afirma que é um mito a ideia de que os antimicrobianos na produção animal deixam resíduos “tóxicos” nos produtos derivados daqueles que foram tratados, devido terem limites abaixo do LMR- limite máximo de resíduo. O LMR é a concentração máxima permitida do resíduo de um produto de uso veterinário no alimento de origem animal, que é legalmente permitida ou reconhecida como segura à saúde do consumidor;

Produtos alternativos aos APC estão sendo pesquisados, na tentativa de conseguir a substituição sem perdas nos resultados zootécnicos e econômicos.

Destacam-se os probióticos, prebióticos, simbióticos, fitogênicos, ácidos orgânicos, enzimas exógenas, nucleotídeos, proteínas purificadas de outros animais e as diferentes combinações entre estes.

3.2 Probióticos

A definição mais aceita internacionalmente é que os probióticos são micro-organismos vivos e, se administrados em quantidades adequadas, podem conferir benefícios à saúde do hospedeiro (REID et al., 2003; REID & HAMMOND, 2005; FAO/WHO, 2006; HENKER et al., 2007). As bactérias com ação probiótica possuem ação bactericida e/ou bacteriostática que dificultam a colonização do TGI por bactérias patogênicas.

Os micro-organismos mais reconhecidos como sendo probióticos são as bactérias produtoras de ácido lático-BAL, são encontradas em grande quantidade nos intestinos de humanos e animais saudáveis. Elas são reconhecidas pelo status GRAS – Geralmente Reconhecidas como Seguras, a grande maioria delas são Gram positiva; além das leveduras *Saccharomyces boulardi e S. Cerevisae* (NAIDU *et al*., 1999).

O status de probiótico "ideal" deve promover efeitos benéficos para o hospedeiro, ser cultivável em escala industrial, e ser de origem da espécie ao qual se destina, ter capacidade de induzir melhora na resposta imunológica do intestino, não ser patogênica e nem tóxica, conter uma grande quantidade de células viáveis, sobreviver ao pH bastante ácido do estômago e resistir as ações da bile e enzimas digestivas, permanecer viável no intestino mesmo que temporariamente, aderir firmemente a mucosa intestinal evitando serem deslocados pelo peristaltismo, permanecer viável no produto até o consumo, (DUANNE et al., 2001, GALDEANO et al., 2007)

Os probióticos se destacam como potenciais substitutos aos tradicionais promotores de crescimento para animais, uma vez que é possível usar cepas que não são encontradas em humanos, assim reduz o risco de resistência as estas cepas de uso exclusivo em animais de produção.

Os mecanismos de ação para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são: atividade antimicrobiana, reforço da função da barreira intestinal e imunomodulação (PARVEZ et al., 2006, N. G. et al., 2009).

Os probióticos modulam a MI pela inibição da colonização desta mucosa por patógenos, ou seja, principalmente, pela competição por sítios de adesão e por nutrientes, denominada exclusão competitiva, e pela produção de compostos antimicrobianos, tais como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio , bacteriocinas, produção de óxido nítrico, que é um gás com propriedades imunomoduladora e antibacteriana, produção de mucina e diminuição do pH (KAUR, et al. ,2002; GUARNER & MALAGELADA, 2003; MORAIS & JACOB, 2006; SOBKO et al., 2006).

Os probióticos promovem ação antagonista destas substâncias contra vários patógenos, tais como *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Clostridium sporogenes, Clostridium perfringens Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis,* dentre outros (TODOROV & DICKS, 2007; TODOROV, 2009).

Os ácidos orgânicos lático e acético produzidos pelas bactérias com ação probiótica reduzem o pH do TGI, e, assim, previnem o crescimento de vários agentes patogênicos e, consequentemente, permitem o desenvolvimento de certas espécies de *Lactobacillus* (GARCIA et al., 2006). Um estudo que destaca a relação entre a produção destas substâncias e a inibição de patógenos é o de KEERSMAECKER et al. (2006) que investiga a ação microbicida da linhagem GG de *Lactobacillus rhamnosus* contra *Salmonella entérica* e a produção de ácido lático.

Ao longo do TGI, patógenos interagem no mesmo ambiente com as bactérias benéficas. A microbiota comensal e os probióticos têm sido demonstrados *in vivo* e *in vitro* como uma forma de prevenir a infecção pelo mecanismo de competição pelos sítios de ligação da superfície celular ou secreção de agentes antimicrobianos. As ligações dos probióticos com o epitélio intestinal pelas células de Paneth e caliciformes estimulam a produção de defensinas e muco, substâncias importantes para a proteção das superfícies mucosas contra a invasão por patógenos (LEBEER, et al., 2010).

Os micro-organismos probióticos quando adaptados à microbiota do hospedeiro são capazes de metabolizar os nutrientes de forma mais rápida, assim tornando- os indisponíveis para as bactérias patogênicas e controlando a proliferação destas (PANCHENIAK, 2005).

Melhores resultados são obtidos com a administração de probióticos em leitões logo após o nascimento. Além do TGI do recém-nascido ser estéril no momento do nascimento, há pouca secreção de ácido clorídrico na idade jovem, o que facilita a proliferação de

bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Streptococcus, Salmonella* e *Clostridium*, principais causas de mortalidade inicial (MENIN et al., 2008; VANNUCCI & GUEDES, 2009).

Leveduras e bactérias são os micro-organismos mais comumente utilizados como probióticos. Entretanto, eles apresentam diferentes mecanismos de ação, metabolismo e resistência a antibióticos. Dentre as espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces*, único gênero de leveduras utilizado atualmente como probiótico, uma das de maior destaque é *Saccharomyces* boulardii (MARTINS et al., 2010).

As leveduras probióticas apresentam algumas vantagens em relação às bactérias, não se tem dados de que as leveduras são afetadas pelo uso de antibacterianos. Esta é uma propriedade importante, pois algumas opções de uso, associam probióticos e antibacterianos para tratar infecções gastrointestinais (MARTINS et al*.,* 2005b)

3.3 Prebióticos

Um prebiótico é um ingrediente fermentado seletivamente que permite que as alterações específicas, tanto na composição e/ou na atividade da microbiota intestinal promovem benefícios ao hospedeiro, bem-estar animal e melhor saúde (RUBERFROID, 2007).

Os prebióticos são açúcares complexos os quais, quando adicionados às rações, agem como substratos, utilizados para ajudar na manutenção da eficiência digestiva, na integridade do epitélio intestinal e na modulação do sistema imunológico estimulada pelo crescimento das bactérias com ação probiótica (MIKKELSEN et al*.,* 2003).

Os prebióticos são definidos como ingredientes nutricionais não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, sendo fermentados seletivamente pelos micro-organismos do TGI constituindo o alimento das bactérias probióticas (SHANE, 2001).

O termo prebiótico foi empregado por GIBSON & ROBERFROID (1995) para designar ingredientes nutricionais não digeríveis que contribuem beneficamente com o hospedeiro, por estimularem seletivamente o crescimento e a atividade do metabolismo de uma ou mais bactérias benéficas do intestino grosso. Estas substâncias não podem ser hidrolisadas ou absorvidas nas porções iniciais do TGI. Fermentam seletivamente um

limitado número de bactérias benéficas no IG, as quais induzem efeitos sistêmicos positivos à saúde.

Os ingredientes seletivamente fermentados resultam em alteraçõs especificas na composição e ou atividade da microbiota gastrointestinal, proporcionando benefícios para a saúde do hospedeiro (Gilson et al., 2011)

Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois derivados de açúcares e oligossacarídeos são classificados como prebióticos: MOS-manano-oligossacarídeo, FOS, GOS, TOS e inulina. Destes, os oligossacarídeos de cadeias curtas de polissacarídeos têm recebido particular atenção pelas inúmeras propriedades prebióticas (SILVA, 2000).

Em seu relato, SPRING (2000) afirmou que os MOS atuam na adsorção e na remoção de patógenos do trato intestinal e na modulação do sistema imunológico.

3.4 Simbióticos

O simbiótico é a associação de probióticos e prebióticos, e constitui-se em alternativa de substituição aos promotores químicos, e, por isto podem ser conhecidos como promotores biológicos de crescimento ou aditivos naturais. MENTEN (2002) citou que, nesta composição, as bactérias probióticas são produzidas e mescladas a um substrato prebiótico que funciona como seu invólucro protetor, ao evitar contato direto do suco gástrico e do alimento no TGI do hospedeiro.

O grande desafio dos pesquisadores é encontrar a melhor combinação entre cepa probiótica e prebiótico. A interação do simbiótico *in vivo,* no hospedeiro só é efetivamente positiva se ocorrer associação interativa entre os dois ligantes. A melhor escolha dos pares simbióticos pode ser favorecida pela adaptação do probiótico ao substrato prebiótico, resultando em vantagem competitiva para o probiótico, se ingerido juntamente com o prebiótico (BIELECKA et al*.,* 2002; HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; ARAÚJO et al. 2007).

Alternativamente, o efeito simbiótico pode ser direcionado para diferentes regiões anatômicas do TGI. Em geral, os simbióticos contêm espécies probióticas, atuantes no intestino delgado, além dos prebióticos, que estimulam as bactérias associadas e as existentes no intestino grosso (PATTERSON & BURKHOLDER, 2003).

O principal propósito do uso dos simbióticos é equilibrar a microbiota intestinal, melhorando o suprimento alimentar das bactérias benéficas em prejuízo das patogênicas. Em consequência, há redução da incidência de doenças, melhor absorção, maior biodisponibilidade dos nutrientes e melhor desempenho zootécnico (MONTEIRO et al., 2008).

Os simbióticos têm sido cada vez mais focados em benefícios funcionais, incluindo resistência à infecção bacteriana do TGI, atividade antibacteriana e melhora da imunidade (AWAD et al., 2008)

BERTECHINI (2006) afirmou que as pesquisas realizadas indicaram boas perspectivas do seu uso, porém, faz-se necessário aprofundar as buscas por informações mais adequadas sobre os níveis de inclusão e as melhores associações entre as cepas e os substratos.

O simbiótico é um produto no qual um probiótico e um prebiótico estão associados por interação da cepa do probiótico *versus* o melhor prebiótico como substrato.

4 CÉLULAS DE DEFESA LOCAL DO INTESTINO DELGADO DE SUÍNOS

4.1 RENOVAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO DA MUCOSA INTESTINAL

No intestino delgado-ID, as células estaminais localizadas na região das criptas diferenciam-se em enterócitos, células enterro-endócrinas, caliciformes, células M, células dendríticas e células Tuft. Estas células migram de forma ascendente ao longo das vilosidades intestinais e à medida que ocorre a apoptose ou extrusão dos enterócitos envelhecidos e ou desgastados, são expulsas para o lúmen intestinal. As células de Paneth situam-se na região das criptas e não migram para o vilo; sua função envolve a defesa contra micro-organismos do lúmen intestinal, possuem vida média de 20 dias e são eliminadas por fagocitose (KIERSZENBAUM et al., 2012).

O *turnover* das células do ID e do cólon depende da taxa de proliferação das células estaminais da mucosa intestinal e de apoptose, que é a chave reguladora do *turnover* fisiológico da mucosa intestinal (ZIEGLER et al., 2003). A taxa de renovação do epitélio intestinal é a mais rápida dentre todos os epitélios, é dependente de vários fatores, como: proliferação celular, extrusão celular, apoptose das células epiteliais, fatores de crescimento

teciduais, produção e atuação de hormônios, composição da microbiota, composição e tipo da dieta, tempo de trânsito intestinal (TTI) e idade do animal.

4.2 Células Caliciformes no Intestino Delgado de Leitões

São células especializadas do epitélio intestinal, exócrinas, altamente polarizadas e apresentam acúmulo apical de grânulos de secreção, sintetizam e secretam glicoproteínas por exocitose, sendo 80% de carboidratos e 20% de proteínas de alto peso molecular denominadas mucinas, além de água, eletrólitos e imunoglobulinas, gerando uma camada gelatinosa de muco, barreira física e química que protege o epitélio de agentes presentes no lúmen intestinal como bactérias, toxinas ambientais, compostos ingeridos na dieta e resíduos alimentares que possam ameaçar a integridade da camada mucosa (SPECIAN & OLIVER, 1991).

Alterações na camada de muco causam efeitos diretos à microbiota intestinal. A presença e a distribuição das células caliciformes (CC) e a constituição das mucinas produzidas por estas células variam espacialmente e temporalmente. As glicoproteínas mucinas são classificadas como neutras, ou ácidas. As CC com mucinas neutras aparecem em maioria na mucosa. As mucinas ácidas, as quais podem ser classificadas em dois subtipos, as não sulfatadas e as sulfatadas, protegem o intestino contra a translocação bacteriana e são menos degradadas pelas glicosidases das bactérias (DEPLANCKE & GASKINS, 2001).

A interação da bactéria com o muco configura importante mecanismo de proteção da superfície da mucosa, como observado por SHERMAN et al. (1987).

Alguns micro-organismos são capazes de regular a síntese e a secreção de muco pelo hospedeiro e muitos deles têm a capacidade de degradação deste muco (DEPLANCKE & GASKINS, 2001). Em estudos com galinhas infectadas pelo *Toxoplasma gondii,* houve um aumento da secreção proporcional de muco neutro no intestino (BONAPAZ et al., 2009, SHIRAISHI et al., 2009).

Enterites, diarreia, alimentos e/ou aditivos irritantes, desidratação, constipação intestinal são desafios ao epitélio do TGI, segundo WEST & RATH (2003), toda e qualquer agressão às células promove um aumento de muco como resposta à injúria na mucosa.

4.3 Células de Paneth na Mucosa Duodenal de Suínos

As células de Paneth são particularmente importantes para a imunidade inata contra patógenos, pois expressam receptores de reconhecimento de padrões, como por exemplo, NOD2, e outros peptídeos antimicrobianos, tais como lisozima, fosfolipases solúveis e defensinas, para a imunidade antiparasitária.

A interação entre fatores luminais de origem dietética ou bacteriana e a parede da mucosa é de suma importância para desencadear adequada imunomodulação da microbiota intestinal (ZENTEK et al., 2002). Os micro-organismos têm capacidade de interagir com a parede da mucosa e induzir reações e processos reguladores, influenciando a digestão, secreção, absorção, motilidade, mecanismos imunológicos, exclusão de antígenos, regulação do GALT- *Gut associated lymphoid tissue*, processamento de antígenos, sensibilidade, alergias e processos neuroendócrinos (CAVE, 2008).

A microbiota do TGI contribui para a perfeita saúde intestinal, pois promove alterações imediatas e de longo prazo, beneficiando o hospedeiro e contribuindo na defesa contra xenobióticos, devido aos efeitos tróficos similares aos da mucosa intestinal, a qual interfere no desenvolvimento e na competência do sistema imunológico (GUARNER & MALAGELADA, 2003; JIA et al., 2008).

O epitélio intestinal é composto pelos enterócitos conectados por junções, células caliciformes, células de Paneth, células M, enteroendócrinas e linfócitos intraepiteliais, além de células dendríticas (NEUTRA, 2001; BARNES; POWRIE, 2009; IZCUE et al., 2009).

O peristaltismo intestinal não constitui uma barreira propriamente dita, pois regula o TTI e o conteúdo luminal como enzimas, nutrientes e microbioma. O muco, rico em mucina, lactoferrina, lisozima e IgA atua como barreira seletiva, permitindo a difusão de moléculas de baixo peso molecular e dificultando a passagem de macromoléculas e micro-organismos. Já o glicocálix, distribuído nas microvilosidades, na região apical dos enterócitos, também funciona como impedimento físico (NEUTRA, 2001).

O intestino delgado está envolvido no equilíbrio hidroeletrolítico, na sinalização endócrina, na excreção e na desintoxicação, além da capacidade de digestão e absorção. As pregas da mucosa intestinal, vilosidades e micro vilosidades ao longo do órgão ampliam a área de absorção, quando intacta, para executar o papel de defesa e de barreira, prevenindo

a passagem de agentes e moléculas tóxicas (PIRLICH et al., 2006), bem como de fatores pró-inflamatórios do lúmen para a circulação (FARHADI et al., 2003).

Falhas na função intestinal decorrentes de injúrias na barreira epitelial, enzimática e imunológica podem levar à translocação, a qual, por sua vez provoca a sepse, com posterior falência múltipla dos órgãos (STEINBERG, 2003). O uso de prebióticos e probióticos associados às dietas previne a translocação bacteriana. As possíveis causas para essas alterações segundo relatos de WIEST & RATH (2003); ZANONI et al. (2009) devem-se às alterações brusca da microbiota intestinal, levando à proliferação dos micro-organismos, alterações físicas da barreira intestinal e falhas do GALT.

A mucosa do TGI representa uma interface entre o organismo e as substâncias ingeridas como alimento e eventuais contaminantes. Possui especificidade sob aspecto imunológico, visto que o organismo necessita tolerar elementos da dieta e, ao mesmo tempo, regular a passagem ou presença de substâncias e ou micro-organismos prejudiciais (SPAHN & KUCHARZIK, 2005).

A tolerância parece ser mediada pela modulação da produção de citocinas anti-inflamatórias e pela interação entre linfócitos T regulatórios e células apresentadoras de antígeno (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). O trato intestinal possui grande atividade imunológica. O GALT é o maior órgão imunológico do organismo, o que equivale a 25% das células da mucosa intestinal, com destaque para as dendríticas, células de defesa da lâmina própria.

De acordo com WIEST & RATH, (2003); ACHESON & LUCCIOLI, (2004) no intestino têm-se quatro compartimentos linfóides: as placas de Peyer e outros tecidos linfóides associados ao epitélio folicular, lâmina própria, linfócitos intraepiteliais e o nódulo linfático mesentérico. O epitélio folicular associado é constituído em sua maioria pelas células M, as quais não apresentam micro vilosidades ou glicocálix, possuem citoplasma prolongado com extensões para o interior da lâmina própria, formando um compartimento em que antígenos são fagocitados por macrófagos e penetram nas placas de Peyer (SAWAI et al., 2001). As placas Peyer são folículos linfóides que liberam linfócitos após o processamento de antígenos para sensibilização da imunidade da mucosa (HERMSEN et al., 2009), localizadas na porção distal do intestino delgado (KUDSK, 2002), visto que o íleo é o segmento intestinal que separa o jejuno, com escassa microbiota, do ceco, abundante em micro-organismos. Este fato justifica a maior concentração das placas de Peyer no íleo de

suínos. Destaca-se, também, a importante presença da válvula íleo-cecal evitando o refluxo de conteúdo cecal para o intestino delgado.

4.4 Mecanismo de proteção do trato gastrointestinal

O aparelho digestivo pela sua própria natureza está em permanente contato com agentes e substâncias do meio externo. Além de cumprir com a função de processamento, seleção e absorção de nutrientes, o sistema digestório deve evitar que agentes ou substâncias estranhas consigam se incorporar ao organismo. O ambiente do aparelho digestivo é geralmente hostil para a maioria dos agentes infecciosos. Alguns micro-organismos porém têm conseguido se adaptar e o meio digestivo lhe favorece. Estas circunstâncias fazem dele uma das mais prováveis portas de entrada assim como local de infecção por parte de muitos agentes infecciosos tanto primários como secundários (MORALES & CARDOSO, 2013).

KAMIMURA et al. (2006) relataram que do ponto de vista de fisiopatologia animal, o TGI é um relevante canal em contato indireto com o meio externo para a entrada de patógenos no organismo via alimentos e ou água, com riscos de causarem doenças. A MI benéfica, quando equilibrada, resulta em adequado funcionamento fisiológico do hospedeiro, o que irá intensificar a saúde intestinal e assegurar melhor qualidade de vida (SAAD, 2006; STEFE et al., 2008). As células inflamatórias estão presentes em pequena quantidade na lâmina própria do intestino delgado, predominando os macrófagos, eosinófilos, mastócitos, linfócitos e plasmócitos secretores de IgA, que atuam na proteção contra possíveis patógenos (KIERSZENBAUM et al., 2012).

O intestino delgado é protegido dos patógenos por uma cobertura de muco, uma barreira intestinal *tight junction* ligando enterócitos adjacentes, as placas de Peyer e as células M associadas ao epitélio intestinal, participando da vigilância celular de antígenos. A neutralização de antígenos por IgA produzidos por plasmócitos intestinais, e transportada para o lúmen intestinal pelos enterócitos por um mecanismo denominado de transcitose, e a inativação de agentes patogénicos microbianos por proteínas antimicrobianas, produtos das células de Paneth (KIERSZENBAUM et al., 2012).

5 OBJETIVO GERAL

Avaliar e mensurar os efeitos de aditivos nas rações sobre a renovação celular, as células caliciformes e de Paneth em leitões machos recém-desmamados.

REFERÊNCIAS

1. AARESTRUP, F. Get Pigs Off Antibiotics. **Nature**, v. 486, p. 564-466, 2012.

2. ALDRIDGE P. D., GRAY M. A., HIRST B. H., KHAN C.M.A. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. **Molecular Microbiology** , Oxford,v. 55, n. 3, p.655-663, 2005.

3. ACHESON, D.W.K.; LUCCIOLI, S. Mucosal immune responses. *Best Pract.* **Res. Clin.Gastroenterol**,[S.l] v. 18, p. 387-404, 2004.

4. ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMANCIO, A. L. L. ET AL. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasílica**, [S.l],v.1, n. 3, p. 69-77, 2007.

5. ARRIETA, M.C. BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J.B. **Alterations in intestinal permeability**. Gut, v. 55, p. 1512–1520, 2006.

6. AWAD, W.; GHAREEB, K.; BÖHM, J. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing Enterococcus faecium and oligosaccharides. International **Journal of Molecular Science**, Basel, v. 9, n. 11, p. 2205-2216, 2008.

7. BARNES, M.J.; POWRIE, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. **Immunity,** [S.l],v. 31, p. 401-411, 2009

8. BERTECHINI. A. G., **Nutrição de Monogástricos**. Lavras, MG: UFLA, 2006. 301p.

9. BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int**., Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

10. BJÖRKSTÉN, B. The gut microbiota: a complex ecosystem. **Clinical and Experimental Allergy**, v.36, p. 1215-1217, 2006.

11. BONAPAZ, R. et al. Effects of infection with *Toxoplama gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of *Gallus gallus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n.9, 787-79,2009

12. BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Pediatria** ,São Paulo, v. 28, p. 117-127, 2006.

13. BRASIL,MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento disponível em<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados> acesso em 04 janeiro de 2013

14. BREMNER, A.; JOHNSTON, M. Poultry meat: **Hygiene and inspection**. Edinburgh: Elsevier Science Limited, 2002.

15. CALLESEN, J. Effects of termination of AGP-use on pig welfare and productivity. In: Working Papers from the International Symposium: **Beyond Antimicrobial Growth Promoters Food Animal Production.** DIAS report Animal .Tjele: Denmark.2004 p.57-60

16. CAVE, N. J. Nutrition e Immunity. In: PIBOT,P. BIOURGE V. ; ELLIOT D.(Eds.).**Encyclopedia of Feline Clinical Nutrition** .2.ed. St Charles,:MO ,USA: Royal Canin, 2008 .p..480-506

17. COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Efeito de probiótico na resposta imune **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004.

18. CRESTANI, J. **Acidificantes e probióticos na alimentação de leitões recém desmamados.** 2008, 57f.Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

19. CRUZ, M. C. F. E FERREIRA, M. L. S. Controlo de resíduos nos animais e nos produtos de origem animal: **Revista da Ordem dos Médicos Veterinários**: segurança alimentar, v.1, p. 96-105, 2009.

20. DEPLANCKE, B., GASKINS, H. Microbial modulation of innate defense: Goblet cells and the intestinal mucus layer. Am. **Journal Clinical. Nutrition**, [S.l], v. 73, p.1131S – 1141S, 2001.

21. DUNNE, C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. Inflam. Bowel Dis. [S.l], v., n.2, p. 136-145, may, 2001.

22. DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; *et al*. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. **Journal. Clinical. Nutrition**, v. 73, p. 386S – 392S, 2001.

23. FAO/WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food, 66**, Report of the Joint FAO/WHO.** Expert Committee on Food Additives, 2006

24. FARHADI, A.; BANAN A.; FIELDS, J.; KESHAVARZIAN, A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. **J. Gastrienterol. Hepatol**.,[S.l] v. 18, p. 479-497, 2003

25. FERKET, P.R.; PARKS, C.W.; GRIMES, J.L. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. **Multi-State Poultry Meeting**, Atlanta, GA, USA May 14-16, 2002.

26. FRANKEL W. ZHANG W., et al. Fiber: effect on bacterial translocation and intestinal mucin content. **World Journal Surgery,** [S.l] ,v. 19, n.1, Jan-Feb, p. 144-148, 148-149, 1995.

27. GALDEANO, C. M.; DE MORENO DE LEBLANC, A. VINDEROLA, G.; BONET, M. E. B.; PERDIGÓN, G. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induce by Probiotic **Bacteria. Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 485–492, 2007.

28. GARCIA, G. R. et al. Inhibition of the growth of pathogenic bacteria by *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, p. 263 - 268, 2006.

29. GHELLER, N. B. T Prostaglandina F2 alfa associada à ocitocina ou carbetocina na indução de partos em suínos 2009. 50 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) -Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

30. GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of Probiotic. **Journal of Nutrition**, Bethesda, [S.l], v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

31. GOSSELIN, E. J.; CATE, C. C.; PETTENGILL, O.S.; SORENSON, G. D. Immunocytochemistry; its evaluation and criteria for its application in the study of epon-embedded cell and tissue. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 175, n. 2-3, p. 135-160, 1986.

32. GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet,** [s.l], v. 361, p. 512-19, 2003.

33. GUEDES, R., M C., BARCELLOS, D. Desenteria Suína, In Eds SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. Doenças dos Suínos, 2ª edição Goiânia: Cânone Editorial, 2012b, 128-134.

34. HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal,** v. 187, n. 2, p. 182-188, 2011

35. HERMSEN, J.L.; SANO, Y.; KUDSK, K. Food fight! Parental nutrition, enteral stimulation and gut – derived mucosal immunity. **Langenbecks Arch. Surg**.,[S.l], v. 394, p. 17-30, 2009

36. HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. **Introduction to pre- and probiotics**. Food Res. Int., Amsterdam, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

37. HENKER, J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; BOLBOT, Y. K.; MAYDANNIK, V. G.; ELZE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

38. IZCUE, A.; COOMBES, J.L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annu. Rev. Immunol**, [S.l],v.27, p. 313-338, 2009

39. JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Tradução de Eduardo Cesar Tondo et al. 6. ed. Porto Alegre, 2005. 712p.

40. JIA, W.; LI, H.; ZHAO, L.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. **Nature**,[S.l], v.7, p. 123-129, 2008

41. JIN, L.; HO,Y.W. et al. Probiotics in poultry **:** modes of action. **World´s Poultry Sci. J**., [S.l], v.53, p. 351-368.1997.

42. KAMIMURA, R., ARANTES V. M., BELETTI M. B., RIBEIRO D. P., SILVA D.A.O., SILVA N. M., JÚNIOR E. C. Efeitos de mananoligossacarídeo e colistina sobre a histomorfometria intestinal e níveis de IgA e IgG séricas em leitões.**Veterinária Notícias**, [S.l],v.12, n.2, p.153-160, dez. 2006.

43. KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci**., Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

44. KEERSMAECKER, S. C. J. et al. Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiology Letters,** Ames, v. 259, n. 1, p. 89 - 96, 2006.

45. KELLY D, CAMPBELl J.I., KING T.P., GRANT G., JANSSON E.A., COUTTS A.G., PETTERSSON S., CONWAY S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-γ and RelA. **Nat Immunol**, [S.l], v. 5,p. 104–112,2004

46. KIERSZENBAUM, ABRAHAM L., TRES L. **Histologia e biologia celular**: **uma introdução à patologia.** Tradução de Claudia Coana *et al.* 3.ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2012,p.704.

47. KOSIEWICZ M.M., ZIRNHELD A L, ALARD P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. www.frontiersin.org. **Front Microbial**, [S.l], v.2, p.1-11, 2011.

48. KUDSK, K. A. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. **Am.J. .Surg.** [S.l], v. 183, p. 390-398, 2002.

49. LEBEER S.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**,[S.l], v. 8, p. 171 - 184, 2010.

50. LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, n. 4, p. 728 - 764, 2008.

51. MAIORKA, A., SANTIN, E., SUGETA, S. M., ALMEIDA, J.G., MACARI, M. Utilização de prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [S.l], v. 3, n. 2, p. 75-82, 2001.

52. MARINHO M., SILVA B. G., MELO G. D., Determinação da microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da região noroeste do estado de São Paulo **Revista Veterinária e Zootecnia**,[S.l], v.15, n.2, supl. 1, ago., p.58, 2008.

53. MARTINS F. S.; DALMASSO G.; ARANTES R. M. E.; DOYE A.; LEMICHEZ E.; LAGADEC P.; IMBERT V.; PEYRON J.;RAMPAL P.; NICOLI J. R.; CZERUCKA D. Interaction of Saccharomyces boulardii with Salmonella enterica Serovar Typhimurium Protects Mice and Modifies T84 **Cell Response to the**, 2010.Disponivel em http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/ journal. pone .0008925.

54. MARTINS, F.S.; NARDI, R.M.D.; ARANTES, R.M.E.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J. AND NICOLI, J.R. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 51, 83-92, 2005b.

55. MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. Int. **Dairy J., Amsterdam**, [S.l], v.12, p.173-182, 2002.

56. MATHEW, A.G. et al. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. **J Anim Sci**, Savoy, v.71, n.6, p.1503-1509, 1993.

57. MENTEN, J. F. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., 2002, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia: CBNA, 2002. p. 251-276.

58. MENIN, A.; *et al.* Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, [S.l] ,v.38, n.6, p.1687-1693, 2008.

59. MIKKELSEN, L.L.; JAKOBSEN, M.; JENSEN, B.B. Effects of dietary oligosaccharide on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets post-weaning. **Animal Feed Science and Technology**, [S.l], v.109, p.133-150, 2003.

60. MONTEIRO, M. V.; CLIMENI, B. S. O.; SAMARONI, M. ZANATTA, J. Simbióticos como um Fator Alternativo na Suinocultura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária,** [S.l], v**.**10, janeiro de 2008.

61. MORALES & CARDOSO, 2013) Embrapa-Brasil publicações disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_morales.pdf>. Acesso em 05 de nov. 2013

62. MORAIS M. B. & JACOB C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, 2006, doi:10.2223/JPED.1559.

63. NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**., v. 39, p. 13–126, 1999.

64. NARESH R.; RAMPSON, D. J. Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. Microbiology 156; 191-187, 2010.

65. NEUTRA, M.R.; MANTIS, N.J.; KRAEHENBUHL, J.P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. **Nat. Immunol**.[S.l], v.2. n.11, p.1004-9, 2001.

66. NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S.C. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 2, p. 300-310, 2009.

67. NOVAK, F. R., ALMEIDA, J. A. G., VIEIRA, G. O. BORBA, L. M. Colostro humano: fonte natural de probióticos? **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 77, n. 4, p. 265-270, 2001.

68. NRC. **National Academy of Science**, [S.l],1998. 189p.

69. OECD-FAO. Organization for Economic Co-Operation and Development. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2009-2018**., p. 1 - 274, 2009.

70. PALERMO NETO, J. Considerações gerais sobre o uso de promotores de crescimento. In: SPINOSA, H.S; GÓRNIAK, S.L; BERNARDI, M.M (org). **Farmacologia Aplicada a Veterinária.** 5 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 608-628, 2011.

71. PALERMO NETO, J Fatos e mitos sobre antimicrobianos disponível em <http://www.flip3d.com.br/web/pub/avisite/index2/index.jsp> acesso em 17 de julho 2013.

72. PANCHENIAK, E. F. R. 2005. Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de Lactobacillus reuteri LPB P01-001 em suínos. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 154p.

73. PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H .Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171–1185, 2006.

74. PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics in poultry production**. Poultry Science,** [S.l], v. 82, p. 627-631, 2003.

75. PIRLICH, M.; NORMAN, K.; LOCHS, H.; BAUDITZ, J. Role of intestinal function in cachexia. **Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, [S.l], v.9, p. 603-606, 2006.

76. PFIZER, **Apresenta informações técnicas da empresa,**2007. Disponível em: <http://www.draxxin.com.br/uso_prudente.pdf>. Acesso em: 3 ago. 2012.

77. PLUSKE, J. R.. Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig. In: PIVA ,A. K. BACH KNUDSEN, E;LINDBERG, J.E.ed. **Gut Environment of Pigs**. Nottingham Univ. Press:Nottingham, UK, 2001,p.1-27

78. PLUSKE , J. R., D. W. PETHICK, D. E. HOPWOOD., AND D. J. HAMPSON. Nutritional influences on some major enteric bacterial disease of pigs. **Nutr. Res.** [S.l], V.15, p. 333-371, 2002.

79. PRICE P. **Residues meat instruction**: general background information. 2005 . Disponível em: <http://www.dardni.gov.uk/vphu-moc-chapter-05- residues.pdf .> Acesso em : 14 ago. 2011.

80. PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALDENTEY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci**. Technol., Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

81. REID G, Jass J, Sebulsky MT, Mc Cormick JK .Potential uses of Probiotics in clinical practice. **Clin. Microbiol**. [S.l],v. 16,p. 658-672,2003.

82. REID, G., HAMMOND, J.A., Probiotics. Some evidence of their effectiveness. **Canadian Family Physician**, [S.l], 51, 1487–1493.2005.

83. RILEY, M.A.Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetic**, [S.l], v. 32, p 255-278, 1998.

84. ROBERFROID M. B. (2007). "Prebiotics: The Concept Revisited". **Journal of Nutrition** 137 (3 Suppl 2): 830S–7S. PMID 17311983

85. SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n.1, p. 1-16, 2006.

86. SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu**. **Rev. Microbol**., [S.l], v.31, p.107-133, 1977.

87. SAWAI, T.; GOLDSTONE, N.; DRONGOWSKI, R.A. Effect of secretory immunoglobulin A on bacterial translocation in an enterocyte-lymphocyte co-culture model. **Pediatr. Surg. Inernational**, [S.l], v. 17, p. 275-279, 2001.

88. SHANE, S.M. Mannan oligosaccharides in poultry nutrition: mechanisms and benefi ts. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 2001, Lexington. **Proceedings...** Lexington, USA, 2000. p.65-77.

89. SHERMAN, T., ARMISTEAD, L. P., FOWLER, F, BARKSDALE, M. A., & REIF, G. The quest for excellence in university teaching. **Journal of Higher Education**, [S.l],v. 58.v.1 ,p.66-84, 1987.

90. SHIRAISHI, C.S.; AZEVEDO, J.F.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G.; ARAÚJO, E.J.A. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica 23 de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por Toxoplasma gondii. **Ciência Rural**, [S.l], v. 39, n. 7, p. 2146-2153, 2009.

91. SILVA, E. N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2., 2000, Campinas. **Anais**... Campinas: FACTA, p 241-251. 2000.

92. SILVA, C.A. et al. Uso de probiótico e de antibióticos na alimentação de leitões em fase de creche**. Semina:** ciências agrárias, [S.l], v. 28, n. 4, p. 739 - 746, 2007.

93. SOBKO, T.; HUANG, L.; MIDUEDT, T.; NORIN, E.; GUSTAFSSON, L. E.; NORMAN, M.; JANSSON, E. A.; LUNDBERG, J. O. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.l], v. 41, n. 6, p. 985-991, 2006.

94. SPAHN, T. W., and KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. **Gut 53,** [S.l], p.456-465,2004.

95. SPECIAN, R.D. and M.G. OLIVE, 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. **Am. J. Phisiol**., [S.l], v. 260,p. C183- C193,1991

96. SPRING, P. Yeast's secret weapon aids animal production. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL. 2000, Campinas. **Anais** Campinas: CBNA, 2000. p. 41-50.

97. STEINBERG, S. M. Bacterial translocation: what it is and what it is not. **Am. J. Surg**, **186**, [S.l], p.301-305,2003.

98. STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos – Artigo de Revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008.

99. SWEDEN, Ministry of Agriculture (SOU). **Antimicrobial Feed Additives**. Report from the Commission on Antimicrobial Feed Additives. SOU 1997 p.132. 1997.

100. TRABULSI, L.R., SAMPAIO, M.M.S.C. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. Os Probióticos e a Saúde Infantil, v. 1, Brasil: Nestlé Ltda., 2000, p. 3-11.

101. TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by lactobacillus pentosus st712bz isolated from boza. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 166 - 172, 2007.

102. TODOROV, S. D. Bacteriocins from lactobacillus plantarum - production, genetic organization and mode of action. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 40, p. 209 - 221, 2009.

103. VANDENPLAS Y, VEEREMAN-WAUTERS G, DEGREEF E, et al. Probiotcs and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. **J Pediatr** ,Rio de Janeiro, v.4, n.87,p. 292-300,2011.

104. VANNUCCI, F. A. ; GUEDES, R. M. C.. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Cienc. Rural** ,[S.l], v.39, n.7, p. 2233-2242 ,2009.Disponivél em : <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-Acesso em : 21 ago. 2011.

105. WIEST, R.; RATH, H.C. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract.Res.* **Clin.Gastroenterol**., [S.l], v. 17, n. 3, p. 397- 425, 2003.

106. YU LCH. Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. **J Allergy,** [S.l],p.11, 2012;

107. ZANONI, F.L.; BENABOU, S.; GRECO, K.V.; MORENO, A.C.R.; CRUZ, J.W.M.C.; FILGUEIRA, F.P.; MARTINEZ M. B.; FIGUEIREDO L.F.P.; SILVA M. R. SANNOMIYA P. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bactéria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. **Clinics**, [S.l],v. 64, n. 9, p. 911-919, 2009.

108. ZENTEK, J., HALL, E. J., GERMAN, A., HAVERSON K., BAILEY, M., ROLFE, V., BUTTERWICK, R. ; DAY, M. J. Morphology and immunopathology of the small and large intestine in dogs with nonspecific dietary sensitivity. **Journal of Nutrition,** [S.l],v.6,n.132 ,p1652s-1654s.2002[a].

CAPÍTULO 2 – DINÂMICA CELULAR DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO DE LEITOES DE 65 DIAS DE IDADE, ALIMENTADOS COM PROBIÓTICO, PREBIÓTICO, SIMBIÓTICOS E ANTIMICROBIANO COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO

RESUMO

Objetivou-se avaliar a renovação celular correlacionando com os aditivos preconizados como moduladores da microbiota intestinal. O experimento foi realizado em uma granja comercial, utilizou-se 480 leitões machos desmamados castrados, em cinco tratamento, com 8 repetições, sendo que o basal teve o dobro de repetições. Sendo, T1=dieta basal, denominado de controle negativo, T2=T1+ antimicrobiano, T3=T1+probiótico *Scchacaromyces cerevisae* T4=T1+prebiótico MOS, T5=T1+probiótico *Scchacaromyces cerevisae* + o prebiótico MOS. O período experimental foi do desmame 21 dias até os 65 dias de idade. A dieta foi a base de milho e farelo de soja mais um suplemento vitamínico mineral. Foi utilizado na análise estatística o teste de comparação múltipla de *Bonferroni*, após análise pelo teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov.* Os tecidos do duodeno foram fixados em formol e incluídos em parafina, fez-se as lâminas por rotina histológica. Por imunoistoquímica marcou as áreas para PCNA positiva, as imagens depois de capturadas foram segmentadas por "threshold" formando a imagem binária para avaliação. Não se observou alterações significativas na quantidade de células PCNA positivas nos diferentes cortes intestinais. Os aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antimicrobianos promotores de crescimento não alteraram a proliferação celular na mucosa do intestino delgado de leitões, comparando-se ao tratamento controle negativo. Provavelmente devido a rápida renovação do epitélio da mucosa intestinal, os aditivos testados não foram eficientes em intensificar a dinâmica de mais células no período experimental.

Palavras-chave: Cripta. Mucosa Intestinal. Proliferação Celular. Renovação epithelial. *turnover* cellular.

CHAPTER 2 – DYNAMIC CELL OF THE SMALL INTESTINE MUCOSA FROM 65 DAYS OLD MALE PIGLETS FED PROBIOTICS, PREBIOTICS, SYNBIOTICS AND ANTIMICROBIAL AGENT ASGROWTH PROMOTERS

ABSTRACT

The objective of this paper was to evaluate the cellular renovation correlating with the additives recommended as modulators of the gut microbiota. The experiment was conducted in a commercial farm, where 480 weaned and castrated males piglets were used, in five treatments, being T1= basal diet, T2=T1+ antimicrobial agent, T3=T1+probiotics *Sacchacaromyces cerevisae*, T4=T1+prebiotics MOS and T5=T1+probiotics + prebiotics. The experimental period was from weaning at 21days to 65 days old. Diet was based on corn and soybean meal plus a supplement of minerals and vitamins. The test of Bonferroni multiple comparison after analysis by the Kolmogorov-Smirnov test was used for statistical analysis. Tissues rom small intestine were fixed in formaldehyde and impregnated in paraffin. Slides were prepared by histological routine. By means of immunohistochemistry areas for positive PCNA were marked. Significant changes in quantity of positive PCNA cells were not observed in the different intestinal cuts. Additives prebiotics, prebiotics, synbiotics and promoting growth promoters did not change the cell proliferation in mucosa of the small intestine of piglets, comparing themselves to the treatment of the negative control. Probably, due to the rapid renovation of the epithelium from intestinal mucosa, additives tested were not efficient in enhancing the proliferation of more cells in the experimental period.

Key words: Crypt. Intestinal Mucosa. Cell Proliferation. Epithelial Renovation. Cell Turnover.

1 INTRODUÇÃO

Os processos de absorção e digestão são totalmente dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal e também da integridade das estruturas celulares (SANTOS, 2010).

O processo normal de renovação celular na mucosa intestinal é decorrente de dois eventos citológicos primários associados: renovação celular (proliferação e diferenciação) resultantes das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes localizadas na cripta e ao longo dos vilos e perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos (UNI et al., 1996).

O aumento na altura das vilosidades e na profundidade das criptas na mucosa do intestino delgado de suínos suplementados com butirato de sódio, levou a uma melhoria da morfologia da mucosa intestinal podendo ser explicado pelas mudanças nos perfis da microbiota intestinal, aumento do consumo de fibra em detergente ácido-CFDA, baixos níveis de citocinas séricas como TNF-α e IL-6 em leitões recém-desmamados (LU et. al., 2008).

O tamanho dos vilos depende do número de células que o compõem. Espera-se que o maior número de células, promova maior tamanho dos vilos, e pôr consequência; maior será a área de absorção de nutrientes. Outro fator muito relevante para absorção dos nutrientes na membrana luminal é a quantidade de microvilos existentes nos enterócitos (BOARO, 2009).

Os microrganismos probióticos podem contribuir com a barreira intestinal, diminuindo a translocação bacteriana, que corresponde à migração de bactérias viáveis através da mucosa intestinal para dentro da circulação, podendo levar à septicemia e óbito (PARVEZ et al., 2006). Essa transmigração bacteriana pode ser favorecida pela atrofia da mucosa (ACAMPORA et al., 2004).

O uso de alimentos fibrosos recomendado com a finalidade de melhorar o bem-estar animal, elevando o teor de ácidos graxos voláteis-AGV nos intestinos. Como o aumento do índice de renovação das células no epitélio, aumento do fluxo de sangue do cólon. Também participa da multiplicação celular do epitélio do intestino. Assim aumenta o muco que protege a parede do mesmo, e modifica a motilidade do intestino (BRUNSGAARD, 1998).

O processo de renovação celular (proliferação, diferenciação, morte e extrusão) consiste de um evento geneticamente programado, detectado normalmente durante processos de regulação do desenvolvimento e da renovação celular (MELLO *et al*., 2001). A renovação celular pode ser induzida ou antecipada, processo este conhecido como apoptose celular (GERSCHENSON e ROTELLO, 1992)

Relatos de SANTOS *et al*., (2013) verificaram os efeitos de diferentes tipos de probióticos, a altura das vilosidades no duodeno apresentou-se maiores quando receberam microbiota indefinida e um simbiótico.

Os probióticos modulam a microbiota intestinal pela inibição da colonização desta mucosa por patógenos, principalmente, pela exclusão competitiva e pela produção de compostos antimicrobianos, produção de mucina e diminuição do pH da digesta (KAUR, et al., 2002; GUARNER & MALAGELADA, 2003; MORAIS & JACOB, 2006; SOBKO et al., 2006).

Os simbióticos visam equilibrar a microbiota, por melhorar o suprimento alimentar das bactérias benéficas, em prejuízo das indesejáveis. Em consequência, há redução da incidência de doenças, melhor absorção, maior biodisponibilidade dos nutrientes e melhor desempenho zootécnico (MONTEIRO *et al*., 2008).

Os antimicrobianos são usados na nutrição animal nas últimas quatro décadas para melhorar o ganho de peso, a eficiência alimentar e protegendo os animais dos efeitos adversos dos micro-organismos entéricos patogênicos e não patogênicos (FERKET et al., 2002).

Várias proteínas nucleares participam da replicação de DNA, incluindo ciclinas *proliferating cell nuclear antigens*- PCNA, ou antígeno nuclear de proliferação celular, um grupo de proteínas que se acumulam progressivamente durante a interfase e são degradadas ao final da mitose (HALL & LEVISON, 1989).

No intestino delgado, as células estaminais localizadas na região das criptas diferenciam-se em enterócitos, células enteroendócrinas e células caliciformes. Estas células especializadas migram de forma ascendente ao longo das vilosidades intestinais e eventualmente sofrem apoptose, ou são expulsas para o lúmen intestinal. As células de Paneth, cuja função envolve a defesa contra micro-organismos do lúmen, movem-se para baixo, no sentido da base das criptas. As ligações dos probióticos com o epitélio intestinal pelas células de Paneth e caliciformes estimulam a produção de defensinas e muco,

substâncias importantes para a proteção das superfícies mucosas contra a invasão por patógenos (LEBEER, et al., 2010).

Objetivou-se avaliar a porcentagem de células em proliferação na mucosa intestinal de leitões machos aos 65 dias de idade mediante a inclusão de probiótico, prebiótico, simbiótico, e antimicrobiano promotor de crescimento na dieta após o desmame**.**

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e animais

Conduziu-se o experimento em uma granja de reprodutores suídeos certificada (GRSC), localizada na cidade de Pedra Preta-MT, Rodovia BR 364, KM 118, no período de maio a junho de 2010.

Utilizaram-se 480 leitões, machos castrados, desmamados com 21 dias de idade, abatidos aos 65 dias de idade e da mesma linhagem. Após o desmame, os animais foram transferidos para galpão de creche construído em alvenaria, contendo duas salas de 160 m^2 cada uma. O galpão era coberto por telhas de barro, com piso de concreto, sem forro, pé direito de 3,20 metros. Nas laterais das salas, havia cortinas em toda extensão. Em cada sala, havia 24 gaiolas metálicas coletivas medindo 1,80m X 2,00m (3,6 m^2/gaiola) com laterais, e piso parcial, de grade metálica e suspensas do chão com capacidade para 10 leitões/ gaiola. As gaiolas eram equipadas com comedouro coletivo na extensão da lateral da baia e bebedouros tipo chupeta.

Os leitões foram alojados aleatoriamente nas gaiolas, em cinco tratamentos distintos, de acordo com a dieta:

T1 = dieta basal;
T2 = T1 + 100 ppm de Avilamicina;
T3 = T1 + 2000 ppm *Saccharomyces cerevisae*;
T4 = T1 + 1000 ppm de MOS;
T5 = T1 + 2000 ppm *Saccharomyces cerevisae* + 1000 ppm de MOS

As rações foram formuladas pelo Departamento de Nutrição da granja, que estabeleceu quatro programas nutricionais, em função da idade dos leitões (Tabela 1), sendo: Pré-inicial 1 (PI 1) de 21 a 28 dias idade, Pré-inicial 2 (PI 2) de 29 a 35 dias de idade, Inicial 1 (I 1) de 36 a 46 dias de idade e Inicial 2 (I 2) de 47 a 65 dias de idade.

Os animais receberam dietas experimentais isocalóricas e isoproteícas em cada fase alimentar, formuladas para atender às exigências nutricionais dos leitões no período de

creche (21 a 65 dias), segundo o manual da linhagem genética, por se tratar de uma granja GRSC.

Tabela 1 – Composição percentual e calculada das dietas basais nas fases pré-inicial 1 (PI1), pré-inicial 2 (PI 2), Inicial 1 (I 1) e Inicial 2 (I 2), para leitões desmamados com média de 21 dias, Granja Petrovina-MT, julho 2010.

INGREDIENTE (%)	21-28 dias	29-35 dias	36-46 dias	47-65 dias
Milho grão	21,8	32,4	44,3	58,95
Nc.L. Aurotron 600	60,0			
Nc.L. Aurotron 400		40,0		
Nc.L. Aurotron 250			25,0	
Nc.L. Aurotron 50				5,0
Óleo de soja	4,0	2,8		
Farelo de soja 46% PB	11,2	20,8	25,7	30,0
Açúcar cristal	1,0	2,0	3,0	4,0
Nc En. Suínos (100kg/t)	2,0	2,0	2,0	2,0
L-Lisina 78%				0,05
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0
NUTRIENTE				
Proteína bruta %	19,81	20,03	20,08	19,10
Extrato etéreo %	6,62	6,78	6,30	6,27
Fibra Bruta %	1,92	2,39	2,58	2,73
Cinza %	6,87	6,34	6,16	6,90
Cálcio %	0,85	0,79	0,76	0,80
P.total %	0,70	0,68	0,64	0,65
EM suínos Kcal/kg	3.452	3.452	3.434,41	3.407
Lisina Total %	1,54	1,43	1,33	1,22

*Núcleo Aurotron 600: Fe 396,98 mg; Mn 121,34 mg; Zn 4454,38 mg; Cu 245,69 mg; Iodo 1,69 mg; Se 1,46 mg; Vit A 10.800 UI; Vit D_3 2.250 UI; Vit E 45 mg; Vit K_3 3,60 mg; Vit B_1 1,80 mg; Vit B_2 7,56 mg; Vit B_6 3,60 mg; Vit B_{12} 27 mcg; Biotina 126 mcg; Colina 502,26 mg; Metionina 5,34 g; Lisina 17,30 g; Antioxidante 224,85 mg; Sódio 5,96 g; Ácido Fólico 0,63 mg; Ácido Pantotênico 2,16 mg; Niacina 54 mg. .*Núcleo Aurotron 400: Fe 215,05 mg; Mn 182,19 mg; Zn 6.655,50 mg; Cu 361,06 mg; Iodo 2,25 mg; Se 0,68 mg; Vit A 13.500 UI; Vit D_3 2.812,50 UI; Vit E 56,26 mg; Vit K_3 4,50 mg; Vit B_1 2,25 mg; Vit B_2 9,45 mg; Vit B_6 4,50 mg; Vit B_{12} 33,75 mcg; Biotina 157 mcg; Colina 1.665 mg; Metionina 7,06 g; Lisina 16,80 g; Antioxidante 337,56 mg; Sódio 5,85 g; Ácido Fólico 4,21 mg; Ácidos Pantotênico 27 mg; Niacina 67,50 mg. *Núcleo Aurotron 250: Fe 344,09 mg; Mn 215,53 mg; Zn 7.818,34 mg; Cu 577,69 mg; Iodo 3,6 mg; Se 1,08 mg; Vit A 21.600 UI; Vit D_3 4500 UI; Vit E 90 mg; Vit K_3 7,2 mg; Vit B_1 3,60 mg; Vit B_2 15,12 mg; Vit B_6 7,20 mg; Vit B_{12} 54 mcg; Biotina 252 mcg; Colina 381,87 mg; Metionina 6,99 g; Lisina 17,26 g; Antioxidante 395,77 mg; Sódio 8,10 g; Ácidos Fólico 6,81 mg; Ácido Pantotênico 43,20 mg; Niacina 108 mg. *Núcleo Aurotron 50: Fe 1.796 mg; Mn 1,077 mg; Zn 2.700 mg; Cu 3.776 mg; Iodo 18 mg; Se 5,40 mg; Vit A 108.000 UI; Vit D_3 22.500 UI; Vit E 450 mg; Vit K_3 36 mg; Vit B_1 18 mg; Vit B_2 75,60 mg; Vit B_6 36 mg; Vit B_{12} 270 mcg; Biotina 1.260 mcg; Colina 2.079 mg; Metionina 15,70 g; Lisina 35 g; Antioxidante 200 mg; Sódio 34,20 g; Ácido Fólico 6,30 mg; Ácido Pantotênico 216 mg; Niacina 540 mg.

2.2 Colheita dos Fragmentos de Intestino Delgado e reação de Imunoistoquímica para PCNA

Em um frigorífico foram abatidos 25 leitões com idade média de 65 dias, e, na linha de inspeção das vísceras, colheram-se anéis circulares de dois cm do intestino delgado dos segmentos duodeno, jejuno e íleo. Colheram-se os segmentos abertos, eles foram lavados com soro fisiológico, fixados em cortiça, com auxílio de alfinetes, acondicionados em formol tamponado a 10% ficaram por 24 h em geladeira para uma boa fixação. Posteriormente as lâminas foram processadas por rotina histológica no Laboratório de Histologia da UFU, local onde também foram feitas as reações de imunoistoquímicas.

Para detecção de células intestinais em mitose adotou-se a técnica de imunoistoquímica com aplicação do anticorpo monoclonal anti PCNA- *Proliferating Cell Nuclear Antigen* conforme GOSSELIN *et. al* (1986). Os tecidos foram fixados com formol 10% tamponado e incluídos em parafina. Os cortes foram desparafinados em xilol absoluto PA, três passagens por 15 min por cuba, reidratados em álcoois decrescentes 100%, 95%, 70%, 30 S por cuba. Em seguida foram hidratadas em água destilada por três min, e deixados em solução de PBS por um min.

Bloqueou-se a peroxidase endógena com água oxigenada a 5% em câmara úmida por 20 min, as lâminas foram cobertas com parafilm; posteriormente enxaguou em PBS por cinco min. Para o resgate antigênico, colocaram-se as lâminas em cuba com tampão citrato pH 6,0, e posteriormente foram levadas ao micro-ondas na potência máxima durante seis min.

Após o resfriamento das lâminas por 30 min, lavaram-se duas vezes em PBS, 3 min por lavagem, escorreram-se bem as lâminas. Usando o bloqueador de proteínas (Biocare's Background Sniper®)* 100µL/corte, e As lâminas foram cobertas com parafilm, depois incubadas a temperatura ambiente (TA) em câmara úmida durante 15 min, e posteriormente enxaguadas com PBS.

Adicionou-se o anticorpo 1$^{\underline{\text{ário}}}$ monoclonal da Biocare (anti-PCNA) – 100 a 150 µL/corte – cobriu-se com parafilm. Incubaram-se por 60 min em câmara úmida à TA em ambiente escuro.

As lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS por dois min/enxague, escorreram-se as lâminas. Adicionou o anticorpo 2$^{\underline{\text{ário}}}$ universal (Trekkie Universal Link

Biocare®) 100 a 150µL/ corte, cobriram-se as lâminas com parafilm. Foram incubadas durante 20 min em câmara úmida em TA.

Passaram por dois enxagues duas vezes em PBS, por dois min cada, escorreram-se as lâminas. Para amplificação da reação adicionou o complexo ABC (Trek Avidin-HRP Label Biocare®) – 100 a 150µL/ corte, cobriu-se com parafilm, incubaram-se em câmara úmida à TA durante 10 min. Passaram-se por dois enxagues duas vezes em PBS, dois min cada, escorreram-se as lâminas.

Revelou com DAB (Betazoid DAB Chromogen Solution Biocare ®) durante um min ou até ficar amarronzado – usaram-se 500µL/ lâmina desta solução. Enxaguaram-se em PBS por três min, lavou-se em água corrente por 10 min, desidratou-se em sequência de álcoois crescentes, diafanizou em xilol absoluto PA, passando por três cubas, as lâminas foram montadas com lamínula e Entelan. Para controle negativo, fez reação de imunoistoquímica sem adição do anticorpo primário.

Montou-se uma lâmina por animal. De cada lâmina foram capturadas dez imagens digitais de células PCNA-positivas focando as áreas das criptas, após o processamento das imagens, áreas positivas para PCNA foram expressas em porcentagem.

A análise quantitativa das células PCNA positivas foi realizada na região das criptas do duodeno, jejuno, e íleo.

Com o auxílio de um microscópio de luz Leica DM500 com câmera de captura de imagens Leica ICC50, as imagens foram capturadas em aumento de 40 vezes, depois segmentadas por *threshold* formando-se imagens binárias onde as áreas marcadas ficaram negras, e as não marcadas em branco Utilizando o programa de análise de imagens HL_Image 97 (Western Vision Softwares) foi feito automaticamente a mensuração das áreas marcadas.

2.3 Delineamento Experimental

No dia do desmame, os leitões foram distribuídos em DIC ao acaso em cinco tratamentos, com oito repetições, o tratamento controle negativo teve número dobrado de animais, sendo a unidade experimental representada por unidade de leitão, totalizando 480 leitões.

2.4 Análise Estatística

Para as análises entre grupos, foi utilizado o teste de comparação múltipla de *Bonferroni,* após análise pelo teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, sendo o P considerado significativo quando menor que 0,05

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os aditivos experimentais não influenciaram a média da porcentagem de células em proliferação, denominadas de PCNA-positivas, na mucosa do duodeno, do jejuno e do íleo dos leitões. Entretanto, no duodeno observou-se a maior média de PCNA positiva em relação ao jejuno e íleo. Este resultado possivelmente ocorreu devido à maior taxa metabólica do duodeno, que serve também para ancorar as glândulas de *Brünner*.

Dados de REECE DUKES (2006) relatam que o epitélio entérico tem a taxa de renovação mais elevada dentre todos os tecidos normais no organismo, diferindo conforme a idade. Suínos recém-nascidos substituem o epitélio do intestino delgado em sete a 10 dias, enquanto que, a renovação ocorre em 2-4 dias nos suínos com 21 dias de idade. A energia não gasta pelo reduzido *turnover* de células no epitélio intestinal poderia ser utilizada para o desenvolvimento da massa muscular.

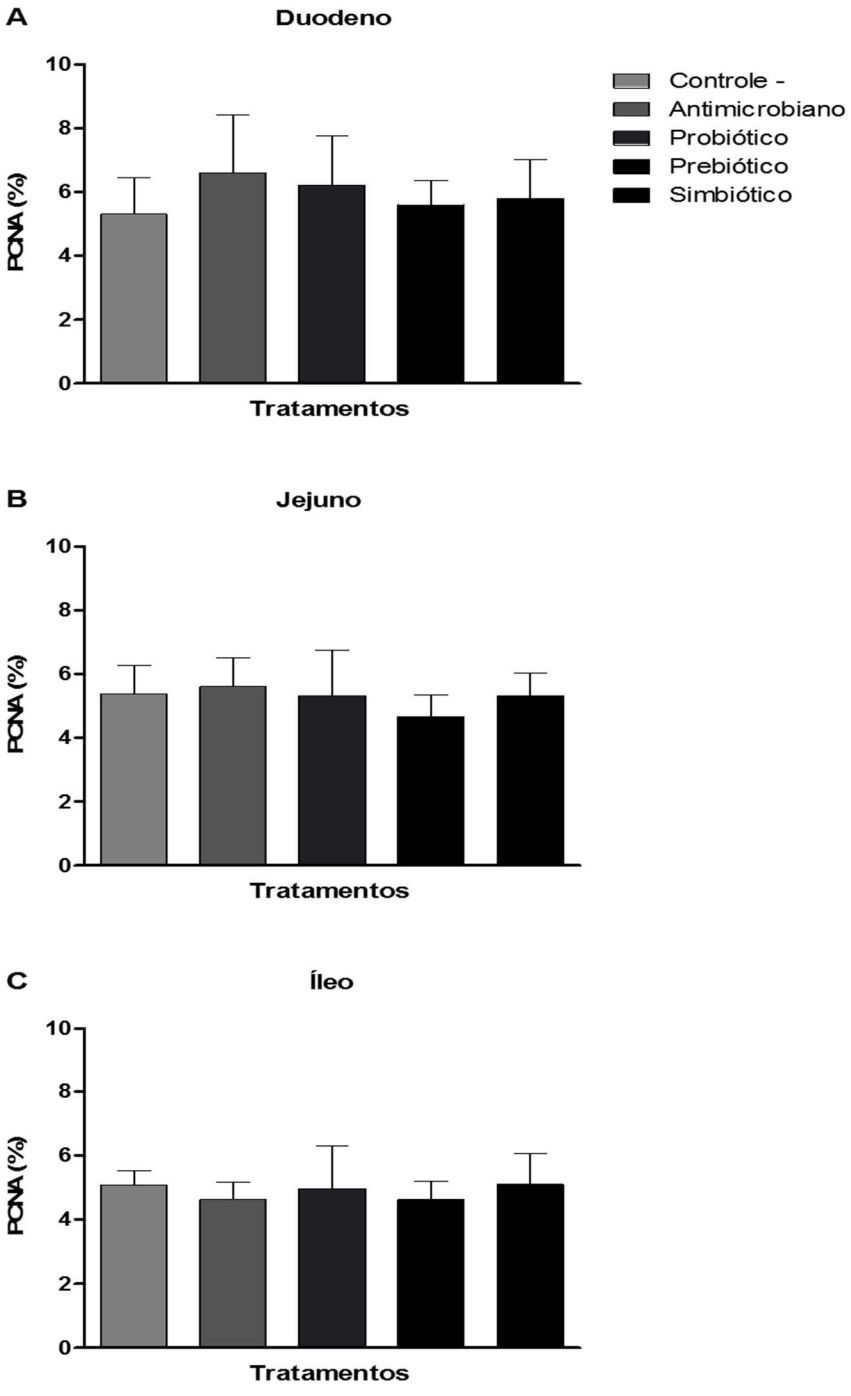
A camada única de células epiteliais que recobre os intestinos desde as criptas até as extremidades das vilosidades, forma uma lâmina contínua por todo o órgão. Estas células são constantemente renovadas a partir de células tronco nas criptas, de forma que as células epiteliais, os enterócitos são substituídas a cada 3 dias. A pronta regeneração celular ajuda o intestino a cicatrizar uma lesão com rapidez, mas o *turnover* contínuo de células exige uma grande ingestão de nutrientes pelo hospedeiro. Estas células usam 10 a 20% do gasto total de energia do corpo e utilizam até 50% do *turnover* proteico corporal de alguns aminoácidos essenciais (LAFLAMME, 2008).

Esperava-se uma proliferação mais acentuada nos tratamentos T4 e T5 com prebiótico devido os relatos de KIEN *et al*. (2007) de que o butirato traz muitos benefícios para os suínos em relação ao bem-estar, já que o gás regula o crescimento das células epiteliais, induz a diferenciação e renovação celular no intestino, principalmente nos suínos mais jovens. Também aumenta a capacidade de absorção e digestão no intestino delgado (CLAUS *et al*., 2007), regula o crescimento epitelial e ao mesmo tempo suprimindo o crescimento de células cancerígenas (PIVA *et al*., 2002). Assim, o butirato se torna a maior fonte de energia para células epiteliais, promovendo a saúde intestinal do suíno e ao mesmo tempo suprime o crescimento de células cancerígenas (PIVA *et al.*, 2002). Assim, o butirato se torna a maior fonte de energia do lúmen intestinal para as células epiteliais, promovendo a saúde intestinal do suíno.

A adição de algumas substâncias específicas na dieta, são utilizadas na intenção de reverter atrofias e ou promover melhorias na mucosa intestinal, como a utilização de glutamina na nutrição parental total (ALPERS, 2002). Na mesma linha de raciocínio foi observado por McCLLOUGH *et al*. (1998), que a adição de fibras na dieta dos animais promoveu um aumento do número de cripta e vilosidades.

As pesquisas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e ácidos orgânicos, até o presente, apresentam resultados muito contraditórios. A discrepância dos resultados pode ser decorrente das diferentes composições e combinações de microrganismos e cepas, no caso dos probióticos, ou devido a diferentes combinações de tipos e formas de ácidos. No geral, os métodos de preparação dos produtos, níveis de inclusão, formas de administração e condições ambientais também influenciam nos resultados (FERNANDES, 2012).

Figura 1 - Células marcadas por reação de PCNA positiva. Porcentagem de PCNA positiva na região da cripta do ID de leitões aos 65 dias de idade submetidos a cinco tratamentos, sendo A-Duodeno, B-Jejuno, C-Íleo.



Fonte: O próprio autor.

4 CONCLUSÃO

A inclusão de probióticos, prebióticos, simbióticos ou antimicrobianos promotores de crescimento na dieta de leitões não alteraram a proliferação celular na mucosa do intestino delgado de leitões comparando-se ao tratamento controle negativo.

REFERÊNCIAS

1. ACAMPORA, A. J.; ORTELLADO, D. K.; CARVALHO, R. O M.; SERAFIM, J. D. M.; FARIAS, D. C.; TRAMONTE, R. Atrofia mucosa/translocação bacteriana na sepse experimental em ratos Wistar. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n.5, p. 478-486, 2004.

2. ALPERS D. H. Enteral Feeding and Gut atrophy **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**. London, n. 5, v.6, p 679-83, 2002.

3. BRUNSGAARD, G. Weaning and the weaning diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short chain fatty acids in the large intestine and blood. **Journal of Animal Nutrition**, v.128, p.947–953, 1998.

4. CLAUS R., GüNTHNER D.; LETZBUß H. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.91, p.312-318, 2007.

5. FERKET, P.R., PARKS, C.W.; GRIMES, J.L. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. **Multi-State Poultry Meeting**, Atlanta, GA, USA May 14-16, 2002.

6. FERNANDES B. C. S., 2012 Dissertação Integridade intestinal e desempenho de frangos de corte suplementados com probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos 40 f. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, 2012 disponível em http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/99585/fernandes_bcs_me_botfmvz.pdf?sequence=1

7. GARCIA, R. e L.; COLTRERA, M. D.; GOWN, A. M., Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies indexed, embedded tissues: comparison with ow cytometric analysis, **American Journal of Pathology**, Seattle, v. 134, n. 4, pp. 733-739, April 1989.

8. GERSCHENSON, R.E.; ROTELLO, R.J. Apoptosis a different type of a cell death. **The FASEB Journal**, v.6, p.2450-55, 1992

9. GOSSELIN, E. J.; CATE, C. C.; PETTENGILL, O. S.; SORENSON, G. D. Immunocytochemistry: Its evaluation and criteria for its application in the study of epon-embedded cell and tissue. **American Journal of Antomy**, Philadelphia, v. 175, n. 2-3, p. 135-160, 1986.

10. GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet,** v. 361, p. 512-19, 2003.

11. HALL, P. A.; LEVISON, D.A., **Assessment of Cell Proliferation Histological Material**, London, p. 184-192, Sep.1989.

12. KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci**., Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

13. KIEN, C.L.; BLAUWIEKEL, R.; BUNN, J.Y.; JETTON, T.L.; FRANKEL, W.L.; HOLTS, J.J. Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. **Journal of Nutrition**, v.137, p. 916- 922, 2007.

14. LAFLAMME, D. O trato gastrointestinal: sua dupla função como sistema digestivo e de proteção nos cães. In: Sistemas de Proteção Natural em Caninos Proplan Purina, 2008 p. 18-35.

15. LEBEER S.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 171 - 184, 2010.

16. LU J.J., ZOU X.T., WANG Y.M. Effects of sodium butyrate on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. **Journal of Animal and Feed Sciences**. v. 17, 568–578, 2008.

17. McCULLOUGH J. S., RATCLIVE B., MANDIR N., CARR K. E., GOODLAD R. A., Dietary fibre and intestinal microflora: Vects on intestinal morphometry and crypt branching. **Gut**; v.42:799–806, 1998.

18. MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S. Morte celular. In: CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula** 2001. 1ª ed. Barueri: Manole, 2001. p. 275-81

19. MONTEIRO, M. V.; CLIMENI, B. S. O.; SAMARONI, M. ZANATTA, J. Simbióticos como um Fator Alternativo na Suinocultura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária,** v.10, 2008.

20. MORAIS M. B.; JACOB C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, 2006, doi:10.2223/JPED.1559.

21. PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171–1185, 2006.

22. PIVA A., MORLACCHINI M., CASADEI G., GATTA P.P., BIAGI G., PRANDINI A., Sodium butyrate improves growth performance of weaned piglets during the first period after weaning. **Italian Journal of Animal Science,**1, 35-41, 2000.

23. REECE, W.O. DUKES- **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006. 926.

24. SANTOS, J. R.; TAKAHASHI, S. E.; MENDES, A. S.; CARVALHO, E. H.;

FREITAS, E. Morfometria de frangos de cortes alimentados com diferentes tipos de probióticos. In: Conferência FACTA, 2013. Campinas. Anais... 2 9 Campinas: Fundação APINCO de ciência e tecnologia avícolas, 2013. CDROM.

25. SILVA N. E.O. **Nutrição do intestino, imunidade intestinal e resistência a parasitas do intestino em cães**. 2009, f. Tese (Doutorado em veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

26. SOBKO, T.; HUANG, L.; MIDUEDT, T.; NORIN, E.; GUSTAFSSON, L. E.; NORMAN, M.; JANSSON, E. A.; LUNDBERG, J. O. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 6, p. 985-991, 2006.

27. TREEM, W.R., AHSAN, N., SHOUP, M., HYAMS, J.S., Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**. 1994, 18(2):159-164.

28. UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Development of the small intestine in heavy and light starin chickes before and after hatching. British Poultry Science, v.36, p.63-71, 1996.

29. WANG, Y., SRINIVASAN, K., SIDDIQUI, M.R., GEORGE, S.P., TOMAR, A. ; KHURANA, S. Anovel role for villin in intestinal epithelial cell survival and homeostasis. **Journal of Biology and Chemistry**,[S.l], v.14, n.283, p. 9454-9464,2008.

30. WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, [S.l], v.8, n. 128, p.1249-1252, 1998.

31. YASAR, S.; FORBES J.M. Performance and gastro-intestinal response of broiler chickens fed on cereal grain-based foods soaked in water. **British Poultry Science.** ,[S.l], v.40,p.65-76,1999.

32. ZIEGLER, T.R., EVANS, M.E., ESTÍVARIZ, C.F.; JONES, D.P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annual Review of Nutrition**, [S.l], 23, 229-261, 2003.

CAPÍTULO 3 – QUANTIDADE E PERFIL DE MUCO DAS CÉLULAS CALICIFORMES NO INTESTINO DELGADO DE LEITÕES COM 65 DIAS DE IDADE ALIMENTADOS COM DIFERENTES DIETAS

RESUMO

Avaliou-se neste estudo a influência dos aditivos melhoradores de desempenho na quantidade e tipo de muco das células caliciformes presentes no intestino delgado de leitões machos castrados, abatidos aos 65 dias de idade. Conduziu-se o experimento em uma granja de reprodutores suídeos certificada, aplicou-se o delineamento inteiramente casualizado, utilizando 480 leitões machos castrados, em cinco tratamentos, com dez leitões por gaiola, com oito repetições e no tratamento basal utilizou número dobrado de animais. Sendo T1=dieta basal, denominado de controle negativo, T2=T1+ antimicrobiano, T3=T1+probiótico *Scchacaromyces cerevisae* T4=T1+prebiótico MOS, T5=T1+probiótico *Scchacaromyces cerevisae* + o prebiótico MOS. A dieta foi à base de milho e farelo de soja mais um suplemento mineral e vitamínico. No duodeno colorados com PAS no T1 observou-se uma menor quantidade de células caliciformes com demais tratamentos, o que pode ser explanado pela falta de um promotor de crescimento na dieta. Os T2, T4 e T5 apresentaram uma maior quantidade de células PAS positiva, isto indica que os tratamentos com antimicrobiano, prebiótico e simbiótico, respectivamente foram efetivos para estimular a proliferação de células com muco neutro. No T3 não ocorreu alteração de células com muco neutro. No jejuno do T1 obteve a menor quantidade, entretanto os T2, T3, T4 e T5 ocorreram aumento na quantidade de células caliciformes com muco neutro. Ocorreu alteração no percentual de células caliciformes devido aos aditivos utilizados na dieta, sendo mais expressivos nas células com presença de muco neutro.

Palavras-chave: Barreira Intestinal. Células Caliciformes. Intestino Delgado. Mucinas. Muco.

CHAPTER 3 - NUMBER AND PROFILE OF GLOBET CELL'S MUCOUS FROM THE SMALL GUT OF PIGLETS WITH 65 DAYS AGE FED BY DIFFERENT DIETS

ABSTRACT

This study aimed to assess the influence of performance enhancing additives in the amount and type of mucus from goblet cells present in the small intestine of piglets castrated at 65 days of age. These specialized exocrine cells are intestinal epithelium highly polarized, which can be recognized by their apical accumulation of secretory granules. These cells synthesize and secrete glycoproteis with high molecular weight called mucins. After these secretion occurs the hydration of the epithelial surface, producing a surface mucus which contains water, electrolytes and immunoglobulins. The goblet cells of the intestine not only create a barrier to intestinal permeability and act in the regulation of local immunity, but also has the noble task of protecting the mucosa of aggression both in irritative processes in the mucosa and in intestinal dryness. Several immune factors work together to stratify the luminal microbes and optimize the contact bacteria-epithelium. Intestinal goblet cells secrete mucin, which promotes a slimy coating on the surface cell of the intestinal epithelium. The small intestine does not have a inner and outer layer of mucus clearly distinct, which make the partitioning partly depending on antibacterial proteins that are secreted by the intestinal epithelium. The genetic and environmental factors seem to modulate the composition of the intestinal microbiota, which has a very important role in the formation of the local immune response. Therefore, any external factor that can change the balance of intestinal microbiota, such as diet or treatment with antibiotics, must be considered a potential risk factor for the development of abnormal intestinal cells.

Keywords: Intestinal Barrier, Goblet Cells, Mucin, Mucus, Small Intestine

1 INTRODUÇÃO

As células caliciformes são cilíndricas do tipo exócrinas, são altamente polarizadas e especializadas. É uma glândula unicelular presente nos epitélios de revestimento e podem ser reconhecidas por seu acúmulo apical de grânulos de secreção. Estas sintetizam e secretam glicoproteínas de alto peso molecular denominadas mucinas. Após secreção destas por exocitose, ocorre a hidratação da superfície epitelial, gerando uma superfície de muco que contêm água, eletrólitos e imunoglobulinas (UNIOESTE, 2013; Embrapa 2013).

No intestino delgado, não é bem distinta a camada interna e externa de muco, a compartimentação em camadas depende em parte das proteínas antibacterianas que são secretadas pelo epitélio intestinal. A *RegIIIγ* é uma lecitina antibacteriana que é expressa em células epiteliais, sob o controle de receptores *Toll-like* (TLRs). A *RegIIIγ* limita a penetração bacteriana na camada de muco intestinal, restringindo o número de bactérias em contato com a superfície epitelial, e ao mesmo tempo permite a absorção de nutrientes sem danos ao hospedeiro (VAISHNAVA, *et al*. 2011).

As mucinas estão presentes na interface das células e seu microambiente extracelular, ou participar de funções celulares como proteínas de membrana (LEE *et al.,* 2003; DEKKER *et al*., 2002)

Exitem 14 glicoprotéinas do tipo mucina catalogadas na família do gene MUC conforme *o Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* (MONIAUX *et al*. 2001)

Originalmente o termo mucina era utilizado para glicoprotéinas encontradas no muco secretado pelas CC do TGI, posteriormente evidenciou-se a produção de glicoproteínas que atuam como proteínas transmembrana nas células epiteliais, com a função de mediação de interações entre as células e seu microambiente, e que também foram designadas mucinas (DEKKER *et al*., 2002). Elas são classificadas como de membrana ou secretora, e incluídas nas famílias do gene MUC de acordo com a localização cromossômica. A MUC2 é a mucina secretória intestinal presente nas células caliciformes (LEE *et al*., 2003; KIM *et al*. 2002). A MUC1 é presente nos ácinos de glândulas salivares, ductos das glândulas submucosas esofágicas, ductos pancreáticos, epitélio foveolar superficial gástrico, nas CC e enterócitos dos intestinos delgado e grosso (CORFIELD *et al*. 2000).

Este conjunto de substâncias produz uma barreira física e química que protege o epitélio de agentes do lúmen intestinal como bactérias, toxinas ambientais, compostos

ingeridos na dieta e resíduos alimentares que possam ameaçar a integridade da camada mucosa (SPECIAN & OLIVER, 1991).

Constituem desafios ao epitélio do TGI, as enterites, diarreias, nutrientes e ou aditivos irritantes, desidratação e constipação intestinal. Segundo WEST & RATH (2003), toda e qualquer agressão às células promove um aumento de muco como resposta à injúria na mucosa.

Alterações na camada de muco causam efeitos diretos a microbiota intestinal. A presença e distribuição das CC, assim como a constituição das mucinas variam espacialmente e temporalmente (CARLOS 2006).

As mucinas são glicoproteínas poliméricas, são o principal componente do muco que recobre o epitélio do TGI. O muco intestinal, além de lubrificar o canal alimentar eficientemente, protege o epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos, que podem estarem presentes no lúmen intestinal, promove a formação do bolo fecal pela aderência entre as partículas fecais. O muco é muito estável, é resistente a ação das enzimas do TGI. Dependendo da composição de seus monossacarídeos, as mucinas são classificadas em neutras e subtipos ácidos: não-sulfatadas, as sialomucinas; e as sulfatadas denominadas de sulfomucinas. As mucinas neutras contêm monossacarídeos de manose, galactose e galactosamina. Mucinas que contém um grupo sulfatado ligado ao carboidrato (sulfomucinas) são significativamente mais ácidas que as sialomucinas (MYERS *et al*., 2008).

As mucinas ácidas sulfatadas protegem o intestino contra a translocação bacteriana, por serem menos degradadas pelas glicosidases das bactérias (DEPLANCKE & GASKINS, 2001).

Foi visto por SHERMAN *et al.* (1987) que a interação da bactéria com o muco é um importante mecanismo de proteção da superfície da mucosa.

Uma avaliação da quantidade e qualidade das CC é importante para definir que tipo de muco é predominante e qual efeito na barreira intestinal, no tempo de trânsito intestinal e na modulação da MI, além de influenciarem a translocação bacteriana (FRANKEL *et al*., 1995).

Como o muco neutro apresenta-se mais denso que o muco ácido, num meio aquoso, atribui-se ao primeiro uma maior capacidade de proteção e lubrificação, quando as células mucosas são expostas a agentes abrasivos e irritantes (BEAMISH *et al*., 1972).

As CC ao produzirem muco, promovem a proteção do epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e de elementos agressivos como micro-organismos e/ou parasitas que possam existir no lúmen intestinal ou encistados na mucosa (ROBERTIS & HIB, 2001).

Objetivou-se avaliar a influência dos aditivos melhoradores de desempenho na quantidade e tipo de muco das células caliciformes presentes no intestino delgado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Animais

Utilizaram-se 480 leitões, machos castrados, desmamados com idade média de 21 dias, abatidos aos 65 dias de idade, e da mesma linhagem. O experimento foi realizado em uma granja comercial no estado de Mato grosso. Após o desmame, os animais foram transferidos para as salas de creche com 160 m^2/sala. No galpão coberto por telhas de barro e construído em alvenaria com ambiente semi-controlado, piso de concreto, sem forro, pé direito de 3,20 metros. Os leitões foram distribuídos em gaiolas metálicas suspensas medindo 3,6 m^2/gaiola, dotada de comedouro coletivo e bebedouros tipo chupeta.

As rações foram formuladas pelo departamento de nutrição da granja, que estabeleceu quatro programas nutricionais (Tabela 1), em função da idade dos leitões sendo: Pré inicial 1 (PI 1) de 21 a 28 dias idade, Pré-inicial 2 (PI 2) de 29 a 35 dias de idade, Inicial 1 (I 1) de 36 a 46 dias de idade e Inicial 2 (I 2) de 47 a 65 dias de idade.

Tabela 1 – Composição percentual e calculada das dietas basais nas fases pré-inicial 1 (PI1), pré-inicial 2 (PI 2), Inicial 1 (I 1) e Inicial 2 (I 2), para leitões desmamados com média de 21 dias, Granja Petrovina-MT, julho 2010.

INGREDIENTE (%)	21-28 dias	29-35 dias	36-46 dias	47-65 dias
Milho grão	21,8	32,4	44,3	58,95
Nc.L. Aurotron 600	60,0			
Nc.L. Aurotron 400		40,0		
Nc.L. Aurotron 250			25,0	
Nc.L. Aurotron 50				5,0
Óleo de soja	4,0	2,8		
Farelo de soja 46% PB	11,2	20,8	25,7	30,0
Açúcar cristal	1,0	2,0	3,0	4,0
Nc En. Suínos (100kg/t)	2,0	2,0	2,0	2,0
L-Lisina 78%				0,05
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0
NUTRIENTE				
Proteína bruta %	19,81	20,03	20,08	19,10
Extrato etéreo %	6,62	6,78	6,30	6,27
Fibra Bruta %	1,92	2,39	2,58	2,73
Cinza %	6,87	6,34	6,16	6,90
Cálcio %	0,85	0,79	0,76	0,80
P.total %	0,70	0,68	0,64	0,65
EM suínos Kcal/kg	3.452	3.452	3.434,41	3.407
Lisina Total %	1,54	1,43	1,33	1,22

*Núcleo Aurotron 600: Fe 396,98 mg; Mn 121,34 mg; Zn 4454,38 mg; Cu 245,69 mg; Iodo 1,69 mg; Se 1,46 mg; Vit A 10.800 UI; Vit D_3 2.250 UI; Vit E 45 mg; Vit K_3 3,60 mg; Vit B_1 1,80 mg; Vit B_2 7,56 mg; Vit B_6 3,60 mg; Vit B_{12} 27 mcg; Biotina 126 mcg; Colina 502,26 mg; Metionina 5,34 g; Lisina 17,30 g; Antioxidante 224,85 mg; Sódio 5,96 g; Ácido Fólico 0,63 mg; Ácido Pantotênico 2,16 mg; Niacina 54 mg. .*Núcleo Aurotron 400: Fe 215,05 mg; Mn 182,19 mg; Zn 6.655,50 mg; Cu 361,06 mg; Iodo 2,25 mg; Se 0,68 mg; Vit A 13.500 UI; Vit D_3 2.812,50 UI; Vit E 56,26 mg; Vit K_3 4,50 mg; Vit B_1 2,25 mg; Vit B_2 9,45 mg; Vit B_6 4,50 mg; Vit B_{12} 33,75 mcg; Biotina 157 mcg; Colina 1.665 mg; Metionina 7,06 g; Lisina 16,80 g; Antioxidante 337,56 mg; Sódio 5,85 g; Ácido Fólico 4,21 mg; Ácido Pantotênico 27 mg; Niacina 67,50 mg. *Núcleo Aurotron 250: Fe 344,09 mg; Mn 215,53 mg; Zn 7.818,34 mg; Cu 577,69 mg; Iodo 3,6 mg; Se 1,08 mg; Vit A 21.600 UI; Vit D_3 4500 UI; Vit E 90 mg; Vit K_3 7,2 mg; Vit B_1 3,60 mg; Vit B_2 15,12 mg; Vit B_6 7,20 mg; Vit B_{12} 54 mcg; Biotina 252 mcg; Colina 381,87 mg; Metionina 6,99 g; Lisina 17,26 g; Antioxidante 395,77 mg; Sódio 8,10 g; Ácido Fólico 6,81 mg; Ácido Pantotênico 43,20 mg; Niacina 108 mg. *Núcleo Aurotron 50: Fe 1.796 mg; Mn 1,077 mg; Zn 2.700 mg; Cu 3.776 mg; Iodo 18 mg; Se 5,40 mg; Vit A 108.000 UI; Vit D_3 22.500 UI; Vit E 450 mg; Vit K_3 36 mg; Vit B_1 18 mg; Vit B_2 75,60 mg; Vit B_6 36 mg; Vit B_{12} 270 mcg; Biotina 1.260 mcg; Colina 2.079 mg; Metionina 15,70 g; Lisina 35 g; Antioxidante 200 mg; Sódio 34,20 g; Ácido Fólico 6,30 mg; Ácido Pantotênico 216 mg; Niacina 540 mg.

Os animais receberam dietas isocalóricas e isoproteícas por fase, focando atender às exigências nutricionais dos leitões no período de creche dos 21 a 65 dias, segundo o manual da linhagem genética, por se tratar de uma granja GRSC- Granja de reprodutores suídeos certificada pelo MAPA.

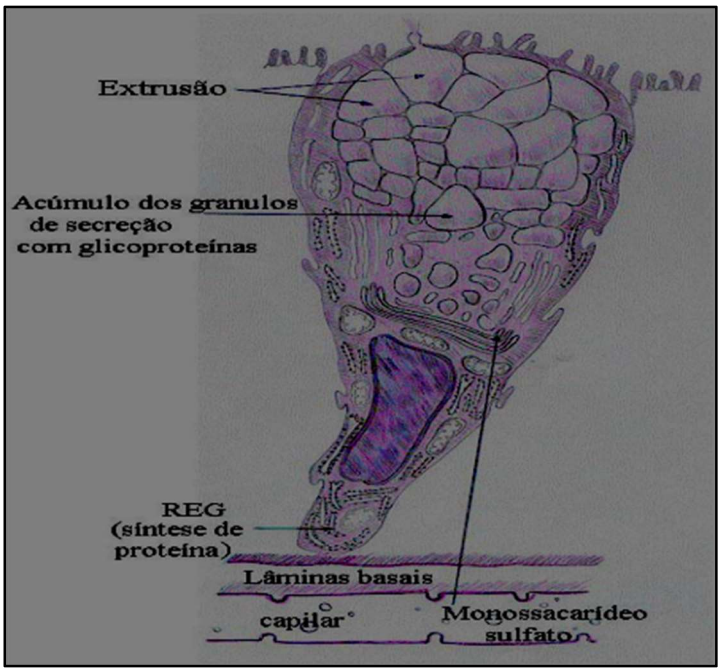
2.2 Porcentagem de Células Caliciformes

Em um frigorífico abateram-se 25 leitões com idade média de 65 dias. Na linha de inspeção das vísceras, colheram-se anéis circulares de dois cm de duodeno, jejuno e íleo, os quais foram abertos e lavados com soro fisiológico, estendidos em cortiça com auxílio de alfinetes e fixados por 24 h em formol tamponado a 10%. Em seguida foram submetidas à desidratação em doses crescentes de álcoois (70, 80, 90 e 100 oGL) e diafanizadas em xilol por 90 min, e incluídas em parafina histológica. Com micrótomo automático Leica® 2155, obteve-se cortes de quatro micras para confecção das lâminas.

Pela técnica de histoquímica para coloração utilizaram-se os corantes PAS- *Periodic acid schiff*, e, para facilitar o contraste de cores, contra corou-se com verde de malaquita. E foi corado por alcian-blue separadamente; e, depois, os dois corantes na mesma lâmina, iniciando-se com alcian-blue e usou PAS na contra coloração.

Usando um microscópio de luz Leica DM500 fez-se a leitura das lâminas e foram capturadas as imagens com câmera Leica ICC50. Em seguida a captura, as imagens foram segmentadas por "*threshold*" formando-se imagens binárias.

Figura 1 - Imagem esquemática de uma célula caliciforme



Fonte: http://biologia.ifsc.usp.br/bio1/apostila/bio1_parte_03.pdf

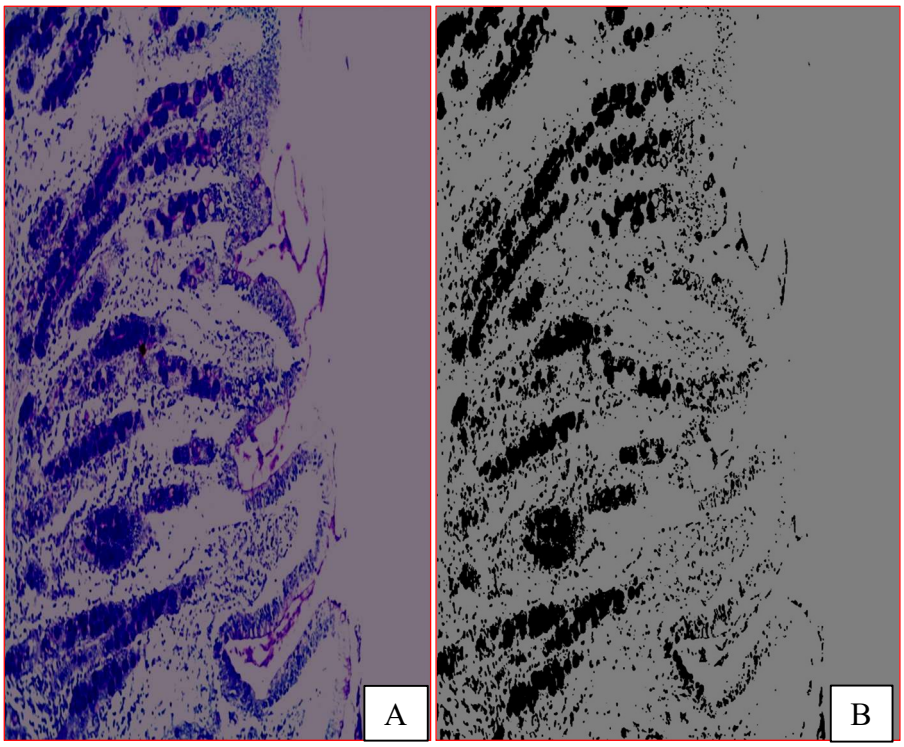


Figura 2 – A Fotomicrografia de jejuno de leitão com 65 dias de idade, corada com PAS , aumento em 400 vezes B_ imagem binária de A, construída por *threshold*.
Fonte: O próprio autor.

A mensuração das áreas marcadas foi realizada automaticamente pelo programa de análise de imagens HL_Image 97 (Western Vision Softwares).

2.3 Delineamento Experimental

Após o desmame, os leitões foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado ao acaso em cinco tratamentos e com oito repetições, no tratamento basal dobrou o número de leitões, sendo a unidade experimental representada por um leitão, totalizando 480 leitões.

Os tratamentos constituíram-se de:

T1 = dieta basal;

T2 = T1 + 100 ppm de Avilamicina

T3 = T1 + 2000 ppm *Saccharomyces cerevisae*;

T4 = T1 + 1000 ppm de MOS;

T5 = T1 + 2000 ppm *Saccharomyces cerevisae* + 1000 ppm de MOS

2.4 Análise Estatística

Para as análises entre grupo foi utilizado o teste de comparação múltipla de Bonferroni após análise pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, sendo o *P* considerado significativo quando menor que 0,05.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Nas lâminas de duodeno, jejuno e íleo oriundas dos animais do T1, coradas por PAS observou-se uma menor quantidade de CC em comparação aos T2, T3, T4 e T5, o que pode ser explanado pela falta de um promotor de crescimento na dieta, figura 3.

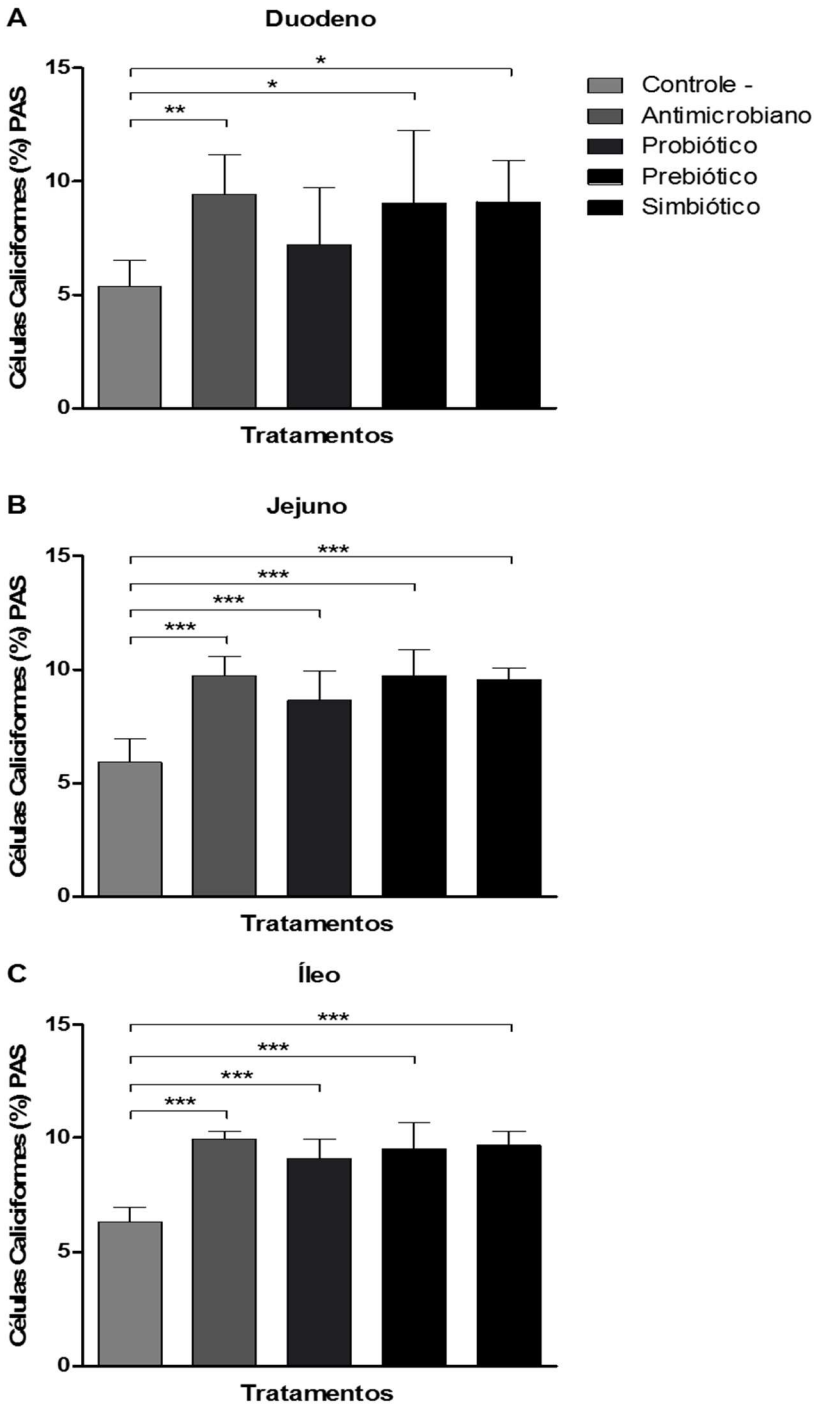
Os duodenos dos animais dos T2, T4 e T5 apresentaram uma maior quantidade de células PAS positivas. Isto indica que os tratamentos com antimicrobiano, prebiótico e simbiótico, respectivamente foram efetivos para estimular a proliferação de células com muco neutro. O muco neutro é mais denso que o muco ácido, num meio aquoso, quando a mucosa é desafiada por agentes abrasivos e irritantes, desse modo promove uma maior capacidade de proteção e lubrificação (BEAMISH *et al*., 1972).

Outra possibilidade é que nos T2, T4, T5 o antimicrobiano, prebiótico e simbiótico, respectivamente, sob a possível ação imunomoduladora da microbiota, sobressaíram às probióticas, e com isto ocorreu um estímulo positivo para a produção de mais CC com muco tipo neutro, o que é altamente positivo em termos fisiológicos, nutricionais e para a saúde intestinal.

As ligações dos probióticos com o epitélio intestinal pelas células de Paneth e caliciformes estimulam a produção de defensinas e muco, substâncias importantes para a proteção das superfícies mucosas contra a invasão por patógenos (LEBEER, *et al*., 2010).

O T3 com probiótico não promoveu modulação favorável para maior proliferação de células muco neutra. Provavelmente, o tipo de cepa utilizada não foi efetiva para estimular a formação de novas células muco neutro.

Figura 3 – Porcentagem de células caliciformes coradas por PAS no duodeno (A), jejuno (B) e íleo © de leitões aos 65 dias de idade submetidos a cinco diferentes tratamentos. Barras representam média e desvio padrão (Passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov). Análise pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni *p<0.05, **p<0,001, ***p<0,0001.



Fonte: O próprio autor.

Nos jejunos dos animais dos T2, T3, T4 e T5 provavelmente, foram capazes de induzir uma modulação da microbiota, pois em todos estes ocorreram aumento na quantidade de CC com muco neutro.

Em T1 obteve-se a menor quantidade de CC com muco neutro. Possivelmente, a mucosa intestinal não foi estimulada para aumentar as células, o que pode ser explicado pela falta de um promotor de crescimento na dieta.

Nos cortes de íleo dos leitões do T1 obteve-se o menor valor. A ausência de melhorador de desempenho na ração, possivelmente, não foi capaz de promover uma resposta positiva para estimular o aumento das células PAS positivo.

Os T2, T3, T4 e T5 provavelmente foram capazes de induzir uma modulação da microbiota, pois em todos estes ocorreram aumento na quantidade de CC com muco neutro do íleo.

Em concordância com resultados de MACK *et al*. (1999) que demonstraram que o uso de probiótico estimulou o aumento da regulação de genes da CC da mucosa entérica, assim como nesta pesquisa onde se observou aumento de células caliciformes ao usar probiótico na dieta.

McCULLOUGH et al. (1998) em suas pesquisas com animais que receberam dieta com fibras, observaram aumento do número de células caliciformes no intestino, concordando com nossos resultados nos T4 e T5 nos quais foram adicionadas fibras via prebiótico.

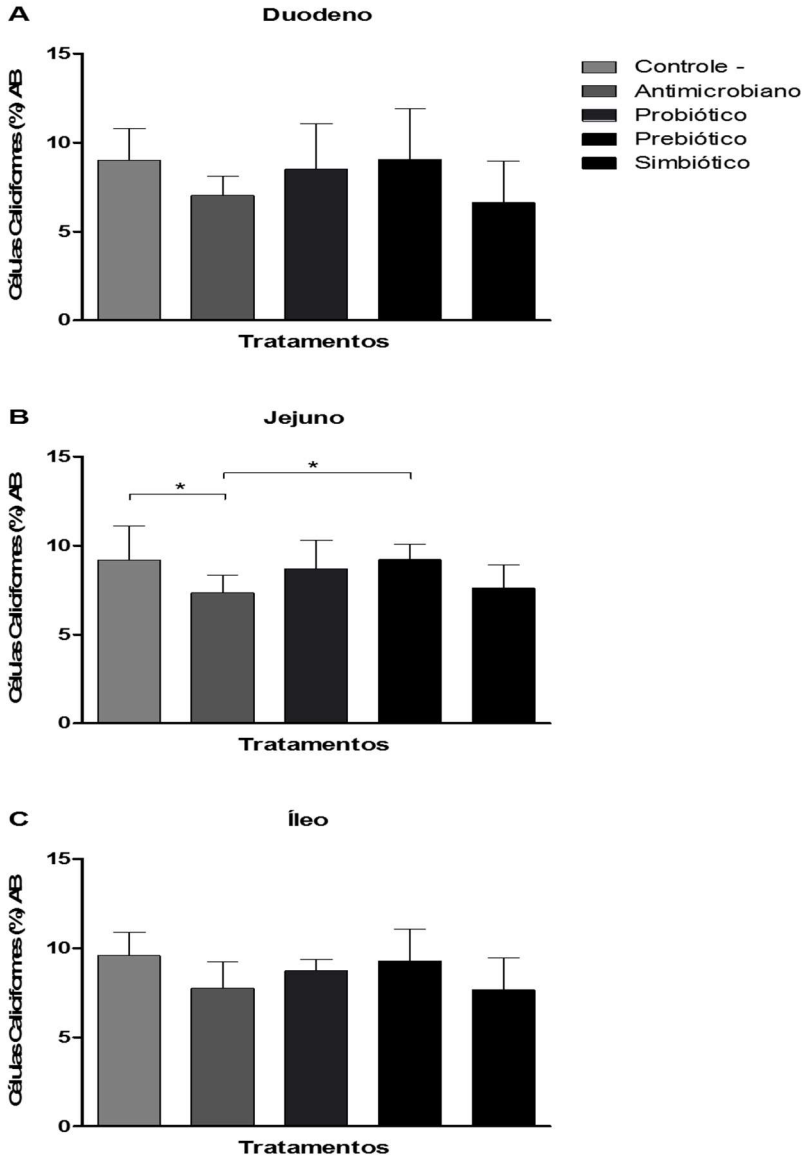
Sob a luz da histologia a ausência da microbiota está associada às criptas mais curtas e às vilosidades menos espessas. As criptas mais rasas são um reflexo do índice mitótico reduzido e do *turnover* celular limitado (ALAM et al., 1994). Contudo, não são todas as bactérias que exercem estes mesmos efeitos na morfologia intestinal. A *E. coli*, uma bactéria que pode debilitar a função da barreira do colo e aumentar sua permeabilidade para toxinas luminais (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2001).

Com relação à técnica de coloração com PAS-Alcian Blue, nos T1, T3 e T5 foram observados os mesmos padrões de reação histoquímica no íleo, não sendo detectadas quaisquer diferenças.

No jejuno e íleo, o T 2 em comparação ao T1 e T4, foi demostrado que o T2 com antimicrobiano teve uma menor quantidade de CC com muco ácido, provavelmente por ter ocorrido uma imunomodulação menos intensa, o que causou um menor desafio ao GALT-

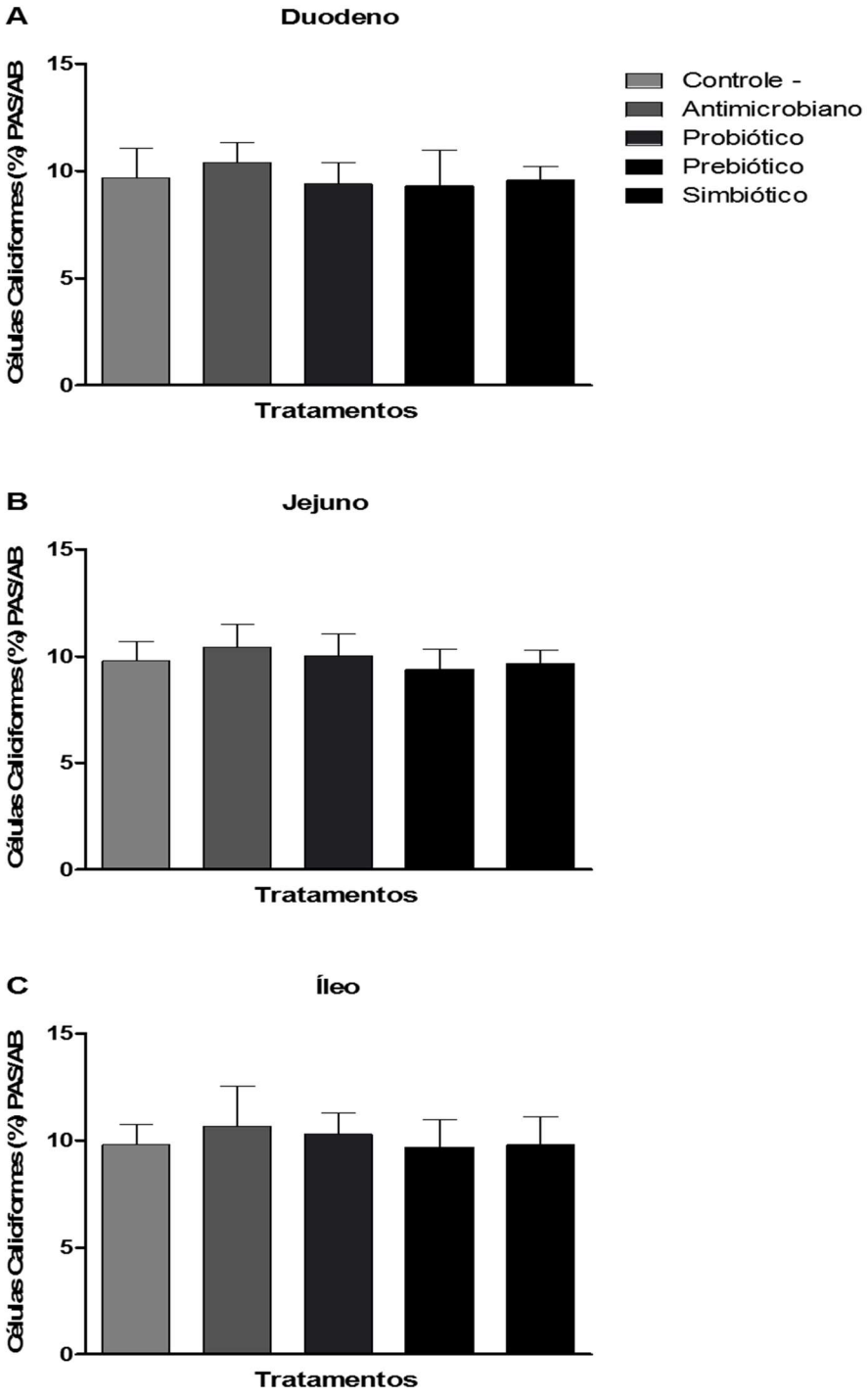
Gut associated lymphoid tissue, o que é respaldado pela menor quantidade de CP encontrada neste tratamento quando se avaliaram as células de Paneth no duodeno.

Figura 4 – Porcentagem de células caliciformes coradas por Alcian Blue no duodeno (A), jejuno (B), e íleo (C). Barras representam média e desvio padrão. (Passaram no teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Análise pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni * p<0,05.



Fonte: O próprio autor.

Figura 5 – Porcentagem de células caliciformes coradas por PAS e Alcian Blue no duodeno (A), jejuno (B), e íleo (C). Barras representam média e desvio padrão.



Fonte: O próprio autor.

A técnica simultânea PAS-Alcian Blue exibiu os conteúdos de polissacarídeos neutros e ácidos presentes nas secreções mucosas das células caliciformes, nas três regiões

do intestino delgado. Nem todas as CC coraram, isto se explica pelo tipo de muco presente e ou ausência de muco devido à perda deste nos processamentos das colorações. Ressalta-se que algumas células coraram, parcialmente, pelos dois corantes, pois possivelmente, apresentavam muco ácido e neutro.

Em células caliciformes maduras, o conteúdo a ser secretado apresenta um caráter ácido devido ao alto conteúdo de ácido siálico (SPECIAN & OLIVER, 1991), sendo o Alcian Blue um corante que marca estas secreções de forma eficaz em azul intenso. Desta forma, a análise foi realizada quanto ao caráter ácido das secreções das células maduras.

As glicoproteínas ou muco tem como funções a proteção da mucosa intestinal contra agentes abrasivos e irritantes da dieta, agentes patogênicos, lubrificação da mucosa e, também, participa na absorção dos nutrientes. O muco participa da resposta imunológica inespecífica, e quando ocorre grande expressão de CC, isto é sugestivo de grande desafio sanitário ou injúria tecidual muito comum na maioria das diarreias, pois a mucosa reage aumentando a quantidade de CC ou mesmo liberando maior quantidade de muco, acima do padrão fisiológico.

Em contrapartida, o muco em grandes quantidades pode acarretar prejuízos para a saúde do animal, pois acelera o tempo do trânsito intestinal -TTI, e consequentemente reduz a absorção dos nutrientes.

O número de CC no intestino delgado sofreu um aumento após o desmame, e não foram observadas alterações na fermentação do intestino grosso (BROWN *et al.*, 1988), a fibra dietética modifica a natureza das mucinas secretada (MAIS *et al*., 1987).

Em peixes que receberam probiótico o número de células caliciformes da porção média do intestino coradas com PAS foi maior que o observado no grupo controle negativo (MELLO, 2012), concordando com os resultados encontrados no jejuno e íleo de leitões com o mesmo corante, o qual destaca as células com muco neutro. Fato relatado por DEPLANCKE & GASKINS (2001) que alguns micro-organismos são capazes de regular a síntese e a secreção de muco pelo hospedeiro e muitos deles têm a capacidade de degradação deste muco.

As ligações dos probióticos com o epitélio intestinal pelas células de Paneth e caliciformes estimulam a produção de defensinas e muco, substâncias importantes para a proteção das superfícies mucosas contra a invasão por patógenos. Outro fator que parece ter grande importância nos processos que levam à ocorrência de da translocação bacteriana é

desequilíbrio da imunidade inata. Segundo MAXSON *et al*. (1994), o declínio da produção de muco pelas células caliciformes intestinais, implica em aumento da taxa de translocação bacteriana,

Uma exceção bem elucidada são as bactérias anaeróbias do gênero *Brachyspiras* causadoras da disenteria suína, uma vez ingeridas por via oral no intestino grosso, usam o muco a seu favor, elas são atraídas pelo muco do intestino grosso. A quimiotaxia pelo muco é um dos principais mecanismos de patogenicidade das *Brachyspiras,* ao penetrarem na camada protetora do muco conseguem atingir o enterócito subjacente. O muco favorece a nutrição, colonização e motilidade das *Brachyspiras* (HAMPSON et al., 2006ª; NARESH & HAMPSON, 2010; GUEDES & BARCELLOS, 2012b).

4 CONCLUSÃO

Os aditivos utilizados na dieta alteraram o percentual de células caliciformes, sendo mais expressivos naquelas com a presença de muco neutro.

REFERÊNCIAS

1. ALAM, M.; MIDTVEDT, T.; URIBE, A differential cell kinetics in the ileum and colon of germ-free rats. **Scand. J. Gastroenterol**., Stockholm v.29, p.445-451, 1994.

2. BEAMISH, R.J. et al. Lethal pH for white sucker *Catostomus comersoni* (Lacépedè). **Transactions of the American Fisheries Society**, ,[S.l], v.101, p.335-358, 1972.

3. BROWN, P.J., B.J. MILLER, C.R. STOKES, N.B. BLAZQUEZ AND F.J. BOURNE, 1988. Histochemistry of mucin of pig intestinal secretory epithelial cell before and after weaning. **Journal Comparative Pathology**, 98: 313-323.

4. CARLOS J., Estudo morfológico e morfométrico do intestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos à dieta enteral contendo prebióticos e contaminada por *Klebsiella pneumoniae,* .2006, 76f.**Tese** (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

5. CHEN Y., CHOU K.; FUCHS E., HAVRAN, W. L., BOISMENU R, Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. In: **Source Department of Immunology,** The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA.2002.

6. CORFIELD, A P, MYERSCOUGHN., Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in **the pathology of gastrointestinal disease Gut.** 2000;47:589-594 doi:10.1136/gut.47.4.589

7. DEKKER J., ROSSEN J.W.A., BÜLLER H.A., EINERHAND A.W.C. The MUC family: an obituary. **Trends in biochemical sciences** 27 (3), 126-13

8. DEPLANCKE, B., GASKINS, H. Microbial modulation of innate defense: Goblet cells and the intestinal mucus layer. Am. **Journal Clinical Nutrition**, [S.l], v. 73,p.1131S – 1141S, 2001

9. Embrapa- Centro nacional de Pesquisa de Suínos e aves disponível em http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_morales.pdf

10. FRANKEL W. ZHANG W., et al. Fiber: effect on bacterial translocation and intestinal mucin content. **World Journal Surgery,** [S.l] ,v. 19, n.1, Jan-Feb, p. 144-148, 148-149, 1995

11. GARCÍA-LAFUENTE, A.; ANTOLÍN, M.; GUARNER, F.; CRESPO and.; MALAGELADA J. R. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. **Gut**., Barcelona, v. 48, p.503-507., 2001.

12. GARCIA, R. L.; COLTRERA, M. D.; GOWN, A. M., Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies indexed, embedded tissues:

comparison with ow cytometric analysis**, American Journal of Pathology**, Seattle, v. 134, n. 4, pp. 733-739, April 1989.

13. HALL, P. A.; LEVISON, D.A., **Assessment of cel l proliferation in histological material**, London, pp. 184-192, September 1989.

14. HAMPOSN, D. J.; FELLSTROM, C.; THOMPSON, J. R. Swine dysentery. In Eds. Straw B. E. et al. **Diseases of swine**. 9 th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006a 7785-805.

15. JEURISSEN, S. H.M.; LEWIS, F.; KLIS, J.D.V.; MROZ, Z.; REBEL, J.M.J, HUURNE, A. A.H.M. Parameters and Techniques to Determine Intestinal Health of Poultry as Constituted by Immunity, Integrity and Functionality. **Current Issues of Intestinal Microbiology**, [S.l], v.3, p. 1-14, 2002.

16. JIN, L.; REINOLDS, L.P.; REDNER, D.A. et al. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation and morphology in pigs. **Journal of Animal Science**, [S.l], v. 72, p. 2270-2278, 1994.

17. KIM G.E., BAE H.I., PARK H.U., KUAN S.F., CRAWLEY S.C., HO J.J., KIM Y.S. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas. **Gastroenterology.** 2002 Oct;123(4):1052-60.

18. KIERSZENBAUM A. L. Sistema digestório inferior. In**: Histologia e biologia celular:** uma introdução à Patologia. Rio de Janeiro: Saunders**,** Elsevier, 2004,p.449-474.

19. LEE M. J., LEEE H. S., KIM W. H., CHOY Y., YANG M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. **Modern Pathology**, 2003 May, 15(5):403-10.

20. MAXSON R. T., DUNLAP, J. P.,TRYKA, F., JACKSON, R. J.,SMITH, S. D.The Role of the Mucus Gel Layer in Intestinal Bacterial Translocation **Journal of Surgical Research**, v. 57, p.682-686,1994

21. MONIAUX N.,ESCANDE F., PORCHET N., AUBERT J. P., BATRA S. K. Structural Organization and Classification of the Human Mucin Genes. **Front Biosciencie 2001** Oct. 1;6: D1192-1206.

22. MELLO H., 2012 **Dissertação** Bacillus cereus e Bacillus subtilis na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (Oreochromis niloticus) e seu efeito probiótico disponível em http://www.caunesp.unesp.br/publicacoes/dissertacoes_teses/dissertacoes/Dissertacao%20Hurzana%20de%20Mello.pdf

23. MYERS B.M. *et al.* Carbohydrates. In: BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6.ed. Philadelphia: Elselvier, 2008. Cap.11, p.161-187.

24. ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. **Bases da Biologia Celular e Molecular.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 408p.

25. SHERMAN, T., ARMISTEAD, L. P., FOWLER, F, BARKSDALE, M. A. ; REIF, G. The quest for excellence in university teaching. **Journal of Higher Education**, [S.l],v. 58.v.1 ,p.66-84, 1987.

26. SPECIAN, R.D. and M.G. OLIVE, 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. **Am. J. Phisiol**., [S.l], v. 260,p. C183- C193,1991.

27. UNIOSTE- Universidade Estadual Oeste do Paraná, 2013 disponível em http://projetos.unioeste.br/projetos/microscopio/index.php?option=com_phocagallery&view=category&id=58&Itemid=123 acesso em 04 de nov. 2013

28. VAISHNAVA S, YAMAMOTO M., SERVERSON K.M., RUHN K. A., YU X., KOREN O., LEY R., WAKELAND E. K., HOOPER L. V. The Antibacterial Lectin RegIIIy Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. **Science,** [S.l], p. 334:255, Out. 2011.

29. WIEST R, RATH H.C. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. Best Pract Res **Clin Gastroenterol** 2003; 17: 397–425.

CAPÍTULO 4 – CÉLULAS DE PANETH DA MUCOSA DUODENAL DE LEITÕES SUBMETIDOS À DIETAS COM DIFERENTES ADITIVOS ALIMENTARES.

RESUMO

Objetivou-se certificar e quantificar a existência de células de Paneth no duodeno de suínos submetidos a diferentes dietas, com diferentes aditivos promotores de crescimento. Vários fatores fisiológicos estão envolvidos no controle da microbiota intestinal, sendo a ação das células de Paneth fundamentais neste controle, pois produzem continuamente as defensinas. O TGI não tem apenas a função de digestão e absorção de nutrientes. E têm também um importante componente imunológico representado pelas células de Paneth, localizadas na base das criptas intestinais O experimento foi conduzido em uma granja de suínos. Aplicou--se o delineamento inteiramente casualizado. Foram cinco tratamentos, com dez leitões por gaiola, com oito repetições e, no tratamento basal dobrou o número de repetições. Sendo T1=dieta basal, denominado de controle negativo, T2=T1+ antimicrobiano, T3=T1+probiótico T4=T1+prebiótico, T5=T1+probiótico *Scchacaromyces cerevisae* + o prebiótico MOS. A dieta foi à base de milho e farelo de soja mais um suplemento mineral e vitamínico. Para a certificação da presença das células de Paneth nos suínos usou o corante hematoxilina plúmbica, também usado para identificar e contar as células de Paneth no duodeno, e, por teste de imunoistoquímica respaldou a presença desta célula. No T1 teve a maior quantidade de células de Paneth, a dieta com antimicrobiano T2 teve a menor quantidade, em T3 não evidenciou alteração significativa, no T4 e T5 o prebiótico e simbiótico respectivamente tiveram quantidades moderadas, provavelmente ocorreu uma modulação da microbiota. Diferentes aditivos na ração possivelmente são importantes por estimular antigenicamente e por modular o microbioma. Os aditivos alimentares alteram o número das células de Paneth no duodeno de leitões, possivelmente, por modularem a microbiota.

Palavras-chave: Células de Panet. GALT. Modulação da Microbiota. Patógenos Intestinais. Saúde Intestinal.

CHAPTER 4 - PANETH´S CELLS IN DUODENAL MUCOSAL FROM PIGLETS SUBMITTED TO DIETS WITH DIFFERENT PROMOTER ADDITIVES

ABSTRACT

The objective of this work was to make sure the existence and quantify and of Paneth's cells in duodenum of piglets subjected to different diets, with different additives which promote growth. Several physiological factors are involved in the control of gut microbiota and the action of Paneth's cells is fundamental in this control, since they produce continuously defensins. The TGII has not only the function of digestion and absorption of nutrients. It also has an important immunological component represented by Paneth's cells, located at the base of intestinal crypts. The experiment was conducted in a farm of certified swine breeding farm, applying the completely randomized design. Five treatment were used, with ten piglets per cage, eight replications, and in the basal treatment, being T1=basal diet, denominated negative control, T2=T1+antimicrobial agent, T3=T1+probiotic, *Saccharomyces cerevisiae,* T4=T1+prebiotic MOS, T5=T1+probiotic *Saccharomyces cerevisiae* + the prebiotic MOS. The diet was based on corn and soybean meal plus a supplement of vitamins and minerals. Certification of presence of Paneth's cells used the lead-hematoxylin stain, also being used for identifying and counting the Paneth's in the duodenum and, by immunohistochemistry testing, confirmed the presence of this cell. In the T1 there was the greatest quantity of CP. The diet with antimicrobial, T2, has the least amount in T3 and did not give evidence of significant evidence. In the T4 and T5, the prebiotic and synbiotic, respectively, had moderate quantities, probably a modulation of microbiota occurred. Different additives in the diet based on corn and soybean possibly are important for stimulating antigenically and by modulating the microbiome. Food additives change the number of Paneth's cells in duodenum of piglets, possibly, by modulating the microbiota.

Key words: GALT. Gut Health. igA. Intestinal Pathogens, Microbiota Modulation, Paneth's Cells.

1 INTRODUÇÃO

O intestino representa o maior órgão linfóide do corpo humano e é responsável por 80% da resposta imunológica. Essa ação deve-se à presença de anticorpos e várias células imunocompetentes dispersas na lâmina própria e epitélio ou organizadas em estruturas, que exercem papel fundamental na apresentação antigênica e elaboração da resposta imune a microrganismos e proteínas da dieta (MORAIS & JACOB, 2006)

As células de Paneth, presentes na base das criptas do intestino delgado, contribuem de forma eficiente para regular a microbiota comensal e patogênica (KIERSZENBAUM, 2004). Este tipo de regulação combina muito bem com a função de células de Paneth na primeira linha de defesa.

A mucosa do trato intestinal está constantemente exposta a vários microrganismos patogênicos. Entretanto, uma barreira física e química contra esses patógenos é criada pelo epitélio intestinal (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006) e um sistema imunológico especializado auxilia na proteção da superfície da mucosa. O sistema imune de mucosas ou MALT contribui com cerca de 80% de todas as células imunes e é o responsável pela principal proteção das mucosas à colonização de patógenos

O epitélio intestinal junto com a microbiota e o sistema imunológico associado à mucosa pertence a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de micro-organismos potencialmente patogênicos (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

O trato gastrointestinal não tem apenas a função de digestão e absorção de nutrientes. É também, um importante órgão imunológico. As células de Paneth em alguns animais são facilmente visualizadas por microscopia óptica, e em outros ainda não foram identificadas ou talvez não exista. Elas secretam proteínas antimicrobianas para limitar o contato das bactérias com o enterócito. A maioria dessas proteínas eliminam as bactérias diretamente pela degradação enzimática da parede bacteriana, e outro grupo impede as bactérias de utilizar o ferro, o qual é nutriente essencial para o crescimento e reprodução dos microrganismos no lúmen intestinal.

A monocamada da mucosa do epitélio do intestino delgado é continuamente repopulada pela progenia das células-tronco que residem nas criptas (AYABE *at al*., 2000). As CP residem na base das criptas de Lieberkuhn desempenha uma importante função na imunidade inata (MULLER *et al*., 2005). Essas células estão localizadas em proximidade direta com as células tronco multipotentes que requerem uma proteção especial para

assegurar sua habilidade em repovoar a mucosa intestinal continuamente (MULLER *et al*., 2005) As CP, estão estrategicamente localizadas próximas à zona das células tronco, elas detectam bactérias que ocupam a luz das criptas e secretam defensinas e catelicidinas para destruí-las, assim inibe a colonização da cripta (AYABE *et al*., 2000). Baixos níveis de expressão de defensinas são normalmente encontrados em crianças prematuras (SALZMAN *et al*., 1998)

A maioria dessas proteínas eliminam as bactérias diretamente pela degradação enzimática da parede bacteriana

As células de Paneth fazem parte da composição do GALT (*gut associed lymphoide tissue*). Os principais produtos desta célula são o TNF-α (Fator de necrose tumoral alfa), a lisozima e outras proteínas. As defensinas ou criptidinas alfa e beta, em função da região de origem são as mais estudadas. Relata-se a produção de outros peptídeos com função antimicrobiana, os quais ainda não foram identificados. Estas células têm uma vida média de 21 dias. Os mamíferos nascem isentos de microbiota total e adquirem-na, no momento do parto. Nos suínos, é definida por volta de dois meses.

Alguns aditivos promotores de crescimento modulam a MI-microbiota intestinal, cuja alteração pode modificar a quantidade de células de Paneth nas criptas intestinais devido à maior ou menor exposição aos antígenos da MI e da dieta (SANCHEZ *et al*., 2008a).

O uso de prebióticos e probióticos associados às dietas previne a translocação bacteriana causadas, pela alteração brusca da MI, levando à proliferação excessiva dos micro-organismos, pelas alterações físicas da barreira intestinal e falhas do GALT (WIEST & RATH 2003; ZANONI *et al.* 2009).

Defensinas têm um papel importante na defesa e no controle dos patógenos ingeridos, na proteção das células troncos da cripta e, principalmente, limitam o número e o tipo de comensais (BENVINS, 2004)

A microbiota do intestino protege o hospedeiro por “educar” o sistema imunológico e prevenir infecções patogênicas. Esta microbiota beneficia o sistema imunológico do hospedeiro e, positivamente, afeta outros órgãos, como pulmões (MALOZI, 2012).

O MOS-mananoligossacarídeos atuam na adsorção e na remoção de patógenos do trato intestinal e na modulação do sistema imunológico (SPRING, 2000).

Objetivou-se avaliar os efeitos dos aditivos promotores de crescimento sobre a quantidade das células de Paneth no duodeno de leitões aos 65 dias de idade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Animais

Utilizaram-se 480 leitões, machos castrados, abatidos com 65 dias de idade e da mesma linhagem, utilizou 5 tratamentos e 8 repetições por tratamento, e no basal dobrou o número de leitões, conduziu o experimento em uma granja comercial. Após o desmane, os animais foram transferidos para as salas de creche, em um galpão de alvenaria de 160 m^2/sala, com ambiente semi-controlado. No galpão coberto por telhas de barro, com piso de concreto, sem forro, pé direito de 3,20 metros, os leitões foram alojados em gaiolas metálicas suspensas medindo 3,6 m^2/gaiola, dotadas de comedouro coletivo e bebedouros tipo chupeta.

As rações foram formuladas pelo departamento de nutrição (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição percentual e calculada das dietas basais nas fases pré-inicial 1 (PI1), pré-inicial 2 (PI 2), Inicial 1 (I 1) e Inicial 2 (I 2), para leitões desmamados com média de 21 dias, Granja Petrovina-MT, julho 2010.

INGREDIENTE (%)	21-28 dias	29-35 dias	36-46 dias	47-65 dias
Milho grão	21,8	35,2	44,3	58,95
Nc.L. Aurotron 600	60,0			
Nc.L. Aurotron 400		40,0		
Nc.L. Aurotron 250			25,0	
Nc.L. Aurotron 50				5,0
Óleo de soja	4,0			
Farelo de soja 46% PB	11,2	20,8	25,7	30,0
Açúcar cristal	1,0	2,0	3,0	4,0
Nc En. Suínos (100kg/t)	2,0	2,0	2,0	2,0
L-Lisina 78%				0,05
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0
NUTRIENTE				
Proteína bruta %	19,81	20,03	20,08	19,10
Extrato etéreo %	6,62	6,78	6,30	6,27
Fibra Bruta %	1,92	2,39	2,58	2,73
Cinza %	6,87	6,34	6,16	6,90
Cálcio %	0,85	0,79	0,76	0,80
P.total %	0,70	0,68	0,64	0,65
EM suínos Kcal/kg	3.452	3.452	3.434,41	3.407
Lisina Total %	1,54	1,43	1,33	1,22

*Núcleo Aurotron 600: Fe 396,98 mg; Mn 121,34 mg; Zn 4454,38 mg; Cu 245,69 mg; Iodo 1,69 mg; Se 1,46 mg; Vit A 10.800 UI; Vit D_3 2.250 UI; Vit E 45 mg; Vit K_3 3,60 mg; Vit B_1 1,80 mg; Vit B_2 7,56 mg; Vit B_6 3,60 mg; Vit B_{12} 27 mcg; Biotina 126 mcg; Colina 502,26 mg; Metionina 5,34 g; Lisina 17,30 g; Antioxidante 224,85 mg; Sódio 5,96 g; Ácido Fólico 0,63 mg; Ácido Pantotênico 2,16 mg; Niacina 54 mg. .*Núcleo Aurotron 400: Fe 215,05 mg; Mn 182,19 mg; Zn 6.655,50 mg; Cu 361,06 mg; Iodo 2,25 mg; Se 0,68 mg; Vit A 13.500 UI; Vit D_3 2.812,50 UI; Vit E 56,26 mg; Vit K_3 4,50 mg; Vit B_1 2,25 mg; Vit B_2 9,45 mg; Vit B_6 4,50 mg; Vit B_{12} 33,75 mcg; Biotina 157 mcg; Colina 1.665 mg; Metionina 7,06 g; Lisina 16,80 g; Antioxidante 337,56 mg; Sódio 5,85 g; Ácido Fólico 4,21 mg; Ácido Pantotênico 27 mg; Niacina 67,50 mg. *Núcleo Aurotron 250: Fe 344,09 mg; Mn 215,53 mg; Zn 7.818,34 mg; Cu 577,69 mg; Iodo 3,6 mg; Se 1,08 mg; Vit A 21.600 UI; Vit D_3 4500 UI; Vit E 90 mg; Vit K_3 7,2 mg; Vit B_1 3,60 mg; Vit B_2 15,12 mg; Vit B_6 7,20 mg; Vit B_{12} 54 mcg; Biotina 252 mcg; Colina 381,87 mg; Metionina 6,99 g; Lisina 17,26 g; Antioxidante 395,77 mg; Sódio 8,10 g; Ácido Fólico 6,81 mg; Ácido Pantotênico 43,20 mg; Niacina 108 mg. *Núcleo Aurotron 50: Fe 1.796 mg; Mn 1,077 mg; Zn 2.700 mg; Cu 3.776 mg; Iodo 18 mg; Se 5,40 mg; Vit A 108.000 UI; Vit D_3 22.500 UI; Vit E 450 mg; Vit K_3 36 mg; Vit B_1 18 mg; Vit B_2 75,60 mg; Vit B_6 36 mg; Vit B_{12} 270 mcg; Biotina 1.260 mcg; Colina 2.079 mg; Metionina 15,70 g; Lisina 35 g; Antioxidante 200 mg; Sódio 34,20 g; Ácido Fólico 6,30 mg; Ácido Pantotênico 216 mg; Niacina 540 mg.

Os animais receberam dietas experimentais isocalóricas e isoproteícas, formuladas para atender às exigências nutricionais dos leitões no período de creche 21 a 65 dias.

Os leitões foram alojados aleatoriamente nas gaiolas, em cinco tratamentos distintos, de acordo com a dieta:

T1 = dieta basal;
T2 = T1 + 100 ppm de Avilamicina;
T3 = T1 + 2000 ppm *Saccharomyces cerevisae*;
T4 = T1 + 1000 ppm de MOS;
T5 = T1 + 2000 ppm *Saccharomyces cerevisae* + 1000 ppm de MOS

2.2 Imunoistoquímica para detectar criptdina na região de cripta

Foi realizada a análise de imunoistoquímica (IHQ) no Departamento of Medical Microbiology and Immunology, University of CA, Davis, One Shields Ave, Davis, CA 95616 nos EUA para detectar e localizar Criptina 5 na mucosa do intestino delgado. Tecidos do intestino delgado foram incluídos em blocos de parafina após a fixação em formol tamponado 10%. As seções de tecidos de 5 micra foram incubadas com anticorpo policlonal Crp5 (SHANAHAN *et al*., 2010), durante a noite a 4°C, seguidos por incubação com Alexa 555, anticorpos secundários, durante 1 h, descrito por RAFFATELLU, *et al* (2008). Os cortes foram montados usando SlowFade com DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA). As imagens foram capturadas por microscopia confocal a laser utilizando-se do LSM 5 e software Pascal (Zeiss, Nova Iorque) analisados com o software Image J ®, NIH, Maryland.

2.3 Quantidade de Células de Paneth na Mucosa do Duodeno de Leitões

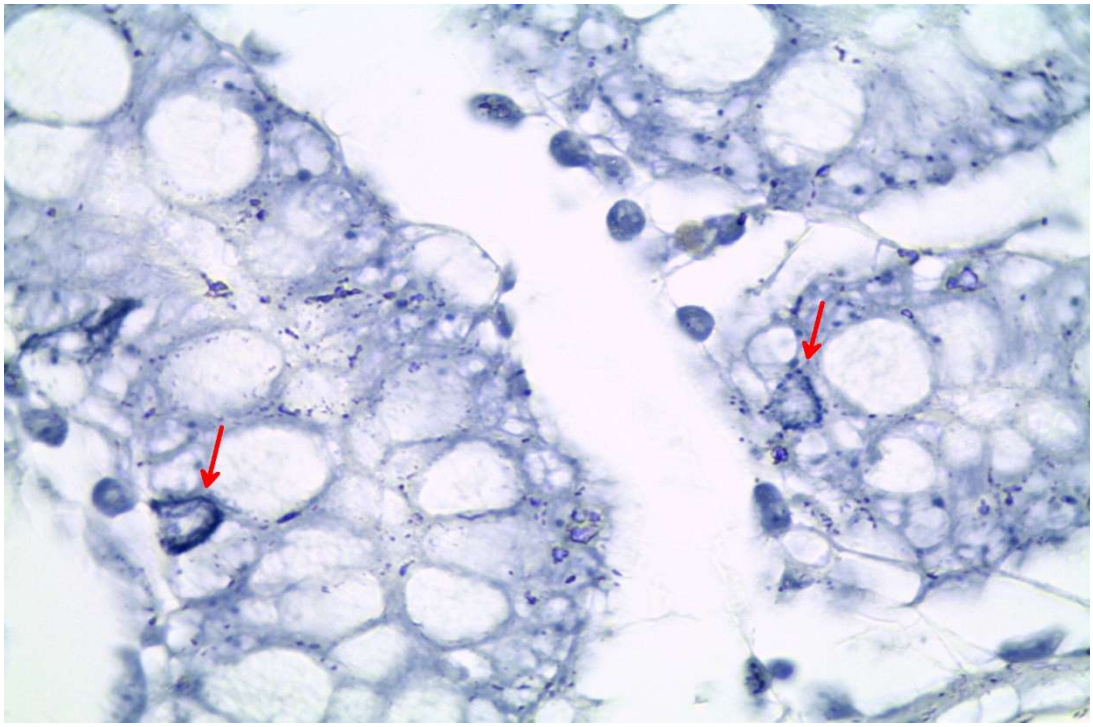
Em um frigorífico abateram-se 25 leitões com idade média de 65 dias. Na linha de inspeção das vísceras do SIF, colheram-se anéis circulares de dois cm de duodeno, que foram abertos e lavados com soro fisiológico. Para remover resíduos da digesta, esticou-se a mucosa em cortiça e fixando-a com auxílio de alfinetes. Os fragmentos foram mantidos abertos. A mucosa ficou exposta e a amostra foi fixada por 24 h em formol tamponado a 10%, posteriormente fizeram lâminas por rotina histológica.

Utilizou-se a coloração de Hematoxilina plúmbica (Figura 1) modificada de (BANCROFT & STEVENS, 1996) para melhor visualização e contagem do número de células de Paneth por campo.

A cuba com as lâminas imersas no corante hematoxilina plúmbica ficou em estufa a 40ºc por 4 h. Depois foram lavadas em água destilada, desidratadas em soluções

de álcoois crescente, diafanizadas em xilol PA em três cubas distintas e montadas com lâminula e entelan®.

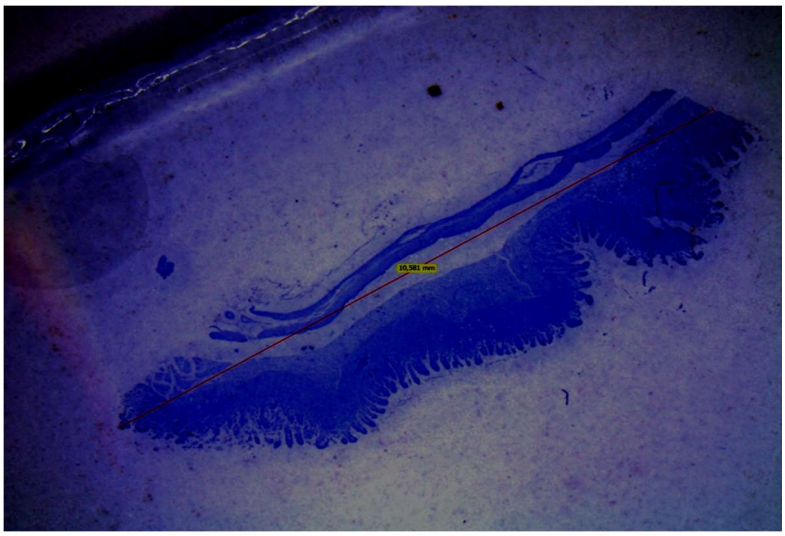
Figura 1: Células de Paneth na ponta das setas na mucosa do duodeno de leitões com 56 dias de idade, coloração hematoxilina plúmbica.



Fonte: Próprio autor

Após avaliação histológica, foi realizada a captura de imagens das células de Paneth utilizando microscopia de luz com equipamento Leica DM500 acoplado com a câmera de captura de imagens Leica ICC50. Com o uso do microscópio óptico utilizando objetiva de imersão foi feita a contagem do número de células de Paneth em todos os campos do fragmento do intestino. Posteriormente, foi mensurada à área linear da superfície da mucosa usando uma lupa Leica M205C e uma câmera Leica DFC295 para capturar as imagens e medir o comprimento linear do corte na lâmina histológica. (Figura 2)

Figura 2 – Comprimento linear do corte do duodeno de leitão com 65 dias, sentido maior da linha vermelha. Imagem capturada via lupa. Fotomicrografia de duodeno de suíno.



Fonte: O próprio autor.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

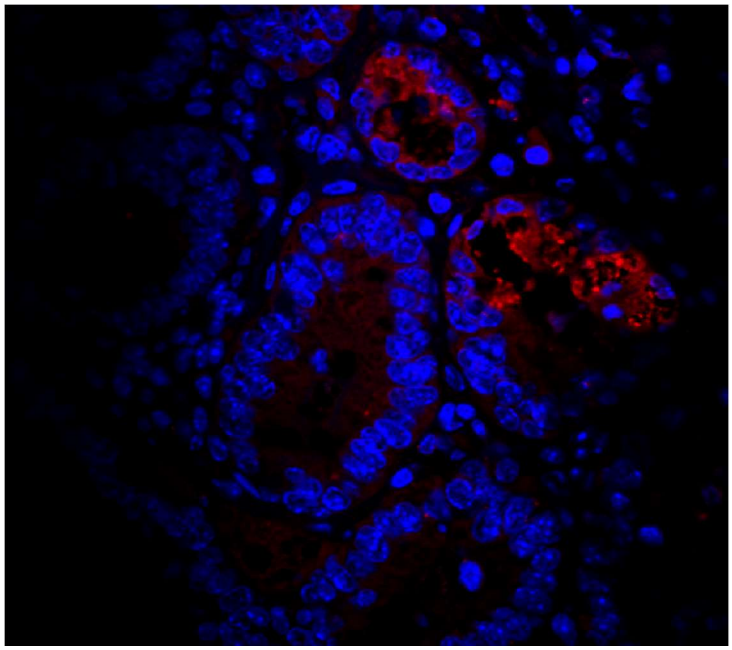
Houve diferentes respostas nas quantidades das células de Paneth em relação aos aditivos utilizados na ração (Figura 3).

Relatos de CADAR (2010) diz que as células de Paneth estão presentes em número reduzido nas criptas duodenais. Na maioria dos casos, as CP foram identificadas pela presença de grânulos após coloração histoquímica. No entanto, algumas vezes, os produtos específicos da CP são detectados apenas por imunoistoquímica e a ausência destas na cripta necessita ser interpretada com cautela.

Há relatos contraditórios como os de OSWALD (2006) e VELDHUIZEN *et al*. (2007), os quais relatam que os suínos não apresentam células de Paneth, pelo fato dos enterócitos também produzirem vários peptídeos antimicrobianos.

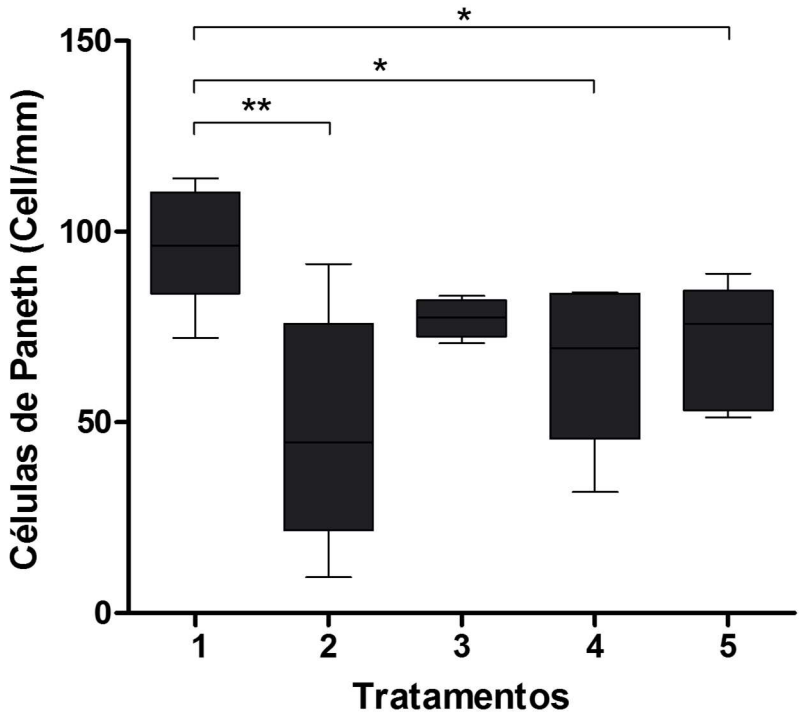
A resposta das células de Paneth-CP aos estímulos do microbioma e contaminantes intestinais é fundamental para modular e definir a MI. E assim promove uma melhor tolerância imunológica local (MARTÍNEZ *et al.*, 2009). E por evitar uma resposta imunológica sistêmica de uma forma exacerbada, evita distúrbios entéricos alérgicos.

Figura 3 – Imagem do duodeno de leitão capturada de microscópio confocal em aumento de 100 vezes com destaque em vermelho. Células em Paneth com anticorpo primário policional Crp5 e secundário Alexa 555, em azul núcleos marcados com DAPI pela técnica de imunoistoquímica.



Fonte: O próprio autor.

Figura 4 – Contagem de células de Paneth/mm linear de mucosa do duodeno de leitões aos 65 dias de idade submetidos a cinco diferentes tratamentos, sendo: (1) controle negativo, sem nenhum aditivo; (2) antimicrobiano; (3) probiótico; (4) prebiótico e (5) simbiótico. *P< 0,05, ** P<0,01.



Fonte: O próprio autor.

Os leitões do T1, controle negativo, sem uso de qualquer tipo de promotor de crescimento, tiveram maior quantidade de CP por mm/linear de mucosa. Pode-se inferir que o maior desafio de possíveis antígenos da dieta e ou do ambiente promoveu uma resposta imunológica mais exacerbada devido à ausência de um promotor modulador do microbioma duodenal.

E a dieta com antimicrobiano, T2, teve a menor quantidade de CP. Este grupo apresentou maior tolerância, supostamente a carga de antígenos oriundos da dieta e da microbiota foi reduzida e/ou inativada, e, em contato com a mucosa intestinal promoveu menor ação antigênica. Portanto houve uma resposta imunológica menos acentuada do intestino, pois ocorreu a menor quantidade de células de Paneth por mm/linear de mucosa, comparado ao tratamento do controle negativo. Sob outra visão promover um baixo estímulo imunológico ao intestino, também se promove uma fraca capacidade de debelar simples

processos infecciosos desencadeados por desbalanço da microbiota, denominado de disbiose ou por um simples desafio de dieta contaminada.

Os animais que consumiram probiótico no T3 tiveram uma tolerância imunológica intestinal mais equilibrada e homogênea devido ao microbioma mais saudável, talvez tenha ocorrido uma modulação benéfica da microbiota.

A redução de CP no T4 possivelmente foi pelo uso de fibras do MOS, por servir de alimentos a um seleto grupo de bactérias benéficas e devido a um substrato mais adequado sobressaíram. Isto fez com que as maléficas e grandes desafiadoras do sistema imunológico fossem reduzidas por exclusão competitiva. Evento visto por McCULLOUGH et al. 1998 quando usou fibras na dieta de alguns indivíduos. E contrário do que (CARLOS, 2006), observou em camundongos que ao receberem uma dieta com fibras, houve aumento das CP.

Os leitões que receberam prebióticos e simbióticos respectivamente T4 e T5 tiveram uma menor quantidade de CP, possivelmente devido a uma imunomodulação saudável na microbiota, favorecendo uma resposta mais moderada ao comparar com T1.

O menor desafio do GALT reduz a necessidade de grande quantidade de células relacionadas à defesa do intestino, como afirmam (McCULLOUGH et al. 1998), e, assim, promove uma economia de energia que seria desviada da produção para atender a demanda do sistema imunológico.

Outro mecanismo que pode explicar a interação entre probióticos e a barreira intestinal correlaciona-se com os peptídeos antimicrobianos das células do hospedeiro. As duas principais famílias desses peptídeos são as defensinas e catelicidinas. A expressão de catelicidina é induzida pelo butirato, produzido pela microbiota intestinal (SCHAUBER et al., 2003); (RUBHANA et al., 2006) usaram butirato para tratar infecção por *Shigella* em coelhos e encontraram uma significativa redução na disenteria que foi correlacionada com uma “upregulation” de catelicidina.

O uso de simbiótico confirma dados da literatura de que o MOS serve de nutrientes para as cepas benéficas, o que foi observado no T5. Observou-se uma menor quantidade de células de Paneth em relação ao controle negativo, possivelmente devido a menores estímulos antigênicos pela redução da população das indesejáveis. Segundo (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002) o consumo de prebiótico, associado com probiótico, gera uma vantagem competitiva para o último.

Alternativamente, esse efeito simbiótico pode ser direcionado às diferentes regiões “alvo” do intestino delgado e grosso. O consumo de probióticos e de prebióticos selecionados apropriadamente pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato/micro-organismo ideais (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; PUUPPONENPIMIÄ et al., 2002; MATTILA SANDHOLM et al., 2002; BIELECKA, BIEDRZYCK, MAJKOWSKA, 2002).

A secreção de defensinas é importante na defesa contra patógenos entéricos por não requerer uma inflamação intestinal significativa (JONES & BENVINS, 1982), evitando perdas de energia ao debelar a infecção em prol da produção animal.

Os probióticos exercem vários efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo a interação com o sistema imunológico, e a produção de substâncias antimicrobianas, melhoria da mucosa, na função de barreira e competição com enteropatógenos por sítios de adesão (BOESTEN & DE VOS, 2008).

Os diferentes compostos extracelulares responsáveis por esses processos, proteínas secretadas e liberadas no ambiente por bactérias probióticas (proteínas extracelulares) podem mediar certas interações, uma vez que elas seriam capazes de interagir diretamente com células da mucosa, tais como as células epiteliais e imunológicas (SANCHEZ et al., 2008a).

4 CONCLUSÃO

Confirmou-se a presença de células de Paneth por coloração com Hematoxilina plúmbica e por imunoistoquímica, e os aditivos alimentares adicionados na dieta alteraram o número das células de Paneth no duodeno de leitões, possivelmente por modularem a microbiota.

REFERÊNCIAS

1. AYABE T. , SATCHELL D. P., WILSON C. L. PARKS W. C. , SELSTED M., QUELLETTE A. J. Secretion of ,microbicidal α-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nature immunol** 2000, 1:113-8.

2. BANCROFT J. D. & STEVENS A. **Theory and Pratice of Histological techniques**, Nova York: Churchill Livingstone, 1996. 766 p.

3. BENVINS C. L. The Paneth cell and the innate immune response. **Curr Opin Gastroenterol**. ,[S.l], v. 20, n. 6, Nov. p. 572-580, 2004

4. BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.,** Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

5. CADAR M. E., Cytomorphology Observations of Small Intestine Mucosa in **Pig Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v.67,p.1-2, 2010,

6. CHAUBER, J.; SVANHOLM, C.; TERMEN, S. *et al*. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. **Gut** 2003; 52: 735–741.

7. HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Res. Int**., Amsterdam, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

8. JONES D. E. & BENVINS C. L. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.32, Nov 15, p.23216-25.1992.

9. KIERSZENBAUM A. L. 2004. Sistema digestório inferior. In**: Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Saunders**,** Elsevier, p.449-474.

10. KIERSZENBAUM A. L., ABRAHAM L. , TRES L **Histologia e biologia celular uma introdução à patologia.** 3. ed. . Tradução de Claudia Coana...et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, 704.

11. LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J., & DE KEERSMAECKER, S. C. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, ,[S.l], v.8, p171 - 184. 2010.

12. LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. **Clinical Microbiology Reviews***,* 315-337, 2006.

13. MALOZI M. C. A importância da microbiota no sistema imunológico **Pediatria Moderna,** ,[S.l], v.48,n.10, out. 2010.

14. MARTÍNEZ G.D.I., A. J. C., BECERRIL I. V., MONTES A. B. Cambios morfológicos producidos por el estrés sobre la población de células de Paneth, **Revista Medica del Hospital Genera**l , México,v.. 72, n. 3,p.129-135, Jul.-Sep. 2009.

15. MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. *Technological challenges for* future probiotic foods. **Int. Dairy J**., Amsterdam, v.12, p.173-182, 2002.

16. McCULLOUGH J. S., RATCLIVE B., MANDIR N., CARR K. E., GOODLAD R. A., Dietary fibre and intestinal microflora: Vects on intestinal morphometry and crypt branching. **Gut**; v.42:799–806, 1998.

17. MORAIS M. B. & JACOB C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, 2006, doi:10.2223/JPED.1559.

18. MULLER C. A. AUTENRIETH I. B., PESCHEL A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier, **Cell molecular life Science** 2005, 62:1297-307.

19. OSWALD, I. P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. **Vet Res**, [S.l], v.37p. 359-368,2006.

20. PIRLICH, M.; NORMAN, K.; LOCHS, H.; BAUDITZ, J. Role of intestinal function in cachexia. Cur. Opin. **Clin. Nutr. Metab. Care**, [S.l], v. 9, p. 603–606, 2006.

21. PORTER E. M., BEVINS C. L., GHOSH D. AND GANZ T**., Review The multifaceted Paneth cell.** Cell. Mol. Life Sci. 59, Birkhäuser Verlag, Basel, 2002.

22. PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALDENTEY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol**., Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

23. RAFFATELLU M., SANTOS R. L., VERHOEVEN D. E., GEORGE M. D., WILSON R. P., SEBASTIAN E WINTER, GODINEZ I., SANKARAN S., PAIXAO T. A., GORDON M. A., KOLLS J. K., DANDEKAR S.,1 and BÄUMLER A. J. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut. **Nature medicine**, [S.l], v. 14, n.4p. 421-428, 2008.

24. SALZMAN N. H., POLIN R. A., HARRIS M. C., RUCHELLI E., HEBRA A., ZIRIN-BUTLER S. et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. **Pediatr Res** 1998; 44:20-6.

25. SHANAHAN MT, VIDRICH A, SHIRAFUJI Y, DUBOIS CL, HENSCHEN-EDMAN A, HAGEN SJ*, et al.* Elevated expression of Paneth cell CRS4C in ileitis-prone SAMP1/YitFc mice: regional distribution, subcellular localization, and

mechanism of action. **The Journal of biological chemistry,** [S.l], v.285,n.10, p. 7493-7504, 2010.

26. SPRING, P. Yeast's secret weapon aids animal production. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL. 2000, Campinas. **Anais…** Campinas: CBNA, 2000. p.41-50.

27. VELDHUIZEN, E. J., VAN DIJK A., TERTEEG M. H. KALKHOVE S.I., VAN DER MEULEN J., NIEWOLD T. A., HAAGSMAN H. P. Expression of betadefensins pBD-1 and pBD-2 along the small intestinal tract of the pig: Lack of upregulation in vivo upon Salmonella typhimurium infection**. Molecular Immunology**, ,[S.l], v. 44,p. 276-283,2007

28. WIEST, R.; RATH, H.C. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract.Res.* **Clin.Gastroenterology**, [S.l], v. 17, n. 3, p. 397- 425, 2003.

29. ZANONI, F.L.; BENABOU, S.; GRECO, K.V.; MORENO, A.C.R.; CRUZ, J.W.M.C.; FILGUEIRA, F.P.; MARTINEZ M. B.; FIGUEIREDO L.F.P.; SILVA M. R. SANNOMIYA P. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bactéria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. **Clinics**, ,[S.l], v. 64, n. 9, p. 911-919, 2009

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os aditivos de rações utilizados neste experimento são tecnologias que implementam ganhos significativos e podem ser recomendados, pois os resultados revalidam suas aplicações, uma vez que promoveram aumento de células caliciformes com muco neutro no duodeno quando adicionou probiótico a dieta, houve aumento sem alterar o padrão fisiológico. As células de Paneth com o uso de aditivos tiveram redução comparada ao controle negativo, podendo inferir que houve menor gasto de energia por poupar o sistema imunológico. Além de esperar uma melhor saúde intestinal em função de uma provável microbiota mais saudável e mais apta à criação de leitões na fase de creche.