

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - PRODUÇÃO ANIMAL

**MANANOLIGOSSACARÍDEO E COLISTINA NA DIETA
DE LEITÕES DESMAMADOS**

Regis Kamimura
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL
Fevereiro de 2006

REGIS KAMIMURA

MANANOLIGOSSACARÍDEO E COLISTINA NA DIETA
DE LEITÕES DESMAMADOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof.^a Dra. Vânia Maria Arantes
Co-orientadora: Prof.^a Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

K15m Kamimura, Regis, 1961-
 Mananoligossacarídeo e colistina na dieta de leitões desmamados
 [manuscrito] / Regis Kamimura. 2006.
 70 f. : il.

 Orientador:. Vânia Maria Arantes.
 Co-orientadora: Neide Maria da Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.
 1. Leitão (Suíno) - Nutrição - Teses. 2. Nutrição animal - Teses.
 I. Arantes, Vânia Maria. II. Silva, Neide Maria da. III. Universidade
 Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Veterinárias. IV. Título.

CDU: 636.4.085

SINAL CERTO

Há inúmeros benefícios que a Bondade Divina te oferta, sem que percebas.

O ar que respiras.
O sol que te aquece.
O grão que te nutre.
A água que te dessedenta.
A brisa que te refresca.
A chuva que te beneficia.
A árvore eu te acolhe.
A planta que te cura.
A flor que te encanta.
O fruto que te alimenta.
A semente que te garante.
A idéia que te alivia.
A intuição que te ajuda.
O raciocínio que te esclarece.
O pensamento que te equilibra.
A inteligência que te privilegia.
O discernimento que te orienta.
A inspiração que te eleva.
A vida que te favorece. . .

* * *

Agradece a Deus o benefício espontâneo com que o Senhor te abençoa o caminho.

Ser grato pelo favor obtido é indício de consideração.

Contudo, agradecer ao Alto pelo bem que te acontece, sem que o tenhas pedido, é sinal certo de que já comesças a amar a Deus.

ANDRÉ LUIZ

**Aos meus filhos Letícia e Thales
e à minha esposa Cristina.**

**Aos meus pais (in memoriam)
Michiaharu Kamimura e
Jades Cardoso Kamimura
por todo carinho e amor.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de aprendizado e crescimento, pessoal e profissional;

Às empresas Alltech Agroindustrial Ltda, Nutron Nutrição Animal Ltda., Cesaro Comércio e Representações, Piracaíba Agropecuária Ltda., Centro Oeste Nutrição Animal pela colaboração fundamental na condução deste estudo;

A todos os professores do programa, em especial a minha orientadora, Prof.^a Dra. Vânia Maria Arantes;

A minha co-orientadora, Prof.^a Dra. Neide Maria da Silva, pelo apoio;

Aos mestres, Mara Regina Bueno de Mattos Nascimento, Elmo Gomes Diniz, Edmundo Benedetti, Humberto Eustáquio Coelho, José Octávio Jacomini, Rogério Chaves Vieira, Deise Aparecida de Oliveira; pelo exemplo de profissionalismo;

Aos Professores Dr. Marcelo Emílio Beletti, Dra. Maria Aparecida Martins Rodrigues, Dr. Paulo Roberto Ribeiro e Dr. Robson Carlos Antunes, por suas sugestões.

Aos funcionários da UFU, em especial aos da FAMEV e dos laboratórios de Imunologia e Histologia.

Aos colegas do mestrado, amigos veterinários e suinocultores que, além do aprimoramento dos conhecimentos, compartilharam da sabedoria da convivência harmoniosa.

Aos amigos André e Celso Basso; Rossana, Takeshi e Tadashi Ono; Sérgio Masaite Kato, cujo apoio foi fundamental para a concretização do mestrado.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

A DEUS por sua divina luz em todos os instantes da minha trajetória.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 “Status” sanitário ou ecológico dos animais	6
2.2 Antimicrobianos como promotores de crescimento em suínos.....	8
2.3 Substâncias prebióticas, fontes e modo de ação.....	10
2.3.1 Mananoligossacarídeos (MOS)	12
2.4 Resposta humoral – produção de IgA e IgG sérica total	13
2.5 Morfologia da mucosa intestinal de leitões.....	18
2.6 Imunoistoquímica de células IgA positivas	22
3. MATERIAL e MÉTODOS	24
3.1 Local e instalações.....	24
3.2 Animais	24
3.3 Tratamentos e Rações Experimentais.....	24
3.3.1 Tratamentos	24
3.3.2 Rações Experimentais.....	25
3.4 Ganho médio diário de peso (GMDP)	28
3.5 Histomorfometria Intestinal	28
3.5.1 Colheita de tecidos e fixação.....	28
3.5.2 Preparo dos fragmentos.....	29
3.5.3 Coloração de hematoxilina-eosina.....	29
3.5.4 Análise morfométrica da mucosa intestinal	30
3.5.5 Porcentagem de células caliciformes por área delimitada	30
3.6 Colheita de sangue.....	32
3.7 Conjugação do anticorpo com a biotina	32
3.8 Dosagem de IgA sérica total pelo teste ELISA	32
3.9 Dosagem de IgG sérica total pelo teste ELISA.....	33
3.10 Imunoistoquímica e identificação de células IgA positivas.....	34
3.10.1 Processamento histológico	34
3.10.2 Reação imunoistoquímica	34
3.11 Análise econômica.....	35
3.12. Delineamento estatístico	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.....	37
4.2 Histomorfometria intestinal	39
4.3 Níveis de IgA sérica total pelo teste ELISA	42
4.4 Níveis de IgG sérica total pelo teste ELISA	44
4.5 Imunoistoquímica em células IgA positivas no duodeno e linfonodos mesentéricos	46
4.6 Análise econômica.....	47
5 CONCLUSÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

IgA	-	Imunoglobulina A	-
SIPS	-	Sistema intensivo de produção de suínos	
TGI	-	Trato gastrointestinal	
FOS	-	Frutoligossacarídeos	
MOS	-	Mananoligossacarídeos	
kg	-	Quilograma	
PT	-	Período total	
kcal / kg	-	Quilocalorias por quilograma	
GMPD	-	ganho médio diário de peso	
PA	-	Puro para análise	
pH	-	Potencial de hidrogênio	
AE-PA	-	Álcool etílico PA	
Xi-PA	-	Xilol PA	
°C	-	Graus Celsius	
µm	-	Micrometros	
PAS	-	Periodic Acid Schiff	
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assays	
µg	-	Micrograma	
M	-	Molar	
µL	-	Microlitro	
NH ₄ Cl	-	Cloreto de amônio	
PBS	-	Solução tampão salina fosfato	
LV	-	Largura média do vilo	
CV	-	Comprimento médio do vilo	
LC	-	Largura média da cripta	
IgG	-	Imunoglobulina G	

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1. Protocolo de utilização do Bio-Mos®	25
Tabela 1. Níveis nutricionais das rações experimentais utilizadas de 21 aos 63 dias de idade nos diferentes períodos	25
Tabela 2. Composição percentual e preços da ração pré-inicial nos diferentes tratamentos	26
Tabela 3. Composição percentual e preços da ração Inicial 1 nos diferentes tratamentos.....	27
Tabela 4. Composição percentual e preços da rações Iniciais 2 nos diferentes tratamentos.....	27
Tabela 5. Consumo de ração (kg) por tratamento, de leitões na fase de creche alimentados com dietas com e sem colistina, e ou com Bio-Mos®	37
Tabela 6. Médias de ganho de peso por animal (kg/período), por períodos, de leitões na fase de creche de acordo com os tratamentos.....	38
Tabela 7. Conversão alimentar estimada (kg) por tratamento, de leitões alimentados com dietas com e sem colistina, e ou com Bio-Mos® na fase de creche.....	39
Tabela 8. Comprimento médio dos vilos (CV), largura média dos vilos (LV), largura média das criptas (LC), em μm , e superfície de absorção da mucosa intestinal (M) de leitões aos 63 dias de idade, submetidos a quatro diferentes tratamentos.....	40
Tabela 9. Porcentagem de células caliciformes (CC) e desvio-padrão em leitões aos 63 dias de idade, submetidos a quatro diferentes tratamentos.....	47
Tabela 10. Custo médio de alimento por kg de peso vivo ganho por tratamento (C_{mei}), de acordo com o período.....	47
Tabela 11. Índice de Eficiência Econômica avaliado de acordo com o período.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Exemplo de imagem digital (A) e binária (B) segmentada por “threshold”. Corte histológico do cólon de leitão com 63 dias de idade, coloração azul de alcian e PAS (Periodic Acid Schiff). Setas de cor azul exemplificam regiões de células caliciformes.....	31
Figura 2 Níveis de IgA sérica total em leitões aos 21 dias de idade submetidos	43
Figura 3 Níveis de IgA sérica total em leitões aos 35 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos.	43
Figura 4 Níveis de IgA sérica total em leitões aos 63 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos	44
Figura 5 Níveis de IgA sérica total em leitões aos 63 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos.	45
Figura 6 Níveis de IgG sérica total em leitões aos 21 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos.....	45
FIGURA 7 Contagem de células IgA positivas no duodeno de leitões aos 63 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos.....	46

MANANOLIGOSSACARÍDEO E COLISTINA NA DIETA DE LEITÕES DESMAMADOS

RESUMO - Objetivou-se avaliar os efeitos da utilização de prebiótico, antimicrobiano ou associação de ambos na ração de leitões sobre desempenho, histomorfometria intestinal, os níveis de IgA e IgG séricas totais, e presença de células IgA positivas em cada tratamento. O experimento de campo foi realizado em uma granja comercial de ciclo completo, utilizou-se de 100 leitões machos, castrados, de mesma composição genética, dos 21 até 63 dias de idade, distribuídos em 4 tratamentos com 5 repetições: T_1 = ração basal com antimicrobiano como promotor de crescimento convencional (sulfato de colistina, 40 ppm); T_2 = Ração basal sem nenhum promotor de crescimento; T_3 = T_1 + prebiótico Bio-Mos[®]; T_4 = T_2 + prebiótico Bio-Mos[®]. Amostras de sangue foram colhidas nos dias 0, 14 e 42 dias pós-desmame para mensurar IgA e IgG totais pelo teste ELISA. Os fragmentos de tecidos para histomorfometria foram colhidos no momento do abate, aos 63 dias de idade. Concluiu-se que não houve diferenças de desempenho entre a utilização de prebiótico, antimicrobiano ou associação destes em leitões na fase de creche, a superfície de absorção da mucosa duodenal foi maior, assim como observou maior quantidade de células IgA positivas no duodeno em leitões tratados com prebiótico e, quando associado ao antimicrobiano, foi capaz de aumentar os níveis de IgA sérica total aos 42 dias pós-desmame, enquanto os níveis séricos de IgG total foram maiores nos animais que não receberam nenhum promotor de crescimento nesta granja com alto desafio sanitário.

Palavras-chave: colistina, imunoglobulinas, leitões, mananoligossacarídeo, superfície de absorção intestinal

MANNAN OLIGOSACCHARIDE AND COLISTIN ON WEANING PIGLETS DIET

ABSTRACT - The objective of this trial was to evaluate the effects of prebiotic, antimicrobial, or association of both promoters in piglets diet upon performance, intestinal histomorfometry, and total IgA and IgG serum levels, in each treatment. The experiment was carried out in commercial pig farm, one-site production, using a hundred weaned castrated males, hybrid piglets, from 21 to 63 days of age, distributed in 4 traits with 5 repetitions: T1 = basal feed + antimicrobial as conventional growth promoter (colistin sulphate, 40 ppm); T2 = basal feed without any growth promoter; T3 = T1 + Bio-Mos[®] prebiotic; T4 = T2 + Bio-Mos[®] prebiotic. Pieces of intestine were sampled on last day of the trial. There were no differences on performance. The duodenal absorptive mucosa surface was higher in piglets treated with prebiotic and the use of prebiotic by long term post-weaning enhanced immunostimulation. Blood samples were collected on days 0, 14 and 42 days post weaning to measure total IgA and IgG by ELISA test. Fragments of tissue for histomorfometry were collected at slaughter, when piglets were at 63 days of age. It was concluded that there were no differences on nursery piglets performance using prebiotic, antimicrobial, or association of both promoters; the small intestine absorptive surface was higher in piglets treated with prebiotic, and when associated to antimicrobial promoter, was able to increase the levels of total serum IgA at 42 days post weaning, while total serum IgG levels were higher in piglets which didn't receive any growth promoter in this high health challenge pig farm.

Keywords: colistin, immunoglobulins, piglets, mannan oligosaccharides, intestinal absorption surface.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira é uma atividade do setor agropecuário com perfil bastante definido e tem conquistado o mercado externo. Em 2000, o Brasil exportou 127.883 toneladas de carne suína, e em 2005, alcançou a cifra de 625.075 toneladas, registrando um aumento de 388,79% nos últimos cinco anos, segundo a ABIPECS (Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, 2006).

Conforme o departamento de doenças emergentes e outras doenças notificáveis da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), a utilização de antibióticos na produção animal é considerada um risco crescente para a saúde humana. Na nutrição animal na produção de carnes de aves e suínos, ainda se faz uso rotineiro de vários antimicrobianos em doses subclínicas, os quais lideram as vendas no mercado de promotores de crescimento. Na Europa, existe intenso trabalho de técnicos de órgãos oficiais e associações de consumidores em prol da restrição total ao uso de antibióticos como promotores de crescimento. No Brasil, estão proibidas a clortetraciclina, oxitetraciclina, penicilinas e sulfonamidas sistêmicas para alimentação animal, conforme a portaria ministerial nº 193, de 12 de maio de 1998. Alguns importadores de carne brasileira impõem a remoção dos promotores de crescimento convencionais, como antibióticos e antimicrobianos, sua substituição por outros que não deixem resíduos nas carnes ou induzam ao aparecimento de bactérias resistentes além de evitar danos ao meio ambiente (GONZALES, 2004).

A crescente inquietação pública quanto à utilização de antibióticos e seus problemas potenciais como toxicidade, alergia e desenvolvimento de resistência (MONTES, PUGH, 1993) têm estimulado o interesse clínico pelos probióticos como suplemento (SISSONS, 1989; PARKER, 1990).

O agronegócio brasileiro é fortemente influenciado pelo mercado internacional, cuja demanda interfere nas tecnologias adotadas e no sistema intensivo de produção de suínos (SIPS), bem como nas matérias-primas a serem utilizadas. Relatos de Luchiari Filho (2002) afirmaram que o bem-estar do povo está diretamente relacionado à sua condição alimentar, faz com que a produção animal e vegetal apresente uma importância vital para o desenvolvimento das nações.

O mundo passa por intensas e profundas transformações, as quais estende às esferas políticas, econômicas, culturais, sociais e tecnológicas, o que tem gerado novas tendências de mercado, afeta sobremaneira o perfil do consumidor de carnes e o seu padrão de consumo (SCHUTER, LEE 1999; REGMI, GETTHAR, 2001).

Na visão do conceito de marketing societal (KOTLER, 2000), deve-se oferecer ao consumidor o que é bom em longo prazo e não apenas o que ele deseja. Entretanto, as necessidades sociais se afloram, haja vista a preocupação com o meio ambiente, com a promoção da saúde das pessoas, com a segurança alimentar, com o cumprimento dos direitos humanos e com o bem-estar humano e animal.

Inserido neste contexto, objetivou-se comparar o ganho de peso, histomorfometria intestinal, níveis de IgA e IgG séricas totais, presença de células IgA positivas no duodeno e linfonodos mesentéricos de leitões submetidos a rações experimentais com promotor convencional, com prebiótico, associação de ambos, e sem nenhum promotor de crescimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos 20 anos o setor de alimentos investiu de maneira crescente no desenvolvimento de uma classe especial de produtos que, além de cumprir o seu papel básico na manutenção da vida, fornece nutrientes para o funcionamento do organismo, demonstram potenciais de reduzir o risco de determinadas doenças (CARLOS et al. ,2003).

Por tratar da fisiopatologia animal, o trato gastrointestinal (TGI) é um relevante canal para a entrada de patógenos no organismo e desenvolvimento de doenças. O animal possui barreiras protetoras naturais para prevenir tal invasão. Na maioria dos animais existem mais células de microrganismos da microbiota normal do trato intestinal do que células do próprio animal. A mucosa do TGI possui o ambiente ideal para colonização e crescimento de microrganismos (RICHTER, 1992). Alguns deles possuem grande importância na digestão e absorção dos nutrientes e participam da síntese de vitaminas (KOZASA, 1989).

De acordo com Richter (1992), outro papel importante da microbiota é preparar o intestino do neonato para se tornar um órgão imunológico, visto que os animais de laboratório com ausência de colonização bacteriana em sua mucosa possuem menos linfócitos e plasmócitos na lâmina própria se comparados aos animais convencionais.

O epitélio intestinal promove uma barreira fisiológica e imunológica contra microrganismos e substâncias estranhas, é o principal local de defesa do organismo. Em geral, este sistema imunológico de mucosa é homeostático, apesar da considerável carga presente no intestino (KASPER et al., 2004)

No útero, o feto é estéril. A aquisição da microbiota do neonato ocorre no nascimento ao adquirir microrganismos da flora vaginal da mãe (FULLER, 1989), e ainda sofrerá influência do ambiente e, em pouco tempo, estará estabelecida uma relação simbiótica que persiste por toda a vida do animal (HIDAKA, EIDA, 1988; EWING, COLE, 1994). Vários fatores influenciam a composição da microbiota intestinal, sendo a composição da dieta ingerida o mais importante (FERNANDES et al., 2000).

Relatos de Floch et al. (1972) apud Fernandes et al. (2000) demonstraram que os agentes antibacterianos endógenos moduladores da microbiota entérica de maior importância são os ácidos biliares. Os animais coprofágicos apresentam maior quantidade de bactérias no intestino delgado proximal em relação aos não coprofágicos, mas no cólon, o número é semelhante (LICHTMAN, 2000). Cook (2004) citou que 1 a 2% do peso animal corresponde à microbiota do TGI.

A secreção ácida gástrica destrói grande parte das bactérias no intestino delgado provenientes da cavidade oral e ou ingeridas com os alimentos. Com o uso contínuo de antiácidos em humanos, pode-se observar aumento na microbiota do duodeno. A motilidade intestinal e a imunidade da mucosa intestinal interferem na composição da microbiota intestinal. A barreira anatômica exercida pela válvula ileocecal atua separando as espécies gram-positivas predominantes no intestino delgado superior das espécies gram-negativas que habitam o cólon (MORAIS, NETO 2003).

As principais funções da microbiota intestinal são: metabolismo, fermentação de carboidratos não digeríveis e de muco, produção de ácidos graxos de cadeia curta e vitamina K, absorção de íons, ação trófica do controle da proliferação e diferenciação celular, desenvolvimento da homeostase e do sistema imunológico, proteção contra patógenos e resistência à colonização (GUARNER, MALAGELADA, 2003). Relatos de Katzung (2006) alguns microrganismos do ceco podem contribuir com a biotransformação de diferentes drogas na modificação da estrutura inicial da droga e ou da pró-droga. A biotransformação de fármacos e outros agentes xenobióticos em metabólitos mais hidrofílicos são essenciais para o término de sua atividade biológica e para sua eliminação do organismo, na maioria das vezes pela urina.

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) é expressiva na imunidade intestinal dos animais, pois fornece estímulo primário para o desenvolvimento e maturação de células linfóides nas placas de Peyer e todos os componentes necessários para iniciar uma reação imunológica pelas células T, células B precursoras das células do plasma que produzem anticorpos ou imunoglobulinas. Pode estimular a expressão dos glico-conjugados epiteliais específicos em superfícies luminais, os quais vão servir de receptores para a aderência de bactérias (SALMINEM, 1998; DEPLANCKE, 2001).

Cerca de 70 a 80% das células produtoras de imunoglobulinas estão localizadas no TGI, e mais de 60% da produção diária total de imunoglobulinas são de IgA intestinal. (SALMINEN, 1998; BENGMARK, 2002; BRANDTZAEG, 1989). A IgA intestinal ou IgA secretória é produzida por células da mucosa intestinal, e tem importância fundamental no intestino contra bactérias e vírus. O principal modo de ação da IgA é evitar a aderência de bactérias às superfícies mucosas (ORGANACT)

Os principais desequilíbrios da microbiota intestinal estão ligados a fatores estressores como a desmama, vacinação, doenças clínicas ou subclínicas, mudanças bruscas da alimentação, mudança de ambiente, transporte por longas distâncias, dentre outros, além do uso oral de altas doses de antibióticos e ou por seu uso prolongado (SALMINEN, DEIGHTTON, GORBACH, 1993).

Como as rações de aves e suínos no Brasil são formuladas principalmente à base de milho e farelo de soja, nas granjas com bom manejo alimentar e sanitário, a maioria dos probióticos e prebióticos podem atender adequadamente ambas as espécies. Porém deve-se atentar para a especificidade de cada espécie, incluindo a humana.

Um dos pontos críticos de contaminação biológica no abate dos animais para produção de carne ocorre na abertura das cavidades torácica, abdominal e na evisceração, quando microrganismos patogênicos do intestino podem contaminar a carcaça. Segundo BERENDS; URLINGS; SNIJDERS (1997), 70% são dos próprios animais e os demais 30% são de contaminação cruzada, portanto o uso de antimicrobianos e ou de moduladores da microbiota intestinal na dieta destes animais pode reduzir este risco, pois favorece o crescimento das bactérias benéficas ao hospedeiro (MATHEW et al. 1993; COLLET, 2000).

Do ponto de vista de higiene e saúde pública da carne, vários avanços foram feitos como, por exemplo, a diminuição da incidência de cisticercose suína e eliminação de endo e ectoparasitas de aves e suínos criados em confinamento. As rações fornecidas e formuladas para atender as exigências nutricionais, promovem a saúde dos rebanhos e ganhos superiores a 1000 g/dia para suínos em fase de terminação (BELLAYER, 2005). Porém, nos últimos anos tem ocorrido sensível mudança nos paradigmas que dirigem o foco da produção animal, havendo maior necessidade de assegurar também a qualidade e a inocuidade da carne.

Os microingredientes nutricionais são substâncias ou misturas intencionalmente adicionadas às rações com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades desejáveis e suprimir as indesejáveis, obedecendo às normas de utilização. Nesta classificação, como pró-nutrientes incluem-se os promotores de crescimento, convencionais ou não, segundo o Compêndio de Brasileiro de Alimentação Animal (1998).

Os aditivos destinados à alimentação animal são classificados em cinco grupos (GONZALES, 2004): (1) tecnológicos (conservantes, antioxidantes, emulsificantes, estabilizantes, espessantes, gelificantes, antiaglomerantes, reguladores de acidez); (2) sensoriais (corantes, aromatizantes e palatilizantes); (3) nutricionais (vitaminas, aminoácidos, elementos traços e fontes purificadas de energia); (4) zootécnicos, que são os melhoradores da digestibilidade (enzimas, ácidos orgânicos), melhoradores da microbiota intestinal (microrganismos e oligossacarídeos), promotores de crescimento, botânicos (ervas, especiarias e extratos, óleos e essências de ervas); e (5) antiparasitários (anticoccidianos e anti-histomoníases).

A tendência européia de remoção dos antimicrobianos das rações tem aumentado a busca de produtos alternativos substitutivos aos promotores convencionais. Entre esses, de acordo com Fernandes et al. (2000), estão os suplementos probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos e mananoligossacarídeos (MOS), entre outros, que podem trazer benefícios à saúde dos animais domésticos. À medida que as bactérias probióticas e os mananoligossacarídeos (MOS) são administrados, a condição de eubiose se torna permanente, assim impossibilita o estabelecimento de *Escherichia coli*, *Clostridium sp*, *Salmonella sp*, aumenta o número de bactérias benéficas produtoras de ácidos orgânicos como o ácido láctico, acético e butírico (OYOFO et al., 1989; ITO et al., 2004).

2.1 “Status” sanitário ou ecológico dos animais

O “*status*” sanitário ou ecológico define a relação dos animais com o seu ambiente particular e específico, por incluir a microbiota ou o conjunto de organismos

associados aos animais, e os organismos presentes nos limites do ambiente físico e barreiras sanitárias. Na microbiota incluem-se os vírus, bactérias, fungos e parasitas, e quanto mais eficientes forem às barreiras sanitárias deste ambiente, menores as probabilidades de contaminação dos animais (COUTO, 2002). A partir dessa definição pode-se classificá-los em três grupos distintos: (1) os animais gnotobióticos, (2) “Specific Pathogen Free” ou SPF (animais livres de germes patogênicos específicos) e (3) animais convencionais.

Em 1885, Louis Pasteur expressou seu ponto de vista sobre a importância das bactérias, ao afirmar que a vida na ausência de microrganismos seria impossível (TANNOCK, 2005). Os animais “germ-free” sobrevivem sem uma microbiota, porém os prejuízos são significativos para o desenvolvimento imunitário dos mesmos (BOURLIOUX et al., 2003).

Animais gnotobióticos possuem microbiota associada definida e devem ser criados em ambientes dotados de barreiras sanitárias absolutas. Referem-se a animais que possuem microbiota conhecida, não existente ou não detectável. A produção de animais com este padrão sanitário só é possível mediante equipamentos especiais, como isoladores. O termo gnotobiótico, palavra de origem grega que significa vida conhecida, pode ser utilizado tanto para animais livres de germes como para aqueles com um ou mais organismos detectáveis. Assim, em virtude da quantidade de microbiotas que estejam associadas ao animal, este pode ser classificado em “germ free” (GF) ou de flora definida (FD). Os animais GF são totalmente livres de microbiota e isentos de quaisquer parasitos internos e externos, podendo ser denominados de animais axênicos, ou seja, animais livres de vida associada. Os animais GF que foram intencionalmente contaminados com um tipo de microrganismo ou parasitos específicos são denominados de monoxênicos. Os dixênicos, com dois tipos de microbiota, e os polixênicos são relativos aos contaminados, deliberadamente, com várias microbiotas (COUTO, 2002).

O mesmo autor classifica os organismos em SPF aqueles livres de microrganismos e parasitos específicos, porém não necessariamente livres de outros não-específicos. São também denominados de heteroxênicos, pois albergam somente microrganismos não patogênicos, incapazes de causar doença.

A microbiota interage com as células do epitélio intestinal do hospedeiro e provoca uma resposta contínua do sistema imunológico; este, por sua vez, tende a

desenvolver-se e constitui importante componente do sistema imune (SCHIFFRIN, BLUM, 2002).

O trato gastrointestinal com a microbiota são considerados importantes para a tolerância imunológica (GUARNER, MALAGELADA, 2003; ISOLAURI et al., 2001)

Evidências da importância da microflora intestinal para o desenvolvimento do sistema imune foram obtidas pelos estudos realizados nos animais “germ-free”. Nestes animais observou-se que a mucosa intestinal apresentava baixa densidade de células linfóides, as Placas de Peyer eram pequenas e pouco numerosas, e era reduzida a concentração das imunoglobulinas circulantes. Após a colonização destes animais por microorganismos, os linfócitos intra-epiteliais expandiram-se, os centros germinativos com células produtoras de imunoglobulinas rapidamente proliferaram nas Placas de Peyer e na lâmina própria, e a concentração de imunoglobulinas circulantes aumentou (FALK, 1998). O desenvolvimento do sistema imune local e sistêmico com o estímulo da microflora matura o sistema imunológico, e impede a estruturação de resposta alérgica (KALLIOMAKI, ISOLAURI, 2003)

Os animais convencionais são os que possuem uma microbiota indefinida por serem criados em ambientes desprovidos de barreiras sanitárias rígidas. Entretanto, ao introduzir animais em um novo ambiente, sempre é prudente fazer uma quarentena, por evitar a introdução de doenças não existentes no rebanho em questão. Estes são utilizados na maioria das pesquisas, pois apresentam menor preço e maior facilidade de aquisição e manutenção (COUTO, 2002).

2.2 Antimicrobianos como promotores de crescimento em suínos

Há relatos desde 1940 sobre o melhor desempenho das aves alimentadas com sobras oriundas da fermentação de tetraciclinas cuja intenção era suplementar com resíduos de vitamina B12, quando se verificou que o melhor desempenho era efeito da tetracilicina, e não era da vitamina como se pensava (STOKESTAD AND JUKES, 1949 e 1950) citados por Sweden, Ministry of Agriculture (SOU) 1997.

As evidências da atuação de antibióticos em baixas dosagens como promotores de crescimento foram se sucedendo, de tal forma que em 1951, a instituição “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou o uso de produtos na alimentação animal sem prescrição veterinária (JONES, RICKE, 2003). Os termos

aditivo ou promotor de crescimento são também associados, algumas vezes, na mídia com a conotação de serem prejudiciais à saúde humana (BELLAYER, 2005). A definição pelo Codex Alimentarius para os antimicrobianos utilizados como aditivos alimentares nas rações animais é de melhoradores de desempenho. A falta de clareza das categorias de microingredientes pode ser minimizada com a proposta classificatória feita por Adams (1999), que classifica os alimentos em nutrientes e nutracêuticos.

Os antimicrobianos agem na microbiota do trato gastrointestinal como bactericidas ou bacteriostáticos causando efeitos interativos com a fisiologia do animal, segundo Muramatsu et al. (1994). Atuam isoladamente ou associados aos quimioterápicos ao promover o crescimento e ou a eficiência alimentar, por prevenir e controlar algumas doenças. Relatos de Mentem (1995), os mesmos são capazes de induzir alterações da população bacteriana específica, ao selecionar microrganismos adaptados ao ambiente luminal modificado. Os mecanismos propostos seriam: efeito no controle de doenças subclínicas, na economia de nutrientes, proteção contra a produção de toxinas no TGI e efeito metabólico. Mesmo sem existir conclusões precisas sobre a ação dos antimicrobianos, pressupõe-se que estes mecanismos sejam associados para promover a melhora do desempenho dos animais. O controle de doenças permite que os animais expressem ao máximo o seu potencial genético para crescimento e deposição de carne. A resposta e a dosagem do antimicrobiano específico variam conforme a idade do animal, a prevalência das doenças dentro do rebanho e o tipo de aditivos e desafios ambientais em que se encontra o rebanho (BELLAYER, 2005),

O Instituto de Defesa do Consumidor (IDEC) atua de maneira decisiva no Brasil com relação aos alimentos oferecidos ao consumidor, como ilustrou o episódio referente à proibição da utilização de alguns antibióticos em rações animais. Desde 2001, o IDEC solicitava a proibição de seis drogas (carbadox, olaquinox, bacitracina de zinco, espiramicina, virginiamicina e fosfato de tilosina) usadas em rações de suínos e aves que, por serem inseguras, já haviam sido proibidas pela União Européia e Canadá. Somente em 2003, quando o IDEC encaminhou representação à Procuradoria Geral da República, o Ministério da Agricultura, órgão incumbido do registro e autorização dessas substâncias, constituiu um grupo de trabalho com especialistas para avaliá-las. Como resultado, em 2004, foi proibida a utilização de

olaquinox e, em 2005, de carbadox, substâncias antes presentes nas rações animais, porém com efeitos cancerígenos.

2.3 Substâncias prebióticas, fontes e modo de ação

Os prebióticos agem na forma de alimento para os microrganismos com características probióticas, que segundo Fuller (1989), são as bactérias e ou leveduras vivas da própria microbiota intestinal ou mesmo suplementadas, que melhoram o equilíbrio da microbiota intestinal. O termo prebiótico foi empregado por Gibson (1998) para designar ingredientes nutricionais não digeríveis que contribuem beneficamente com o hospedeiro. Agem estimulando seletivamente o crescimento e a atividade do metabolismo de uma ou mais bactérias benéficas do cólon.

De acordo com Gibson (1998), as substâncias classificadas como prebióticos não podem ser hidrolisadas ou absorvidas nas porções iniciais do TGI, fermentam seletivamente um limitado número de bactérias benéficas no cólon, induzindo efeitos sistêmicos benéficos à saúde. Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois derivados de açúcares e oligossacarídeos estão dentro da classificação de prebióticos.

Destes, os oligossacarídeos de cadeias curtas de polissacarídeos compostos de três a dez açúcares simples ligados entre si têm recebido particular atenção pelas inúmeras propriedades prebióticas Silva, (2000).

Gozzolino et al. (2005) relata que oligossacarídios são carboidratos com grau de polimerização de 3 a 10, embora a IUPAC (IUB-IUPAC) de 1982 considere oligossacarídios todos os carboidratos que contém de 2 a 19 unidades de monossacarídios, existe um consenso geral dos pesquisadores e agências regulamentadoras que consideram como oligossacarídios carboidratos com grau de polimerização superior a 10.

Segundo Fernandes et al. (2000), as substâncias prebióticas mais conhecidas são: frutoligossacarídeos (FOS), os “neosugars” (derivados enzimáticos de FOS), inulinas (FOS com alto grau de polimerização), lactulose, lactitol, mananoligossacarídeos (MOS) e transgalactosídeos (TOS).

Hidaka et al. (1986), relata que a ingestão de “neosugars” por leitões aumenta a população de *Enterococcus* e *Lactobacillus*, diminui a de *Clostridium*, reduz diarreias, aumenta o ganho de peso e melhora a conversão alimentar.

Os oligossacarídeos demonstram excelentes efeitos prebióticos, ao alimentar seletivamente algumas espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, desta maneira, reduz a quantidade de outras bactérias como bacteróides, coliformes, e *Clostridium*.

As substâncias prebióticas agem por alimentar e estimular o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos atuam ao reduzir o pH, pelo aumento de ácidos orgânicos. Atuam no bloqueio dos sítios de aderência principalmente a D-Manose, com isso reduz a fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal, evita a sua adesão ao intestino e também retira os patógenos já aderidos recentemente à mucosa, por eliminar ou evitar a colonização (NEWMAN, 1994).

A ingestão de carboidratos não digeríveis aumentou as bifidobactérias residentes no cólon, cuja microbiota é estável, isto demonstra que os FOS foram efetivos no crescimento da microbiota desejável (YAZAWA, TAMURA, 1982). O consumo de FOS resultou em supressão de substâncias putrefeitas e na diminuição da incidência de constipação intestinal; as bifidobactérias intestinais são de difícil reposição por via exógena, e são bastante sensíveis aos antibióticos, que desequilibram facilmente a microbiota (FERNANDES et al., 2000). Qualquer alimento ou ingrediente de ração que chega até o intestino grosso é em potencial um prebiótico, porém deve ser fermentado por microrganismos benéficos para que seja efetivamente considerado como um prebiótico de fato (LAN et al., 2005).

Relato de Spring (2000) afirmou que os MOS atuam pela adsorção e remoção de patógenos do trato intestinal e modulação do sistema imunológico. A habilidade dos prebióticos de aumentar a resistência aos desafios pelos patógenos já foi bastante estudada em humanos e animais. Um estudo em camundongos demonstrou que a suplementação de FOS e de inulina na dieta conferiu proteção contra patógenos sistêmicos e indutores tumorais (BUDDINGTON; DANOHO; BUDDINGTON, 2002), inclusive verotoxina de *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter*. Da mesma forma, observou que a alta concentração de oligossacarídeos da parede celular vegetal em dietas à base de trigo fornecidas a

perus alterou a microbiota intestinal de perus jovens, melhorou o estado de saúde e reduziu a população de *Salmonella spp.* no ceco (SANTOS et al., 2005).

As bactérias produtoras de ácido láctico podem estimular a imunidade pela produção de vitaminas e aumento da capacidade das células das vilosidades de absorverem lactose, sacarose e maltose, não deixa esses açúcares disponíveis para o crescimento de patógenos (VANBELLE; TELLER; FOCANT, 1990). O principal efeito dos prebióticos de fermentação seletiva é o aumento no número de bactérias produtoras de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no ceco, ao reduzir o pH do TGI. De fato, os prebióticos fermentativos produzem o efeito antimicrobiano indireto dos ácidos orgânicos em organismos gram-negativos susceptíveis. Embora o ceco seja a principal área de fermentação da microbiota intestinal, a fermentação microbiana no jejuno exerce maior influência na digestão e na absorção de nutrientes.

A mensuração de AGCC e do pH da digesta no jejuno possibilita avaliar a influência dos aditivos de ração na fermentação microbiana (FERKET, SANTOS JÚNIOR, 2005).

2.3.1 Mananoligossacarídeos (MOS)

Os MOS são carboidratos complexos, derivados da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, contendo D-manose, glicose e proteína. Após a fermentação da levedura por processo industrial, sua parede celular é separada da porção intracelular e submetida a tratamento enzimático para obtenção do MOS, segundo Spring (2000). O Bio-Mos[®] é originado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ (ALLTECH, 2005).

Os MOS fosforilados são derivados da superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026 e atuam como ligantes de alta afinidade, pois proporciona um sítio de adsorção competitiva para determinada classe de bactérias (OFECK et al., 1977). Patógenos gram-negativos com fímbrias tipo-1 específicas para manose aderem-se aos MOS e não às células epiteliais, e são eliminados, preveni a colonização responsável por doenças, porém permiti que sejam apresentados às células imunológicas como agentes atenuados, antes de serem eliminados do intestino (FERKET, SANTOS JUNIOR, 2005). A presença de MOS adicionado à

ração no TGI remove parcialmente as bactérias patogênicas que poderiam aderir à mucosa intestinal (NEWMAN, 1994). Segundo Duval-Iflah, (2001), devido à capacidade de interferir na adsorção de bactérias patogênicas no intestino, o MOS também inibe a adsorção entre bactérias necessárias à transferência de plasmídeos pela conjugação. Este tipo de inibição no TGI de camundongos colonizados com microbiota humana foi descrito com a utilização de lactose.

Foi demonstrado por Lou (1995) que a suplementação de MOS à dieta diminuiu a proporção de grupos específicos de bactérias gram-negativas resistentes aos antibióticos nas fezes de suínos. Ferket (2002) observou que a suplementação de Bio-Mos® na dieta e o uso de antibióticos reduziram o teor de AGCC totais da digesta no jejuno de perus em aproximadamente 40%. Grande parte deste efeito foi atribuída à redução do ácido propiônico, o produto mais importante da fermentação da microbiota, que utiliza amidos e açúcares como principal substrato. O Bio-Mos® aumentou a disponibilidade de energia da dieta ao diminuir a competição da microbiota com o hospedeiro pelo substrato; de fato, a energia metabolizável da dieta aumentou em cerca de 3% após a suplementação de Bio-Mos® ou de virginiamicina à dieta. Swanson (2002) observou que os prebióticos interferem na função imunológica de humanos e cães ao estimular as bactérias produtoras de ácido láctico.

Os prebióticos possuem muitas vantagens em relação aos probióticos, que requerem a preservação da viabilidade da cultura. Muitas bactérias comensais importantes presentes no intestino saudável não podem ser cultivadas ou replicadas em laboratórios, o que dificulta a sua utilização em produtos comerciais. Entretanto, já foi demonstrado em estudos com suínos (KONSTANTINOV et al., 2003) e humanos (RASTALL et al., 2005) que a suplementação de prebióticos na dieta estimula a produção dessas bactérias que não podem ser cultivadas. Além disso, há a vantagem de serem mais estáveis ao calor e à pressão durante o processamento da ração.

2.4 Resposta humoral – produção de IgA e IgG sérica total

No passado, a maioria das pesquisas que correlacionavam à produção animal com imunidade era focada na potencialização da resposta imunológica. Entretanto, a partir da década de 80, novos conhecimentos a respeito do sistema imunológico e suas inter-relações permitiram melhor entendimento da atuação sistêmica destes

componentes. Na última década, novos estudos apresentaram como objetivo a compreensão da inter-relação entre desempenho zootécnico, exigências nutricionais dos animais com o sistema imunológico (JOHNSON, 1997; SHURSON, JOHNSTON, 1998).

As Placas de Peyer contém todos os componentes necessários para iniciar uma reação imunológica: células T, células B e células dendríticas. As células B são precursoras das células do plasma, que produzem anticorpos, as imunoglobulinas e funcionam, ainda, como células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas. Os antígenos são recolhidos por essas células, processados e levados às células T. Reações mediadas pelas células T são mais eficazes contra patógenos intracelulares, enquanto reações mediadas por células B são mais eficazes contra patógenos extracelulares (TIZARD, 2000).

Os animais livres de bactérias apresentam o ceco dilatado, o tecido linfático hipodesenvolvido e níveis reduzidos de imunoglobulinas no soro. A parede intestinal destes animais é mais fina e não se observa a presença do infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria, que é normalmente observado nos animais convencionais. As respostas imunológicas na mucosa intestinal são diferentes daquelas que ocorrem sistematicamente. A IgA secretada na mucosa entérica é o principal anticorpo (AC) do intestino, com a capacidade de impedir a aderência de microrganismos à superfície dos enterócitos. Esta IgA secretora se diferencia da IgA sérica por se apresentar na configuração de dímeros, formados pela peça secretora para conferir resistência contra a proteólise na luz intestinal (MORAIS, NETO, 2003).

De acordo com Vanderhoof (2004), o potencial benefício de se modificar a composição de uma microbiota anormal pode ser uma nova forma de abordar tratar e prevenir os processos inflamatórios no período neonatal e na infância. Segundo Oba, Cukier, Magnoni (2005), recomendam fornecer suplementação com probióticos ou prebióticos, pois a integridade do TGI é o resultado do delicado equilíbrio entre as citocinas inflamatórias, as interleucinas 1, 6 e 8 e o fator de necrose tumoral e as antiinflamatórias, interleucina 1RA, 4 e 10.

A defesa imunológica intestinal depende da coordenação entre enterócitos e células do sistema imunológico, os linfócitos B e T, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, que povoam a lâmina própria da mucosa. Os enterócitos têm a

capacidade de sintetizar várias citocinas e quimocinas (CARVALHO, COLLARES-BUZATO, 2005).

O intestino é o maior sistema imunológico do organismo. O sucesso do desenvolvimento do sistema imunológico da mucosa intestinal requer estímulos constantes das bactérias intestinais. Da mesma forma que o sistema imunológico intestinal estimula as defesas contra as infecções, ele induz a tolerância aos alimentos e às bactérias encontradas na luz intestinal. Os mecanismos moleculares da indução da tolerância oral são pouco conhecidos; sabe-se que ela pode ser modificada pelas características genéticas do hospedeiro, do meio ambiente, pela utilização de antibióticos e dos antígenos administrados (OBA, CUKIER, MAGNONI, 2005).

A importância do “gut associated lymphoid tissue” GALT, a nível intestinal, reside no fato dos intestinos constituírem a via mais importante de entrada de antígenos no corpo. No grupo desses antígenos podemos incluir proteínas alimentares, bactérias e outros organismos e proteínas estranhas (SMEETERS PEETERS, et al., 1988).

Uma ampla variedade de células, mediadores químicos, especialmente citocinas e quimiocinas, outros componentes como sistema complemento e imunoglobulinas estão envolvidos na resposta imunológica. Dentre os tipos celulares, os linfócitos, células apresentadoras de antígenos “antigen presenting cells” ou (APCs), destacam-se por desempenharem funções primordiais nesse tipo de resposta. Entre as APCs estão os macrófagos, que são células caracterizadas por sua alta capacidade de fagocitar e apresentar fragmentos do antígeno internalizado e processado. As células M também participam da apresentação de antígeno, por capturá-los na superfície de mucosa e carregá-los às células apresentadoras de antígeno das placas de Peyer. Os linfócitos são subdivididos basicamente em linfócitos T e B, os quais apresentam funções distintas. As células T (linfócitos T “helper”) são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno apresentado pela APCs e por estimular células linfóides, via mediadores químicos. Outro subtipo de célula T (linfócito T citotóxico) tem como papel o ataque direto a células infectadas ou neoplásicas. Os linfócitos B desempenham como principal função a diferenciação em plasmócitos, e, por conseguinte, a síntese de imunoglobulinas. As imunoglobulinas

são os principais componentes solúveis de inter-relações com antígenos do sistema imune.

Mesmo com este vasto arsenal e uma complexa rede de interações com outros tipos celulares, o sistema imunológico apresenta também o propósito primordial de manutenção da homeostase, ou seja, o retorno aos parâmetros fisiológico anteriores à ativação antigênica, visto que as condições de hiper ou hiporresponsividade imunológica são deletérias para o organismo. Em determinadas circunstâncias, o sistema imunológico dos animais não está completamente ativo ou desenvolvido, além de, muitas vezes, estes indivíduos apresentarem como agravantes situações de estresse, devido ao desmame, mudança de dieta, formação de novos lotes (KLASING, AUSTIC, 1984; VAN HEUTGEN et al., 1994; DRITZ et al., 1996; MORES et al., 1998; SAUBER et al., 1999), entre outros. O sistema imunológico dos animais pode responder a algum estímulo externo, como em vacinações ou em respostas às infecções. A manutenção das condições de homeostasia é de fundamental importância, tanto do ponto de vista sanitário como produtivo.

Nos recém-nascidos, a imunidade é o resultado da exposição intestinal a uma grande variedade de antígenos, inclusive microrganismos patogênicos e proteínas dietéticas, o que é importante no desenvolvimento da defesa dos animais jovens contra diarreias (PORTER, BARRAT, 1987, NEWBY et al. 1984, apud SISSONS, 1989). A boa resposta imunológica é uma forma mais eficiente de resistir às doenças do que uma resposta inflamatória ativa (HUMPHREY; KOUTSOS; KLASSING, 2000).

Muitos microrganismos realizam múltiplas funções e seus efeitos na modulação imunológica específica, não específica e na barreira intestinal, contribuem para a saúde desde os primeiros anos de vida até a velhice (SALMINEN, 2002).

O estabelecimento da colonização normal no período neonatal tem importância crucial no desenvolvimento do tecido linfóide intestinal, no sistema imunológico e na função de barreira do intestino. Por sua vez, o bom desenvolvimento do sistema imunológico terá conseqüências nos processos alérgicos, infecciosos agudos e crônicos (YAMASHIRO et al., 2004). A colonização do recém-nascido interage com o desenvolvimento do sistema imunológico que por sua vez, aprende a reconhecer que essas bactérias são hospedeiros desejáveis do TGI e dessa forma, contribui para a saúde geral (VANDERHOOF, YOUNG, 2004; SAKATA et al., 2005).

Segundo Ferreira (2005), a necessidade de suplementação de nutrientes na atuação do sistema imunológico ainda não foi bem elucidada; por esta razão, os nutricionistas formulam dietas para atender as necessidades do máximo potencial de crescimento, de manutenção, nos diferentes estágios fisiológicos e de produção, além de disponibilizar um ótimo nível de nutrientes para a adequada ativação e responsividade do sistema imunológico. Os ajustes metabólicos resultantes da ativação do sistema imunológico redistribuem os nutrientes ingeridos para outras vias, fora do processo de crescimento (STAHLY, 1994).

As bactérias produtoras de ácido láctico aumentam a atividade de macrófagos e linfócitos (SISSONS, 1989). Manning, Gibson (2004) relataram que o aumento no número de bactérias produtoras de ácido láctico estimulou a atividade fagocítica, ou seja, resposta imunológica celular e ou a secreção de IgA, resposta imunológica humoral, e pode afetar a colonização de patógenos, como *Salmonella* e rotavírus.

Espera-se que MOS provoque um aumento na resposta dos anticorpos devido à capacidade do sistema imunológico de reagir ao material antigênico estranho de origem microbiana. Parte da estrutura da parede celular da levedura presente no MOS fosforilado consegue gerar propriedades antigênicas potentes (BALLOU, 1970). À medida que o MOS estimula a secreção de IgA no lúmen intestinal, os agentes patogênicos tornam-se mais lábeis à ação fagocítica dos linfócitos da lâmina própria do intestino. Todos os animais criados em granjas convencionais estão sujeitos ao estresse imunológico, que depende do desafio promovido pela carga de patógenos no ambiente e pelo programa de vacinação adotado (FERKET, SANTOS JÚNIOR, 2005).

A placenta do tipo epiteliocorial, encontrada nos suínos, impede a transferência de imunoglobulinas maternas para o feto em desenvolvimento. Assim, leitões ao nascer são praticamente agamaglobulinêmicos, dependem inteiramente do colostro para aquisição das imunoglobulinas que irão conferir a proteção inicial, necessária para sua sobrevivência (BRAMBELL, 1958). Para a maior parte dos animais domésticos, incluindo os suínos, a imunoglobulina G, que se apresenta com concentração máxima no colostro por ocasião do parto, constitui a mais importante classe de anticorpos.

As imunoglobulinas da classe G (IgG) exercem inúmeras funções biológicas importantes por interagirem com vários tipos celulares. A base desta interação é a

ligação dos domínios Fc (fragmento cristalizável) da IgG com receptores específicos (Fc γ R: Fc “gamma receptors”) presentes nas membranas de células do sistema imunológico, que são importantes mediadores da ligação entre as respostas imunes humoral e celular. Estimula uma variedade de respostas biológicas, dependendo do tipo celular, do tipo de receptor Fc γ e da natureza do complexo de IgG. Estas respostas incluem processos diretamente relacionados com a eliminação de antígenos como a fagocitose, ativação do complemento, citotoxicidade celular dependente do anticorpo, geração de espécies reativas de oxigênio, liberação de enzimas lisossomais, “clearance” de imunocomplexos e regulação da produção de anticorpos (DAËRON, 1997).

2.5 Morfologia da mucosa intestinal de leitões

Os leitões desmamados na terceira semana de vida têm o sistema digestivo agredido pelos nutrientes da dieta sólida, as quais promovem alterações na função e modificações na mucosa intestinal (SOTO, 1999), além de que alguns nutrientes protéicos atuam como antígenos à mucosa intestinal. De acordo com Smink (2003), a grande preocupação dos nutricionistas é formular rações complexas que não agriam a integridade das vilosidades intestinais e também não causem diarreias devido à baixa digestibilidade, pois o sistema digestivo ainda é imaturo. O período pós-desmame é a fase mais crítica ao leitão, pois são vários os fatores desafiadores a esta nova fase, que variam quanto à incidência, duração, e severidade, “status” sanitário e o limiar da barreira de entrada de novas doenças em cada granja (STOKES et al., 2001).

A função mais importante dos enterócitos é absorver as moléculas dos nutrientes produzidos durante a digestão. Ocorrem prejuízos da absorção em doenças marcadas pela atrofia das mucosas intestinais, causadas por infecções ou deficiências nutricionais, gerando a síndrome da má absorção (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004). Como o sistema digestivo dos suínos se assemelha com o dos seres humanos, estas considerações também são válidas aos suínos. A presença de pregas da mucosa, vilosidades e microvilosidades aumentam em muito a superfície de revestimento intestinal, característica importante num órgão onde a absorção

ocorre tão intensamente. Calcula-se que as pregas aumentem a superfície intestinal em cerca de três vezes, as vilosidades em cerca de 10 vezes e as microvilosidades em cerca de 20 vezes. Em conjunto, estas estruturas são responsáveis por um aumento de aproximadamente 600 vezes na mucosa intestinal, isto resulta numa área aproximada de 200 m² em toda extensão em humanos.

No duodeno, a submucosa apresenta as chamadas glândulas duodenais ou de Brünner. Na base das vilosidades intestinais, encontram-se as glândulas intestinais ou de Lieberkühn, nas quais se localizam as células de Paneth, produtoras de lisozima, células enteroendócrinas, produtoras de hormônios polipeptídicos, bem como as células M (Atlas digital de Histologia).

As células caliciformes estão distribuídas entre as células absortivas. Elas são menos abundantes no duodeno e aumentam em número em direção ao íleo. Produzem glicoproteínas ácidas do tipo mucina, que são hidratadas e formam ligações cruzadas entre si para originar o muco, cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento intestinal (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004). A presença de células caliciformes é uma característica distintiva das superfícies das mucosas nas regiões úmidas que se comunicam com o meio exterior, por apresentar uma camada de muco sobre o tecido epitelial. A atividade secretora exibe duas vias de secreção: a secreção constitutiva, que ocorre em taxa basal constante ao longo do ciclo de vida e não depende de regulação, a exocitose de uma vesícula secretora por vez é dependente dos movimentos do citoesqueleto; a outra via corresponde à secreção estimulada ou seletiva, a qual é desencadeada em resposta aos estímulos externos e não depende diretamente do citoesqueleto (CARVALHO, COLLARES-BUZATO, 2005). O muco é uma secreção espessa, composta, principalmente por água, eletrólitos e a mistura de várias glicoproteínas, que consistem em grandes polissacarídeos ligados a quantidades menores de proteínas. Tem propriedades aderentes, ao alimento ou a outras partículas, permitindo também que se espalhe na forma de fina película sobre as superfícies das mucosas. Sua consistência é suficiente para recobrir a parede intestinal e impedir o contato das partículas alimentares com a mucosa. Tem baixa resistência ao deslizamento. Promove a aderência das partículas fecais, as quais formam o bolo fecal. O muco é muito resistente à digestão pelas enzimas gastrintestinais, tem capacidade de tamponar pequenas quantidades de ácido ou de álcalis (GUYTON, 2002).

Na mucosa intestinal, além das células absortivas, enteroendócrinas e caliciformes, são encontradas também as células de Paneth. São células exócrinas, contêm grandes grânulos de secreções no seu interior, cujo conteúdo é rico em lisozimas, devido a sua atividade antimicrobiana, atacando bactérias causadoras de doenças à medida que elas aparecem, podem desempenhar um papel fundamental no controle da microbiota intestinal, no mecanismo de inflamações e outras disfunções gastrointestinais. Nunca foi entendido claramente como o sistema imunológico inato protege de infecções no intestino, exposto constantemente a bactérias, fungos, protozoários e vírus; esse órgão está sempre em alerta para eliminar os agentes infecciosos imediatamente quando atacam, sem precisar produzir anticorpos específicos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004). A renovação de todo epitélio intestinal é substituído a cada quatro ou seis dias por novas células criadas pelas criptas. As células de Paneth se alojam nas criptas e agem como sentinelas que protegem essa renovação celular contra infecções, secretando rapidamente peptídeo defensina, eficaz na eliminação de bactérias, não reagindo às infecções provocadas por fungos ou protozoários. Segundo Ouellette (2000), a função dessas células pode esclarecer como o intestino libera a passagem de moléculas de alimentos pelas paredes intestinais para o organismo sem permitir a passagem de bactérias potencialmente patogênicas no intestino.

Em relatos de Junqueira, Carneiro (2004), as células absortivas são colunares altas, no ápice de cada existe uma camada homogênea denominada borda em escova. Quando observada ao microscópio eletrônico, a borda em escova é vista como uma camada de microvilosidades densamente agrupadas, e cada microvilosidade é uma protusão cilíndrica do citoplasma apical, com aproximadamente 1 μm em altura por 0,1 μm de diâmetro, consiste em uma membrana celular que envolve um eixo de microfilamentos de actina associadas a outras proteínas do citoesqueleto. Estima-se que cada célula absortiva possui, em média, 3000 microvilosidades e que 1 mm^2 de mucosa contenha cerca de 200 milhões destas estruturas.

A replicação dos enterócitos ocorre nas criptas, as quais apresentam grande capacidade mitótica. À medida que as células das criptas intestinais se multiplicam, migram para a base da vilosidade, com isto empurram as outras para o ápice da vilosidade. No percurso da migração, as células amadurecem, vão se transformando

da condição de células indiferenciadas ou jovens ainda na cripta para células absorptivas, caliciformes ou enteroendócrinas. A descamação ou renovação das células das vilosidades ocorre devido a vários fatores, idade, atrito do fluxo diário do quimo, tipo da dieta, estado de saúde do intestino, dentre muitos outros (RIBEIRO, 1996).

A associação da menor altura das vilosidades e da maior profundidade das criptas, observada no período pós-desmame, com a redução na atividade das enzimas intestinais, ligadas aos enterócitos na região do “brush border”, foi amplamente estudada por HAMPSON (1986), HAMPSON, KIDDER (1986) e PLUSKE et al. (1996), porém, provavelmente influenciado por fatores adversos, esta relação nem sempre tem obedecido à hipótese da associação citada.

As pesquisas realizadas têm procurado associar a redução na altura das vilosidades e incremento na profundidade das criptas. Após o desmame, com a redução na atividade específica das enzimas presentes na borda em escova dos enterócitos, nos dias seguintes ao desmame, acreditava-se que um aumento na taxa de proliferação celular nas criptas e na migração dos enterócitos às vilosidades, aumentaria o número de enterócitos imaturos com pouca atividade digestiva e absorptiva (Smith, 1984; Hampson, 1986; Hampson, Kidder, 1986; Pluske et al., 1996). No entanto, a grande variabilidade nos experimentos nem sempre tem resultado em diferenças significativas nas atividades das enzimas.

Segundo Miller et al. (1984), a redução do comprimento das vilosidades intestinais reduz a produção e a atividade de algumas enzimas como a isomaltase, sacarase e lactase da borda em escova dos enterócitos. Tal fato pode ser explicado devido à alta taxa de reposição celular pelas criptas, na tentativa de repor as células perdidas pelas vilosidades, permite que enterócitos imaturos cheguem ao ápice dos vilos, sem expressar ação enzimática (HAMPSON, KIDDER, 1986). A redução do comprimento das vilosidades é menos acentuada no final do intestino delgado, mas devido à ausência de alimento no lúmen nas primeiras horas pós-desmame pode ser a causa da baixa ação das peptidases (HEDEMANN; HOJSGAARD; JENSEN, 2003).

2.6 Imunoistoquímica de células IgA positivas

As células IgA positivas deslocam do intestino por meio da corrente sanguínea, migrando para os locais efetores, como os linfonodos mesentéricos. Nos suínos, 90% das células que contém imunoglobulina na lâmina própria, produzem IgA (TIZARD, 1998).

A imunoglobulina (IgA) é a principal imunoglobulina na mucosa intestinal Mestecky; McGhee (1987) . Os AC poliméricos IgA são produzidos pelos plasmócitos na lâmina própria do trato intestinal (TI), os quais se ligam aos receptores poliméricos de imunoglobulina (pIR) na base do epitélio.

O complexo de IgA e pIR sofrem endocitose e transporte vesicular até a superfície apical dos enterócitos, os quais são secretados no lúmen intestinal. Os plasmócitos são derivados das células B, e produz IgA pela mudança da produção de IgM , pela atividade de citocinas do perfil Th2 na placa de Peyer e linfonodos mesentéricos. Estas células ao produzir IgA , em seguida migram para a lâmina própria intestinal (HUSBAND et al., 1999; MC INTYRE, STROBER, 1999).

A maioria das células produtoras de IgA do intestino delgado pertencem ao recente classificado B células da linhagem B1. As Células B1 estão amplamente distribuídas na cavidade abdominal e migram para a lâmina própria do TI.

As células produtoras de IgA migram para a base das membranas basais, pelas quimiocinas expressas na células epiteliais (KUNKEL et al, 2000; KUNKEL et al, 2003). As quais aumentam a produção e secreção de IgA.

Os neurotransmissores, denominados substância P (SP), aumentam a produção de IgA no trato intestinal, enquanto que o polipeptídeo vasoativo “VIP” e a somatostatina diminui a produção IgA. (PASUCAL et al., 1994; STANISZ, BEFUS, BIENENSTOCK, 1986)

A evidência morfológica de mastócitos e plasmócitos, cujas células estão próximas das fibras nervosas na lâmina própria, sustenta a hipótese que o sistema nervoso regula a produção de mediadores imunes (CRIVELLATO et al., 1998; GOTTWALD, LHOTAK, STEAD, 1997).

Como muitos agentes invadem o organismo pela superfície de mucosas é desejável induzir a produção de anticorpos protetores nestas superfícies (OUWEHAND et al.,1999). As placas de Peyer presentes no tecido linfóide associado

ao intestino ou GALT são conhecidas por regular a produção de IgA secretora (YUN, LILLEHOJ,H., LILLEHOJ,E., 2000). Desta forma, a utilização de agentes capazes de estimular a resposta local, como adjuvantes orais, seria uma das alternativas para a prevenção de colonização de microrganismos patogênicos.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Local e instalações

O experimento foi realizado na Granja Piracaíba no município de Araguari, MG, que possui sistema de criação de suínos em ciclo completo, com 450 matrizes, de “status” sanitário convencional. O setor de creche, local do alojamento dos leitões do experimento, era composto de vinte baias suspensas de 3 m² (1 x 3), separadas por grades metálicas. Cada baia possuía bebedouro tipo chupeta instalada em ângulo de 45º, com altura regulável. O comedouro era do tipo semi-automático, com cinco bocas por baia. O piso na área do comedouro era compacto (1/3) e os 2/3 restantes eram constituídos de ripado metálico. A temperatura ambiente era controlada com manejo das portas e campânulas elétricas.

3.2 Animais

Foram utilizados 100 leitões machos castrados, da mesma composição genética, peso médio inicial de 5,80 kg, aos 21 dias de idade, quando foram desmamados, transferidos para o setor de creche e alojados em grupos de cinco leitões por baia. Finalizado o experimento, o peso médio foi de 24,09 kg aos 63 dias de idade (42 dias de experimento).

3.3 Tratamentos e Rações Experimentais

Os promotores de crescimento foram adicionados às rações pré-inicial, inicial 1 e 2 dos leitões, que foram fornecidas na fase pós-desmama, desde o dia zero (dia do desmame ou 21 dias de idade) até a saída da creche (42 dias pós-desmame ou 63 dias de idade), de acordo com os diferentes tratamentos e protocolo de utilização do prebiótico Bio-Mos[®].

3.3.1 Tratamentos

Os quatro tratamentos utilizados foram:

T_1 = Ração basal com promotor de crescimento convencional (sulfato de colistina, 40 ppm);

T_2 = Ração basal sem nenhum promotor de crescimento;

T_3 = T_1 + prebiótico Bio-Mos[®] ;

T_4 = T_2 + prebiótico Bio-Mos[®] .

A dosagem do Bio-Mos[®] seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante ALLTECH, de acordo com as diferentes faixas de idade, conforme discriminado no quadro abaixo:

RAÇÃO	IDADE (dias)	DOSE Bio-Mos [®]	PERÍODO ¹
Ração pré-inicial	21 – 35	4 kg/t	P1: de 21 aos 35 dias de idade
Ração inicial 1	36 – 49	2 kg/t	P2: de 36 aos 49 dias de idade
Ração inicial 2	50 – 63	1 kg/t	P3: de 50 aos 63 dias de idade

Quadro 1. Protocolo de utilização do Bio-Mos[®]

¹ A somatória dos três períodos de fornecimento de ração, ou seja, dos 21 aos 63 dias de idade dos leitões, perfaz o período total (PT) do experimento de 42 dias de duração.

3.3.2 Rações Experimentais

As rações experimentais foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais mínimas dos animais, suínos machos castrados de alto potencial genético de médio desempenho, conforme a TAB. 1.

Tabela 1 - Níveis nutricionais das rações experimentais utilizadas de 21 aos 63 dias de idade nos diferentes períodos.

Níveis Nutricionais ¹	Pré-Inicial	Inicial 1	Inicial 2
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.240,00	3.382,00	3.250,00
Proteína bruta (%)	20,00	20,42	18,00
Cálcio (%)	0,80	0,81	0,70
Fósforo disponível (%)	0,40	0,40	0,32
Lisina (%)	1,33	1,15	0,95

¹ Os níveis nutricionais calculados para os três tipos de ração foram iguais ou superiores aos preconizados por ROSTAGNO et al. (2005).

As formulações das rações utilizadas em cada período (P1, P2 e P3) estão detalhadas nas TAB. 2, 3 e 4. Foi utilizado o misturador de ração vertical com capacidade para 1.000 kg, da marca Nogueira modelo N1000.

Tabela 2 - Composição percentual e preços da ração pré-inicial fornecida no P1, nos diferentes tratamentos.

INGREDIENTES (kg)	TRATAMENTOS			
	T1	T2	T3	T4
Milho	35,55	35,60	35,15	35,20
Farelo de soja	19,40	19,40	19,40	19,40
Bolacha moída	5,00	5,00	5,00	5,00
Núcleo ¹	40,00	40,00	40,00	40,00
Bio-Mos ^{® 2}	-	-	0,40	0,40
Colistina ³	0,05	-	0,05	-
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
R\$ / kg	2,306	2,291	2,345	2,330

¹ Composição do Núcleo Porcelo 400 (garantia/kg): Mn (134,7 mg); Zn (6571 mg); Fe (224,59 mg); Cu (359,46 mg); I (2,25mg); Se (0,68 mg); Vit A (15.435 UI); Vit D3 (2.835)UI; Vit E (69,39 mg); Vit K3 (4,55 mg); Vit B1(5,8 mg); Vit B2 (17,11 mg); Vit B6 (7,53 mg); Vit B12 (37,17 mcg); Ac. Fólico (1,62 mg); Ác. Pantotênico (40,21 mg); Niacina (77,23 mg); Biotina (322 mcg); Colina (1.665 mg); Metionina (6,57 g) ; Lisina (16,92 g); Antioxidante (373 mg); Na (5,85 g) - PB (Mínimo 15,30%); EE (Máximo 9,67%); FB (Máximo 1,18%); Umid. (Máximo; 12%); M Mineral (Máximo 12,57%); Cálcio (Máximo 1,92%); Fósforo (Mínimo 1,10%).

² Bio-Mos [®] : 30% de mananoligossacarídeo fosforilado; fornecedor: Alltech.

³ Colistin 8%; fornecedor: Uniquímica.

Tabela 3 - Composição percentual e preços da ração Inicial 1 fornecida no P2, nos diferentes tratamentos.

INGREDIENTES (kg)	T1	T2	T3	T4
Milho	43,85	43,90	43,65	43,70
Farelo de soja	25,80	25,80	25,80	25,80
Óleo de soja refinado	0,30	0,30	0,30	0,30
Bolacha moída	5,00	5,00	5,00	5,00
Núcleo ¹	25,00	25,00	25,00	25,00
Bio-Mos ^{® 2}	-	-	0,20	0,20
Colistina ³	0,05	-	0,05	-
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
R\$ / kg	1,436	1,421	1,475	1,460

¹ Composição do Núcleo Porcelo 250 (garantia/kg): Mn (215,53mg); Zn (7.722 mg); Fe (360mg); Cu (574 mg); I (3,6 mg); Se (1,08 mg); Vit A (21.600 UI); Vit D3 (4.500 UI); Vit E (94,93mg); Vit K3 (7,2 mg); Vit B1(5,94 mg); Vit B2 (21,24 mg); Vit B6 (8,88 mg); Vit B12 (56,16 mcg); Ac. Fólico (1,26 mg); Ác. Pantotênico (52,83 mg); Niacina (113,04mg); Biotina (377,83 mcg); Colina (1.575 mg); Metionina (6,75 g) ; Lisina (16,53 g); Antioxidante (400 mg); Na (9 g) - PB (Mínimo 13,50%); EE (Máximo 10, 70%); FB (Máximo 1,21%); Umid. (Máximo; 12%); M Mineral (Máximo 17,20%); Cálcio (Máximo 2,93%); Fósforo (Mínimo1,41%).

² Bio-Mos [®] : 30% de mananoligossacarídeo fosforilado; fornecedor: Alltech.

³ Colistin 8%; fornecedor: Uniquímica.

Tabela 4 - Composição percentual e preço da ração Inicial 2 fornecida no P3 nos diferentes tratamentos.

INGREDIENTES (kg)	TRATAMENTOS			
	T1	T2	T3	T4
Milho	51,65	51,70	51,55	51,60
Farelo de soja	34,00	34,00	34,00	34,00
Óleo de soja refinado	3,30	3,30	3,30	3,30
Açúcar	5,00	5,00	5,00	5,00
Núcleo ¹	6,00	6,00	6,00	6,00
Bio-Mos ^{®2}	-	-	0,10	0,10
Colistina ³	0,05	-	0,05	-
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
R\$ / kg	0,672	0,658	0,711	0,696

¹ Composição do Núcleo Porcelo 60 (garantia/kg): Mn (224,04 mg); Zn (16.392,90 mg); Fe (812,6 mg); Cu (2369 mg); I (4,5 mg); Se (4,5 mg); Vit A (90.306 UI); Vit D3 (18.765 UI); Vit E (377,64 mg); Vit k3 (28,8 mg); Vit B1(15,4 mg); Vit B2 L(63,17 mg); Vit B6 (30,51 mg); Vit B12 (225,2 mcg); Ac. Fólico (5,29 mg); Ác. Pantotênico (180,7 mg); Niacina (452,61 mg); Biotina (1060 mcg); Colina (2.700 mg); Metionina (23,5 g) ; Lisina (29,7 g); Antioxidante (167,19 mg); Na (33,5 g); Treonina (23,08 g); Ca (120 g); P (50,84 g); Aditivo acidificante (66,7 g); Fluor (Máximo: 508,4 mg); Sol. P em Ac Cítrico 2%; (90% Máximo)

² Bio-Mos [®] : 30% de mananoligossacarídeo fosforilado; fornecedor: Alltech

³ Colistin 8%; fornecedor: Uniquímica.

3.4 Ganho médio diário de peso (GMDP)

Para posterior determinação do ganho médio diário de peso (GMDP) e consumo de ração por tipo de ração e por tratamento, os animais, as rações consumidas e suas sobras foram pesados nos dias 0, 14, 28 e 42 pós-desmama.

Para a realização das pesagens foi utilizada uma balança mecânica Filizola, com subdivisões de 100 gramas, com carga máxima para 50 kg.

3.5 Histomorfometria Intestinal

3.5.1 Colheita de tecidos e fixação

Foram abatidos doze leitões com 63 dias de idade, sendo três por tratamento, seguindo as normas do abate humanitário. Imediatamente ao abate, abriu-se a cavidade abdominal e foram colhidos fragmentos dos intestinos delgado e grosso, sendo duodeno, jejuno, íleo e cólon respectivamente, além de linfonodos mesentéricos. Todos os fragmentos foram colhidos sob os mesmos critérios anatômicos, o duodeno distalmente a 10 cm do piloro, o jejuno distalmente 150 cm do piloro e o íleo a 15 cm após observação na mudança visual do tecido do órgão, que o caracteriza.

Os fragmentos anelares perfaziam cerca de 1 cm de comprimento e foram abertos no sentido longitudinal, lavados cuidadosamente com soro fisiológico procurando-se preservar ao máximo as vilosidades, com a superfície da mucosa voltada externamente; as extremidades do corte foram grampeadas em papel cartão grosso de cor branca, com grampos de alumínio para evitar o fechamento luminal do tecido. Foram colocados em solução aquosa a 10% de formol PA, tamponada com fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio com pH 7,4 para fixação, que paralisa o metabolismo celular e preserva as estruturas do tecido para os procedimentos posteriores. A fixação evita a autólise celular, impede a proliferação de microrganismos e leva ao endurecimento do tecido para resistir aos tratamentos posteriores. O fixador não deve causar danos ao tecido ou gerar artefatos na lâmina.

Cada fragmento, intestino e linfonodo, foi acondicionado em frasco individual. Após 24 horas, os fragmentos de tecidos foram transferidos para solução de álcool etílico PA (AE-PA) diluído a 70% em água destilada (Ad), cujo objetivo foi evitar o excesso de impregnação de formol, referentes às análises imunoistoquímicas.

3.5.2 Preparo dos fragmentos

Os tecidos foram desidratados em AE-PA, em uma seqüência de concentrações crescentes de 85 e 95 %, sempre diluídos em Ad, e três baterias AE-PA (100%), por 30 min em cada passagem.

Procedeu-se à clarificação em três passagens de xilol PA (Xi-PA) (100%) de 30 min por etapa. Posteriormente, o fragmento de tecido foi imerso em três cubas de parafina histológica fundida entre 56 ° a 58 °C, por 30 min por seção, Os fragmentos foram emblocados em recipientes metálicos à temperatura ambiente.

No micrótomo, cortes com a espessura aproximada de 5 µm foram obtidos, e, em seguida, transferidos para água a temperatura de 36° a 40°C, removeu-se as possíveis rugas da fita de parafina contendo o corte, com isso facilitou a aderência adequada na lâmina de vidro previamente albuminada.

3.5.3 Coloração de hematoxilina-eosina

As lâminas foram secas em estufa a 50° C por 2 horas, para melhorar a aderência do corte. Depois de retiradas e resfriadas à temperatura ambiente, foram submetidas a duas passagens em Xi-PA por 10 min e uma vez de Xi-PA por 3 min por seção, promovendo a desparafinação. Em seqüência, foram reidratadas em três etapas de AE-PA absoluto III, II e I, 10 s por vez e, em seguida, em AE-PA 95% , 85%, e 70% por 10 s em cada. Posteriormente, procedeu-se a lavagem em água corrente (A/cr) por 20 min, e Ad por 05 min. As lâminas foram, então, coradas com hematoxilina de Meyer por 15 min, lavadas em A/cr por 20 min removeu o excesso de corante, e depois em Ad por 05 min. Em seqüência, foram coradas com eosina por 12 s e lavadas em A/cr e Ad por 3 s. A desidratação das lâminas foi obtida em séries crescentes de AE-PA (70%, 85%, 95%) por 10 s, absoluto I, II, III por 10 s. Em seguida, em Xi-PA I, II, III por 01 minuto por etapa. As lâminas foram montadas com lamínula e o selante entellan[®].

3.5.4 Análise morfométrica da mucosa intestinal

Para a realização das análises morfométricas da mucosa do duodeno, jejuno, íleo e cólon, as imagens foram captadas em aumento de 40 vezes, utilizou-se o microscópio óptico Olympus BX 40 com câmera Olympus OLY 200, acoplada a um computador, pela placa digitalizadora Data Translation 3150. Estas mensurações foram obtidas pelo programa de análise de imagens HL Image 97 (Western Vision Softwares).

Foram mensuradas 10 vilosidades e 10 criptas por lâmina, processou três lâminas de cada segmento intestinal por animal e três animais por tratamento.

O número de vezes em que a superfície da mucosa intestinal é aumentada (M) foi calculado, seguindo o método proposto por Kisielinski et al. (2002):

$$M = \frac{(L \times V \times CV) + \left(\frac{LV}{2} + \frac{LC}{2}\right)^2 - \left(\frac{LV}{2}\right)^2}{\left(\frac{LV}{2} + \frac{LC}{2}\right)^2}$$

Onde:

M = Número de vezes em que a superfície da mucosa intestinal é aumentada;

LV = Largura média do vilo;

CV = Comprimento médio do vilo;

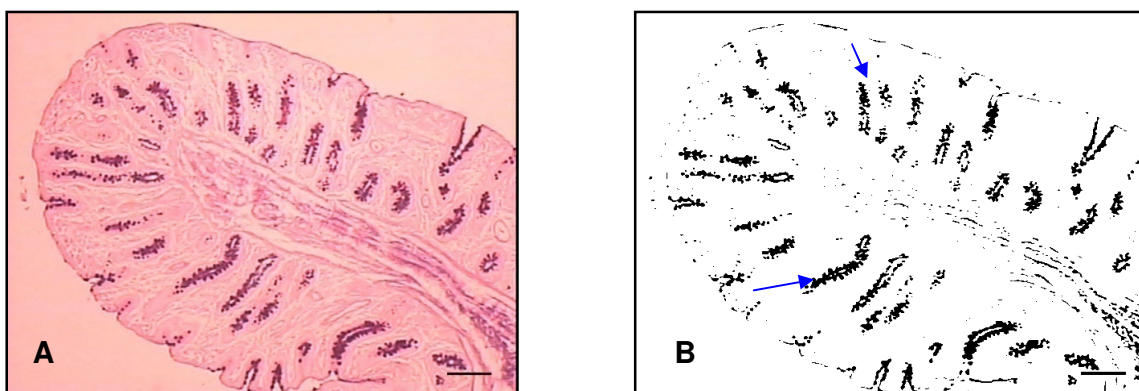
LC = Largura média da cripta.

3.5.5 Porcentagem de células caliciformes por área delimitada

Das lâminas montadas, algumas foram coradas por azul de alcian e com PAS (Periodic Acid Schiff), tingindo de azul escuro as áreas ricas em glicídios, representam as glicoproteínas que compõem o muco secretado pelas células caliciformes; as demais áreas assumem coloração no tom de rosa claro.

A análise quantitativa das células caliciformes foi realizada em uma região previamente delimitada da mucosa com vilosidades íntegras dos segmentos duodeno, jejuno e íleo do intestino delgado, e cólon, do intestino grosso. As imagens foram visualizadas em aumentos de 40X, utilizou microscópio óptico Olympus BX 40 com câmera Olympus OLY 200, conectada ao computador pela placa digitalizadora Data Translation 3150; posteriormente, foram capturadas e segmentadas por

“threshold” ou contraste limiar, conforme (WALDEMARIN, BELETTI, COSTA, 2004), após formou-se imagens binárias onde as áreas de células caliciformes ficaram pretas, e as demais em branco (Figura 1). O percentual da cor preta nas áreas delimitadas evidenciou a região das células caliciformes, que foi calculado pelo programa de análise de imagens HL Image 97 (Western Vision Softwares).



___ equivale a 100 micrômetros

FIGURA 1. Exemplo de imagem digital (A) e binária (B) segmentada por “threshold”. Corte histológico do cólon de leitão com 63 dias de idade, coloração azul de alcian e PAS (Periodic Acid Schiff). Setas de cor azul exemplificam regiões de células caliciformes.

Corou-se pelo Alcian Blue por 45 min, lavou-se em A/cr / 5 min, em seguida em Ad / 5 min; oxidou-se com ácido periódico a 0,5% / 10 min, lavou em A/cr / 5 min e em duas mudas em água destilada, tratou-se pelo reativo de Schiff / 10 min, passou pelos banhos sulfurosos por 3 vezes dois min em cada, lavou-se em A/cr por 10 min . As lâminas foram montadas com lamínula e o selante entellan[®].

3.6 Colheita de sangue

Colheu-se 3 mL de sangue de cada leitão nos dias 0, 14 e 42 dias de experimento, na veia jugular, com agulha descartáveis BD 0,7X25 e seringas descartáveis de 5 mL, armazenados em tubo de ensaio. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por três horas para coagulação; depois, armazenados em geladeira, por duas horas, por facilitar a retração do coágulo. Após a centrifugação, em 1200 G por cinco min, procedeu-se à separação dos soros, os quais foram armazenados à temperatura de -20°C até a realização do teste ELISA.

3.7 Conjugação do anticorpo com a biotina

A dosagem de IgA sérica total pelo teste ELISA “enzyme linked immunosorbent assays”, segundo Mineo (1980), o primeiro passo é a conjugação do anticorpo anti-IgA suína com biotina, abaixo descrita:

O anticorpo de cabra anti-IgA suína (Serotec, Oxford, England) foi marcado com biotina de acordo com o seguinte protocolo: 250 µg de N-hidroxysuccinida-biotina (Sigma Chemical Co., EUA) foram adicionadas a 1 mg de anticorpo anti IgA suína diluído em tampão borato de sódio 0,1M (pH 8.8). A mistura foi incubada por 4 horas à temperatura ambiente sob agitação lenta. Em seguida, 20 µL de solução de NH₄Cl a 1 M foram adicionados para cada 250 µg de biotina e incubados por 10 min à temperatura ambiente. O anticorpo marcado foi dialisado contra PBS para remover a biotina não ligada, com pelo menos seis trocas durante 48 horas; posteriormente armazenado a - 20°C.

3.8 Dosagem de IgA sérica total pelo teste ELISA

A dosagem de IgA total no soro dos leitões dos quatro grupos de tratamentos foi realizada por ELISA, conforme anteriormente descrito (RODRIGUES, 2002). Placas de poliestireno de alta afinidade com 96 poços (Corning Incorporated Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), foram sensibilizadas (50 µL/poço) com o anticorpo monoclonal (AC de captura) de camundongo anti-IgA suína (Serotec, Oxford, England) diluído a 1:100 em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C.

As placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos a 0,01M (PBS; pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) por três vezes e os sítios ativos das placas foram bloqueados (100 µL/poço) com 1% de soroalbumina bovina (BSA; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em PBS-T por uma hora à temperatura ambiente.

Após novo ciclo de lavagens, as amostras de soros dos leitões foram adicionadas (50 µL/poço) em duplicata, nas diluições de 1:40 e 1:80 em PBS-T-BSA e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Em cada placa, foram utilizadas três amostras de soros pré-colostro de leitões recém-nascidos (controles negativos), duas amostras de soros de suíno adulto (controle positivo) e o diluente PBS-T-BSA como controle da reação. As placas foram submetidas a novo ciclo de lavagens com PBS-T por seis vezes e, subsequente, foi adicionado (50 µL/poço) o anticorpo secundário de cabra anti-IgA suína (Serotec, Oxford, England) marcado com biotina, na diluição de 1:1000 em PBS-T-BSA. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas novamente por seis vezes com PBS-T.

Em seguida, foi adicionado (50 µL/poço) o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co., EUA) na diluição de 1:1000 em PBS-T-BSA e incubado durante 30 min à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático consistindo de solução de 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma Chemical Co., EUA) a 0,01 M em tampão citrato-fosfato a 0,07M (pH 4,2) contendo 0,03% de H₂O₂ (Sigma Chemical Co., EUA).

Os valores de densidade óptica (DO) de IgA sérica total foram determinados em leitora de ELISA (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA), a 405 nm.

3.9 Dosagem de IgG sérica total pelo teste ELISA

A dosagem de IgG total no soro dos leitões submetidos aos quatro tratamentos foi realizada por ELISA, após a padronização e otimização da reação em experimentos preliminares pela titulação em bloco dos reagentes. Placas de poliestireno de alta afinidade com 96 poços (Corning Incorporated Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), foram sensibilizadas (50 µL/poço) com o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG suína (Serotec, Oxford, England) na concentração de 5

µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (PBS -T- BSA) a 0,06 M, pH 9,6, por 18 horas, a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-T por três vezes e bloqueadas com PBS-T-BSA.

As amostras de soro foram adicionadas (50 µL/poço) em duplicata, na diluição de 1:10000 em PBS-T-BSA e incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Em cada placa, foram utilizados três soros controles negativos de suínos recém-nascidos que não ingeriram o colostro e o diluente PBS-T-BSA como controle dos soros. As placas foram submetidas a novo ciclo de lavagens com PBS-T por seis vezes e, imediatamente, foram adicionados 50 µL por poço do anticorpo de cabra anti-IgG suína marcado com peroxidase (Serotec, Oxford, England), na diluição de 1:50.000 em PBS-T-BSA e incubado por 1 hora a 37°C. Após um novo ciclo de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático (ABTS e H₂O₂).

3.10 Imunoistoquímica e identificação de células IgA positivas

3.10.1 Processamento histológico

Após a preparação dos fragmentos dos tecidos para a rotina histológica, os cortes de duodeno e linfonodos mesentéricos foram emblocados em parafina, cortados no micrometro com espessura de 4-6 µm, os quais foram fixados sobre lâminas de vidro, sem uso de albumina, diferente do usual na rotina histológica.

Em seguida secados em estufa por 10 min, e guardados até a reação de imunoistoquímica.

3.10.2 Reação imunoistoquímica

Os cortes foram desparafinados em solução de xilol 100% por 20 min a temperatura de 40-50°C, 1ª passagem, xilol por 15 min à temperatura ambiente 2ª passagem, em seguida reidratados em uma bateria seqüencial de alcoóis etílicos decrescentes diluídos em A/d 100, 90, 80 e 70% 3 min por seção. Em seguida fez o bloqueio da fosfatase alcalina endógena com solução de ácido acético a 8%, para o linfonodos usou 10 min, e para duodeno 3 imersões de 10 min cada vez, seguido de lavagem em A/Cr e em seguida em solução tampão TRIS 0,05M, pH 7.4, com 0,87% de cloreto de sódio "Tris buffered saline" (TBS), durante 5 minutos. Procedeu ao

bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, incubou com soro normal de coelho diluído a 2,5% em TBS, durante 1 hora a 37 C. Após incubou-se com Ac primário anti IgA suína produzida em cabra (SEROTEC), a diluição de 1/100 em TBS por uma noite a 4 C, seguido de duas lavagens de 5 min cada com TBS. Incubou-se as lâminas com o Ac secundário anti cabra biotilado (IgG de coelho), diluído 1/100 em TBS por 1 h a 37° C e depois fez-se duas lavagens de 5 min cada com TBS. Para amplificação do sinal da reação foi utilizado o complexo avidina biotina fosfatase alcalina (AB/PA), diluído em 1/100 em TBS, fez outra incubação por 30 min a 37° C e mais duas lavagens de 5 min com TBS. Para revelar utilizou-se o substrato fast red-naftol (SIGMA) em TBS por 3 min, seguido de lavagens em A/Cr e TBS. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer por 10 min, seguindo-se a diferenciação do corante em água amoniacal, corrente e destilada. Após secagem das lâminas ao ar, foram montadas com glicerina pH 7.4, e lamínula. Em seguida fez-se a leitura das lâminas em microscópio óptico, localizou e contou o número total de células IgA positivas, expressa em médias da contagem de 40 campos de cada lâmina, fotografadas em aumento de 400 vezes. Como controle da reação, parte do material foi incubado com soro normal de coelho como Ac primário. A padronização das reações foi conforme o protocolo de Rodrigues (2002).

3.11 Análise econômica

A eficiência econômica entre as rações testadas foi analisada pela determinação do custo do alimento por ganho de peso vivo em kg, de acordo com a seguinte fórmula (BELLAYER et al., 1985):

$$CM_{ei} = \frac{Q_i \times P_i}{G_i}$$

Onde:

CM_{ei} = Custo médio de alimentação por kg de peso vivo, obtido no i-ésimo tratamento;

Q_i = Quantidade de ração a ser consumida no i-ésimo tratamento;

P_i = Preço da ração (R\$/kg) da época, no i-ésimo tratamento;

G_i = Ganho de peso diário (GPD, em g) no i-ésimo tratamento verificado no período.

A eficiência econômica do desempenho dos leitões de cada tratamento foi analisada pelo Índice de Eficiência Econômica (IEE), conforme BARBOSA et al. (1982), de acordo com a seguinte fórmula:

$$IEE = \frac{MCM_e \times 100}{CM_{ei}}$$

Onde:

MCM_e = Menor custo médio da ração entre os tratamentos

CM_{ei} = Custo médio do tratamento i considerado

3.12. Delineamento estatístico

Utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 5 repetições, dentro dos períodos P1, P2 e P3, para desempenho e análise econômica. Cada repetição (baia) foi constituída por cinco animais. Realizou-se a análise de variância, com comparações entre médias pelo teste de Tukey com nível de significância a 5% (STATISTICA VERSION, 2005).

Para as análises histomorfométricas, variáveis com distribuição não normal, utilizou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis na comparação geral e o teste de Tukey com nível de significância a 5% nas comparações dois a dois.

Na dosagem de IgA sérica, utilizou-se o teste t de Student bicaudal. Na dosagem de IgG sérica, utilizou-se o teste t de Student. Na contagem de células IgA positivas, utilizou-se o teste T de Student.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar

Os valores de consumo de ração dos diferentes tratamentos estão representados na TAB. 5.

Tabela 5 Consumo de ração (kg) por tratamento, de leitões na fase de creche alimentados com dietas com e sem colistina, e ou com Bio-Mos®.

Tratamentos	Ração / Período *			
	Pré-Inicial (P1)	Inicial 1 (P2)	Inicial 2 (P3)	Período Total (PT)
T1	106,50	234,00	897,50	1.238,00 A ¹
T2	89,00	250,00	947,00	1.286,00 A
T3	104,40	250,00	904,00	1.258,40 A
T4	97,50	232,00	963,00	1.292,50 A
Mortalidade (%)	4% ²	---	4% ³	---

¹ Médias com letras iguais na mesma coluna são semelhantes $P(>0,05)$ entre si, pelo teste de Tukey 5%.

² Morte de um leitão no 9º dia do teste (P1), ração PRE INICIAL;

³ Morte de um leitão, no 37º dias do teste (9º dia do P3), ração INICIAL;

* O valor das parcelas perdidas foi estimado com base na média das repetições do tratamento, onde ocorreu a perda da parcela (morte do animal).

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) do consumo de ração entre os diferentes tratamentos (TAB. 5). Provavelmente, devido ao peso inicial dos leitões ter sido bastante uniforme no início do experimento, e ao fato de os animais serem da mesma procedência e composição genética, e também devido ao manejo padrão a todos os tratamentos, visto que foram alojados em sala única, durante todo o experimento, aliado ao uso de rações isonutrientes entre os quatros tratamentos.

As médias de ganho de peso por período dos animais submetidos aos diferentes tratamentos estão representadas na TAB. 6.

Tabela 6 - Médias de ganho de peso por animal (kg/período), por períodos, de leitões na fase de creche de acordo com os tratamentos.

TRATAMENTO	P1	P2	P3	PERÍODO TOTAL ²
T1	2,549	6,408	10,033	18,958 A, ³
T2	2,161	6,412	9,525	18,100 A
T3	2,302	6,030	9,835	18,057 A
T4	2,047	6,322	9,738	18,062 A
MÉDIA	2,265 a ¹	6,293 b	9,783 c	
Valor de P	> 0,05 ^{NS}	< 0,01 ^{3*}	>0,05 ^{NS}	

¹ Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,01$) pelo teste de Tukey 5%.

² Médias com letras iguais na mesma coluna são semelhantes ($P > 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey 5%;

^{3*} Significativo ($P < 0,01$); ^{NS} Não Significativo ($P > 0,05$).

Os resultados de ganho de peso entre os quatro tratamentos no presente estudo diferiram dos resultados encontrados por Lovatto et al. (2005), quando compararam dietas sem aditivos antimicrobianos, com alho ou colistina, e observaram ganho de peso maior nos leitões suplementados com colistina.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa ($P > 0,05$) de ganho de peso entre os tratamentos (TAB. 6), o coeficiente de variação (CV) foi de 27,36%, mesmo nas condições padronizadas do teste. Verificou-se, entretanto, que a média de peso dos leitões no período total, ou seja, nos 42 dias de experimentação, em T1 (colistina) foi 4,96% maior, quando comparado à média encontrada no T4 (Bio-Mos[®]). Segundo Fedalto et al. (2003), os antibióticos, quando utilizados como promotores de crescimento, apresentam muitos efeitos benéficos na produção animal. No entanto, sua retirada será inevitável devido às limitações impostas pela globalização que restringe cada vez mais seu uso, sendo que o efeito imediato desta suspensão poderá ter uma queda brusca na produtividade.

Na granja comercial, onde foi realizado este experimento, os desafios de campo eram considerados altos. Federizzi (2005), simultaneamente na condução do presente experimento, baseado em aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos, caracterizou a ocorrência de Circovirose Suína neste rebanho, associada às infecções bacterianas concomitantes (*Streptococcus suis* sorotipo 1, *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*). Esta situação espelha o desafio encontrado na maioria das suinoculturas brasileiras, e, quanto maior o desafio, maior é a possibilidade de efeito para os antimicrobianos.

Ao considerar apenas os resultados de desempenho, a utilização de Bio-Mos[®] mostrou-se similar aos demais tratamentos, já que não diferiu significativamente.

Nos grandes centros observa-se uma crescente conscientização das vantagens de consumir carnes sem resíduos de antibióticos devido ao desenvolvimento potencial de bactérias resistentes, inclusive cepas patogênicas. Somando-se a estas razões, os perigos que o uso contínuo dos antimicrobianos nas rações representa no surgimento de resistências múltiplas de bactérias, assim como os impactos negativos que isto pode ter na saúde e no meio ambiente (HAAPAPURO et al., 1997).

A TAB. 7 mostra a conversão alimentar no período total, dentre os diferentes tratamentos.

Tabela 7 - Conversão alimentar estimada (kg) por tratamento, de leitões alimentados com dietas com e sem colistina, e ou com Bio-Mos[®] na fase de creche

Tratamentos	CR ¹	PESO FINAL ²	CA ³
T1	49,52	24,758	2,00
T2	51,44	23,900	2,15
T3	50,33	23,850	2,11
T4	51,73	23,860	2,16
MÉDIA	50,74	24,090	
CV (%)	1,99	1,85	

¹ CR: Consumo de ração por tratamento no período total, em kg;

² PESO FINAL: Peso médio dos leitões aos 63 dias de idade, em kg;

³ CA: Conversão alimentar estimada, considerando-se a perda de parcelas (morte de animais).

Da mesma forma que em consumo de ração e ganho de peso, a CA não diferiu ($P>0,05$) entre os quatro tratamentos, similar aos resultados obtidos por Utiyama (2004), o qual não observou diferenças na conversão alimentar entre os tratamentos utilizados em seu estudo (controle, antimicrobiano, probiótico, prebiótico e extrato vegetal).

4.2 Histomorfometria intestinal

Os resultados de comprimento médio dos vilos (CV), largura média dos vilos (LV), largura média das criptas (LC), em μm , e número de vezes em que a superfície da mucosa intestinal é aumentada (M) do duodeno, jejuno e íleo de leitões aos 63

dias de idade, que foram submetidos aos quatro diferentes tratamentos, estão na TAB. 8.

Tabela 8 - Comprimento médio dos vilos (CV), largura média dos vilos (LV), largura média das criptas (LC), em μm , e número de vezes em que a superfície da mucosa intestinal é aumentada (M) de leitões aos 63 dias de idade, submetidos a quatro diferentes tratamentos.

Segmento	Tratamento	CV		LV		LC		M	
Duodeno	T1	442,71 $\pm$ 110,92	a	146,63 $\pm$ 55,71	ab	73,94 $\pm$ 27,10	ab	5,86 $\pm$ 1,37	ab
	T2	442,76 $\pm$ 139,33	a	179,93 $\pm$ 51,97	a	73,40 $\pm$ 8,80	a	5,42 $\pm$ 1,46	ab
	T3	325,19 $\pm$ 156,66	a	117,96 $\pm$ 22,73	b	94,71 $\pm$ 10,11	b	4,00 $\pm$ 1,48	b
	T4	396,85 $\pm$ 77,85	a	138,60 $\pm$ 34,38	ab	55,93 $\pm$ 5,68	a	6,38 $\pm$ 1,44	a
Jejuno	T1	341,33 $\pm$ 84,91	a	112,23 $\pm$ 23,35	a	36,10 $\pm$ 3,76	a	7,30 $\pm$ 1,22	a
	T2	331,03 $\pm$ 127,74	a	131,00 $\pm$ 52,93	a	37,61 $\pm$ 12,53	a	6,31 $\pm$ 1,94	a
	T3	345,17 $\pm$ 17,40	a	90,60 $\pm$ 23,79	a	35,25 $\pm$ 2,42	a	8,42 $\pm$ 1,26	a
	T4	403,84 $\pm$ 210,88	a	136,76 $\pm$ 24,68	a	36,29 $\pm$ 0,54	a	7,74 $\pm$ 3,85	a
Íleo	T1	266,38 $\pm$ 53,93	a	156,09 $\pm$ 17,19	a	33,23 $\pm$ 2,10	a	4,96 $\pm$ 0,85	a
	T2	277,85 $\pm$ 80,20	a	115,63 $\pm$ 37,97	a	34,64 $\pm$ 3,31	ab	6,01 $\pm$ 1,08	a
	T3	280,36 $\pm$ 78,82	a	148,11 $\pm$ 48,69	a	38,29 $\pm$ 2,84	b	5,29 $\pm$ 1,74	a
	T4	268,60 $\pm$ 83,63	a	137,12 $\pm$ 65,51	a	33,49 $\pm$ 3,71	ab	5,68 $\pm$ 2,21	a

[†] Letras distintas na mesma coluna para cada segmento intestinal indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey com $P \leq 0,05$, após constatação de diferença entre os tratamentos com aplicação da ANOVA ($P \leq 0,05$).

Os parâmetros mensurados (CV, LV, e M) não foram afetados pelos tratamentos no jejuno e no íleo. No jejuno, a LC não foi alterada pelos tratamentos ($P > 0,05$), enquanto que no íleo, houve diferenças entre tratamentos ($P < 0,05$), que não foram suficientes para influenciar M.

No duodeno, o CV não sofreu alteração ao passo que o LV, LC e M sofreram influência dos tratamentos. Os valores encontrados para M, por representarem a superfície absorptiva, têm relevante destaque neste estudo por mostrarem que a suplementação com Bio-Mos[®] promoveu aumento na área absorptiva da mucosa intestinal.

Galfi , Neoprady (1995) estudaram o efeito do butirato sobre as células intestinais de leitões alimentados com uma dieta controle ou com uma dieta suplementada com 1,7 kg/t de butirato, e observaram aumento de 30 % no

comprimento das vilosidades no íleo dos leitões alimentados com butirato. Isto indica um aumento da capacidade digestiva e absorviva destes animais.

Estes resultados se aproximam com os resultados de Kisielinski et al. (2002) quando trabalharam com outro mamífero, ratos, medindo os segmentos jejuno $6,9 \pm 1,6$ e íleo $5,3 \pm 1,1$. Porém, foram bem diferentes de Marchini (2005), quando trabalhou com frangos de corte, encontrou aos 42 dias de idade para duodeno 26,21, jejuno 18,07 e íleo 14,13, pelo fato dos frangos de corte ter o período de engorda e acabamento bem mais precoce, 42 dias de idade, comparados aos suínos aos 170 dias, talvez justifique esta acentuada diferença devido à mucosa dos frangos demandar uma superfície absorviva bem mais extensa para o rápido crescimento e ganho de peso em curto espaço de tempo. Na tab. 9, observa-se a porcentagem de Células Caliciformes.

Tabela 9 - Porcentagem de células caliciformes (CC) e desvio-padrão em leitões aos 63 dias de idade, submetidos os quatro diferentes tratamentos.

Tratamento	Duodeno		Jejuno		Íleo		Cólon	
	%CC	DP	%CC	DP	%CC	DP	%CC	DP
T1	3,63	1,00	3,47	0,85	2,43	0,30	5,10	0,60
T2	5,17	3,61	3,90	1,95	4,67	0,60	6,53	3,00
T3	6,83	1,87	4,65	0,78	5,07	1,20	3,10	1,80
T4	4,10	0,75	2,87	0,85	2,67	2,40	4,63	3,20
Média	4,93	-	3,72	-	3,71	-	4,84	-

Os resultados de porcentagem de células caliciformes são apenas demonstrativos, porém não conclusivos devido ao baixo valor de n avaliados neste quesito, por perdas de algumas lâminas de tecido. Entretanto, ilustram que o número de células caliciformes foi maior no duodeno em todos os tratamentos. Os valores médios encontrados neste estudo foram diferentes e inferiores dos encontrados em leitões de 56 dias de idade por Utiyama (2004), respectivamente 5,91% no duodeno, 5,94% no jejuno e 8,25% para íleo, e não citou valores para cólon.

Relatos de Bienenstock, Befus (1980) mostraram que os microrganismos da microbiota intestinal podem influenciar a dinâmica das células caliciformes pela liberação de compostos bioativos ou da ativação indireta do sistema imunológico.

A camada de muco que reveste a superfície do epitélio intestinal é a primeira barreira à infecção entérica. Portanto, a produção de muco determinada pelo número de células caliciformes, é uma importante característica do sistema de proteção contra patógenos e segundo Ferket, Santos Júnior (2005)

4.3 Níveis de IgA sérica total pelo teste ELISA

Os níveis séricos de IgA total encontrados nos leitões em três momentos do estudo, aos 21, 35 e 63 dias de idade estão demonstrados nas figuras 2, 3 e 4.

O padrão positivo utilizado foi soro de um suíno adulto e o padrão negativo foi soro de leitão recém-nascido, que não mamou o colostro. A linha pontilhada refere-se ao “cut off”, a média dos soros negativos mais 3 desvios-padrão.

No dia zero, todos os níveis foram semelhantes ($P>0,05$) para todos os tratamentos, assim como 14 dias depois. Entretanto, no último dia do estudo, foi demonstrada diferença significativa ($P<0,05$) entre as respostas observadas de leitões dos tratamentos T3 (colistina + Bio-Mos[®]), com níveis de IgA sérica total superiores aos leitões de T1 (colistina). Supõe-se que este aumento pode ter ocorrido em função do prebiótico favorecer a população de bactérias produtoras de ácido láctico, que intensificariam a atividade de macrófagos e linfócitos, relatado por Sissons (1989). Estes resultados confirmam os dados obtidos por Rodrigues (2002), a qual trabalhou com probiótico na dieta de leitões lactentes.

A resposta e a dosagem de um antimicrobiano específico variam conforme a idade do animal, da prevalência de doenças, o tipo de aditivos e desafios ambientais em que se encontra o rebanho (BELLAYER, 2005).

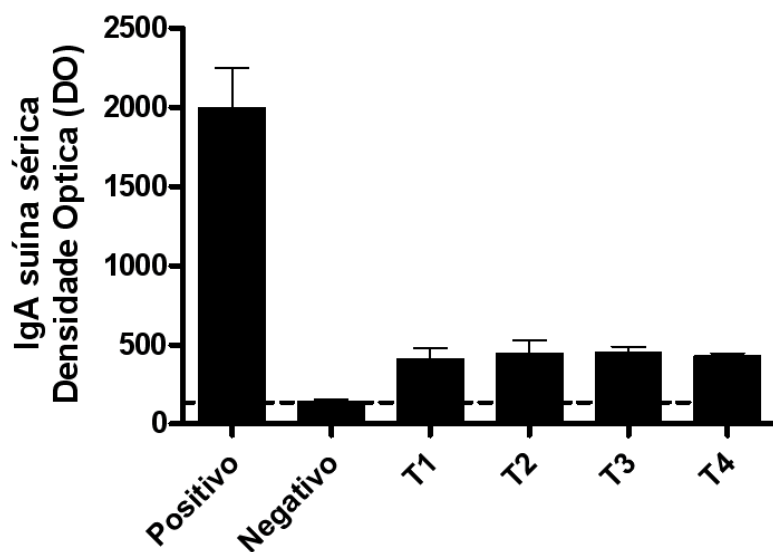


FIGURA 2. Níveis de IgA sérica total em leitões aos 21 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos

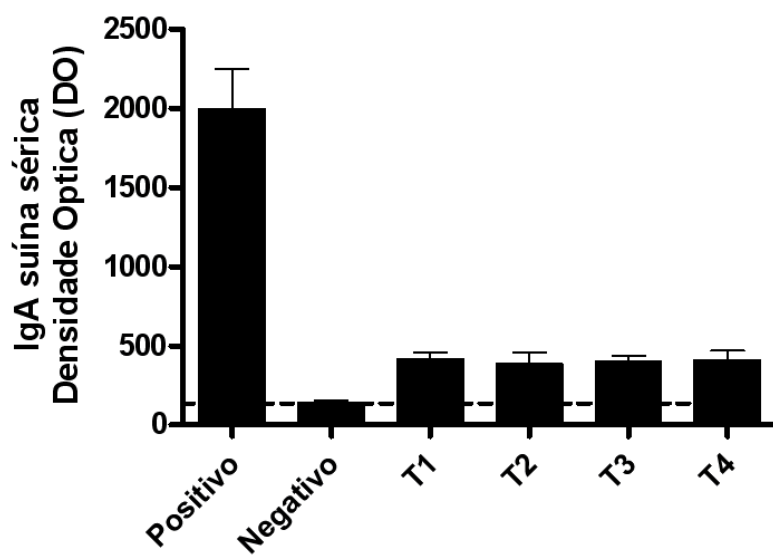


FIGURA 3. Níveis de IgA sérica total em leitões aos 35 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos

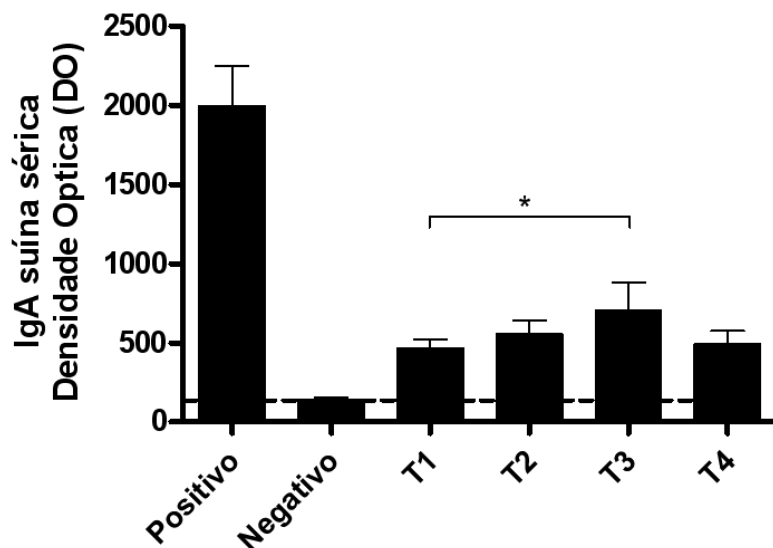


FIGURA 4. Níveis de IgA sérica total em leitões aos 63 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos

4.4 Níveis de IgG sérica total pelo teste ELISA

Os resultados de IgG séricas estão ilustrados pelas figuras 5 e 6.

Como fato relevante, observou-se maior produção de IgG sérica total ($P < 0,05$) em T2 com relação ao T3 em leitões de 63 dias de idade (figura 6), provavelmente em função do maior desafio no lúmen intestinal, proporcionado pela ausência total de promotores de crescimento na ração (T2). Considerando-se que em T3 a associação de colistina e Bio-Mos[®] possa ter gerado menor competição ao ambiente intestinal, o animal talvez tenha deixado de desviar nutrientes importantes destinados ao crescimento e ganho de peso para atender as exigências acentuadas do sistema imunológico neste momento de estresse.

Os ajustes metabólicos resultantes da ativação do sistema imune redistribuem os nutrientes ingeridos para outras vias, fora do processo de crescimento (STAHLY, 1994).

Há falta de conhecimentos para esclarecer as reais necessidades nutricionais exigidas ao adequado funcionamento da ótima resposta imunológica. Corroborando com a ideia de Ferreira (2005) a necessidade de suplementação de nutrientes na atuação do sistema imunológico que ainda não foi bem elucidada; por esta razão, os nutricionistas formulam dietas visando atender as necessidades do máximo potencial de crescimento, manutenção, diferentes estágios fisiológicos e de produção, além de

disponibilizar um ótimo nível de nutrientes para a adequada ativação e responsividade do sistema imunológico.

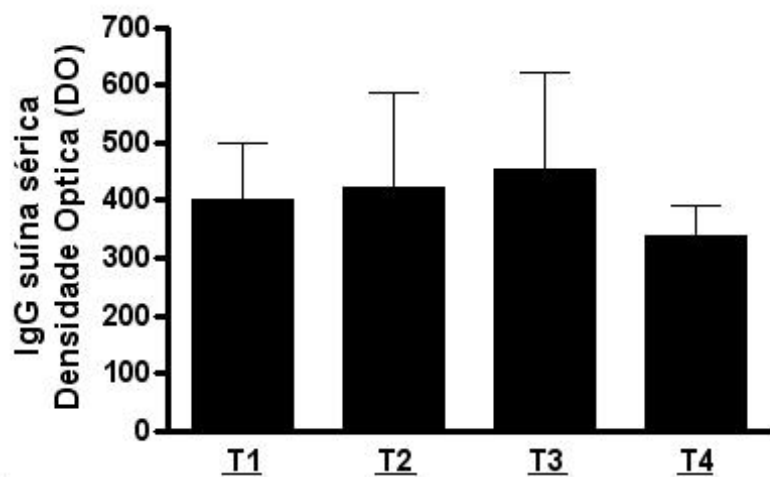


FIGURA 5. Níveis de IgG sérica total em leitões aos 21 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos

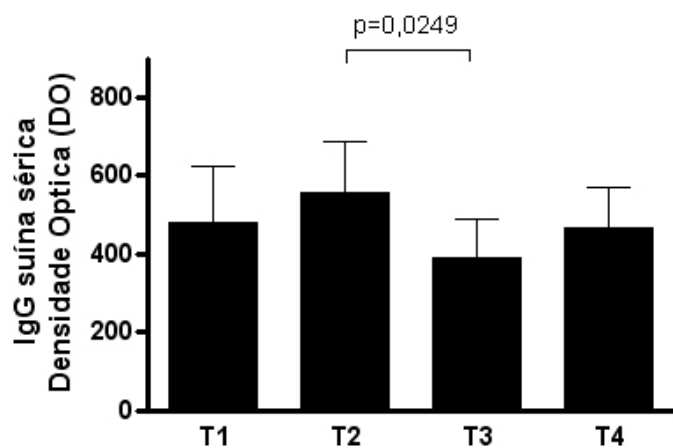


FIGURA 6. Níveis de IgG sérica total em leitões aos 63 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos

4.5 Imunoistoquímica em células IgA positivas no duodeno e linfonodos mesentéricos

Não houve diferença ($P>0,05$) na contagem de células IgA positivas nos linfonodos avaliados, sendo detectadas apenas em quantidades irrisórias (T1, 0,267; T2, 0,375; T3, 0,225; T4, 0,250), diferente do encontrado em leitões lactentes, aos 21 dias de idade, por Rodrigues (2002).

No duodeno (figura 7), observou-se maior número de células IgA positivas nos leitões tratados com T4 (Bio-Mos[®]), seguido por T3 (associação dos produtos colistina e Bio-Mos[®]), ambos superiores ao T1 e T2 (tratamentos sem Bio-Mos[®]).

Sabe-se que IgA é a principal imunoglobulina na mucosa intestinal e talvez por isso foi encontrada em maior quantidade do que nos linfonodos, pois os complexos de IgA e receptores poliméricos de imunoglobulina (pIR) sofrem endocitose e são finalmente secretados no lúmen intestinal. As células produtoras de IgA migram para a base das membranas basais, e são expressas pelas quimiocinas nas células epiteliais, as quais aumentam a produção e secreção de IgA. Os neurotransmissores também aumentam a produção de IgA no trato intestinal. As placas de Peyer presentes no GALT regulam a produção de IgA secretora. Algum destes mecanismos pode estar associado a maior contagem de células IgA positivas em intestinos de leitões que receberam o Bio-Mos[®] (T3 e T4), o qual provavelmente estimulou a resposta local, se tornando uma possível alternativa para a prevenção de colonização de microrganismos patogênicos.

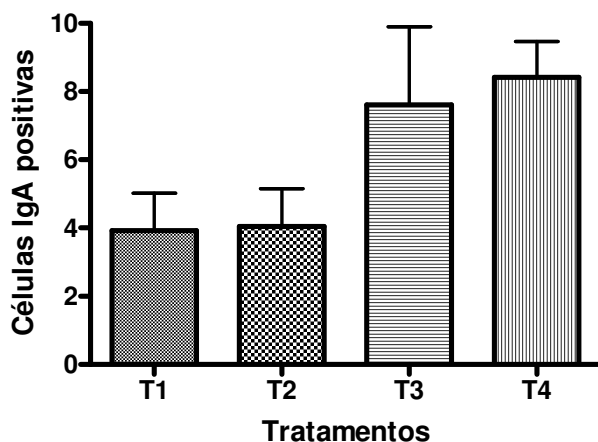


FIGURA 7. Contagem de células IgA positivas no duodeno de leitões aos 63 dias de idade submetidos a 4 diferentes tratamentos

4.6 Análise econômica

Observou-se (TAB. 10 e 11) que os menores Cme_i e maiores IEE correspondentes foram: para o T2 (R\$ 1,321 /kg de PV ganho) no período 1, e T1 nos períodos seguintes, em P2 (R\$ 0,734/ kg de PV ganho) e em P3 (R\$ 0,842/ kg de PV ganho).

Tabela 10 - Custo médio de alimento por kg de peso vivo ganho por tratamento (Cme_i), de acordo com o período¹.

TRATAMENTOS	Cme_i (R\$)		
	P1	P2	P3
T1	1,349	0,734	0,842
T2	1,321	0,776	0,914
T3	1,487	0,844	0,876
T4	1,553	0,750	0,964

¹ P1 (21 a 35 dias de idade); P2: de 36 aos 49 dias de idade; P3: de 50 aos 63 dias de idade.

Detalhando estes dados com o IEE (TAB.10), tem-se:

Tabela 11 - Índice de Eficiência Econômica avaliado de acordo com o período

TRATAMENTOS ¹	IEE (%)		
	P1	P2	P3
T1	97,93	100,00	100,00
T2	100,00	94,65	92,03
T3	88,78	86,93	96,03
T4	85,05	97,87	87,34

Aparentemente, o uso do prebiótico (T4) onerou o custo de produção nos períodos P1 e P3, tendo alcançado o melhor IEE no período P2, com a diferença mínima de 2,13% em relação ao T1. Porém, este efeito pode ser minimizado pela agregação de valor ao suíno produzido com prebióticos, uma vez que estes não deixam resíduos na carne e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos (FULLER, 1988; ANDREATTI, SAMPAIO, 2000).

Além disto, como não houve diferença de desempenho entre os tratamentos utilizados em condições de campo, apesar da padronização imposta pelo teste, a diferença na resposta obtida em M, indicando que a suplementação com Bio-Mos[®] promoveu aumento na área absortiva da mucosa intestinal, o que pode superar a

informação obtida quando houver melhores condições gerais de manejo e menor desafio sanitário.

Outros fatores a serem considerados: o aumento de IgA sérica total em leitões que consumiram Bio-Mos[®] mais promotor convencional durante 42 dias pós-desmame e o aumento do número de células IgA positivas encontradas nos animais que receberam Bio-Mos[®] na ração em comparação aos não tratados, sustentando a hipótese de estimular uma resposta intestinal benéfica.

5 CONCLUSÕES

- A utilização de prebiótico, antibiótico ou associação destes não alterou o desempenho dos leitões na fase de creche.
- A superfície de absorção da mucosa duodenal foi maior em leitões tratados com Bio-Mos[®].
- Demonstrou-se aumento de IgA sérica total em leitões que consumiram Bio-Mos[®] mais promotor convencional durante 42 dias pós-desmame.
- Os níveis séricos de IgG foram maiores nos animais que não receberam nenhum promotor de crescimento aos 42 dias pós-desmame nesta granja com alto desafio de campo.
- Observou-se maior quantidade de células IgA positivas no duodeno de leitões que receberam Bio-Mos[®] na ração em comparação aos não tratados, sustentando a hipótese dos prebióticos estimular uma resposta imunitária local.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, C. A. **Nutricines-food components in health and nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 1999.

ALLTECH. 2003. Apresenta informações sobre a empresa, eventos e simpósios. Disponível em: <<http://www.alltech.com/Brasil/>>. Acesso em: 3 nov. 2005.

ANDREATTI, R. L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e prebióticos. **Educação Continuada**, São Paulo, v.2, n. 3, p. 59-71, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA-ABIPECS. [2006?]. Apresenta informações estatísticas, relatórios, produtos e outros. Disponível em: <<http://abipecs.org.br>>. Acesso em: 6 jan. 2006.

BALLOU, C. E. A Study of the immunochemistry of three yeast mannans. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, v. 245, n.5, p.1197-1203, mar. 1970.

BARBOSA, H. P. et al. Triguilho para suínos nas fases iniciais de crescimento e terminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 21, n. 5, p. 827-837, 1982.

BELLAVER, C. Utilização de melhoradores de desempenho na produção de suínos e de aves. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 7., 2005, Campo Grande. **Anais ...** Campo Grande: SBZ, 2005. p.1-29.

BELLAVER, C. et al. Radícula de malte na alimentação de suínos em crescimento e terminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.20, n. 8, p. 969-974, 1985.

BENGMARK, S. Gut microbial ecology in critical illness: is there a role for probiotics, prebiotics and symbiotics. **Current Opinion in Critical Care**, Philadelphia, PA, v. 8, n. 2, p.145-151, abr. 2002.

BERENDS B. R, URLINGS H. A. P., SNIJDERS J. M. A. and VAN. KNAPEN F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella spp* in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 30, n. 1-2, p. 37-53, jun. 1996.

BIENENSTOCK, J.; BEFUS, A. D. Mucosal immunology, **Immunological Reviews**, Copenhagen, DK, v. 41, n.2 p. 249-270, 1980.

BOURLIOUX P, KOLETZKO B, GUARNER F, BRAESCO V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium: "The Intelligent Intestine", held in Paris, June 14, 2002. **Am J Clin Nutr** 2003;78:675-83.

BRAMBELL, F. W. R. The passive immunity of the young mammal. **Biological Review**, Cambridge, UK, v. 33, n.4, p.488-531, nov. 1958.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. Brasília: ANFAR/CBNA/SDR, 1998. 371 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 193**, de 12 de maio 1998. Aprova o regulamento técnico para licenciamento e renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário, anexo, elaborado pela Secretaria de Defesa Agropecuária. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1125>>. Acesso em: 3 jan. 2006.

BUDDINGTON, K. K.; DANOHO, J. B.; BUDDINGTON, R. K. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, MD, v. 132, p. 472-477, 2002.

CARLOS, I. Z. et al. Influência de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Org.). **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**, Viçosa, MG: [s.n.], 2003. p. 135-154.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma Abordagem multidisciplinar**. Barueri, SP: Manole, 2005. 465 p.

COLLET, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: RONDA LATINO-AMERICANA DA ALLTECH, 10., [Curitiba], 2000. **Palestras ...** Curitiba: Alltech, 2000. p. 20-30.

COOK, M. E. Antibodies: alternatives to antibiotics in improving growth and feed efficiency. **The Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, IL, v.13, n.1, p. 106-119, 2004.

COUTO, S. E. R. Classificação dos animais de laboratórios. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Org.). **Animais de laboratórios: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 59-64

CRIVELLATO, F. et al. Apposition of enteric nerve fibers to plasma cells and immunoblasts in the mouse small bowel. **Neuroscience Letter**, Limerick, Irlanda, v. 241, n. 2, p. 123-126, jan. 1998.

DAËRON, M. Structural basis of Fc γ R functions. **International Review of Immunology**, Chur; New York, v. 16, p. 1-27, 1997.

DRITZ, S. S. et al. Influence of lipopolysaccharide-induced immune challenge and diet complexity on growth performance and acute-phase protein production in segregated early-weaned pigs. **The Journal of Animal Science**, Savoy, IL, v.74, n.7, p.1620-1628, 1996.

DUVAL-IFLAH, Y. S. Comparison of yogurt, heat-treated yogurt, milk and lactose effects on plasmid dissemination in gnotobiotic mice. **International Journal of Genetic and Molecular Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 199 2001.

EWING, W. N.; COLE, D. J. A. **The living gut**: an introduction to micro-organisms in nutrition. New Ireland: Context, 1994. 220 p.

FEDALTO, L. M. et al. Probiótico *Versus* antibiótico na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais ...** Goiânia: ABRAVES, 2003. 303 p.

FEDERIZZI, N. **Diagnóstico de circovirose suína na região do triângulo Mineiro**. 2005. Monografia (Especialização em Ciências Suinícolas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FALK, P. G. et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews, New York**, v. 62, n. 4, p. 1157-1170, dec. 1998.

FERKET, P. R. Use of oligosaccharides and gut modifiers as replacements for dietary antibiotics. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 63., 2002, Eagan, MN. **Proceedings...** Eagan, MN: [s.n.], 2002. p. 169-182..

FERKET, P. R.; SANTOS JÚNIOR, A. A. Efeito da nutrição sobre a saúde intestinal e colonização por patógenos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO ALLTECH DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., Curitiba, 2005. **Anais ...** Curitiba: ALLTECH, 2005. v.1. p. 40-57.

FERNANDES, P. C. C. et al. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n.31, p. 53-69, 2000.

FERREIRA, S. R. A. A Nutrição e o sistema imune. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n.48, p. 85-112, 2005.

FULLER, R. Probiotic in man and animals – a review. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

GALFI, P.; NEOPRADY, S. **Probiotiques – Prébiotiques – Parabiotiques** In: SYMPOSIUM INTERNATIONAL: ALIMENTATION ANIMALE ET SANTÉ PUBLIQUE, Additifs sans Résidu. [S.l.: s.n.], 1995. 16 p.

GIBSON, G. Oligosacharides and probiotics. In: PET FOOD FORUM 96 PRODUCTION SYMPOSIUM AND TRADE SHOW. **Procedings...**Chicago, [s.n.],1998. p. 42-62.

GONZALES, E. **Ação pró-ativa dos aditivos alimentares**. In: CURSO DE FISIOLOGIA DA DIGESTÃO E METABOLISMO DOS NUTRIENTES EM AVES, Jaboticabal, 2004. 56 p.

GOTTWALD, T.; LHOTAK, S.;STEAD, R. H. Effect of truncal vagotomy and capsaicin on mast cells and IgA-positive plasma cells in the rat jejunal mucosa. **Neurogastroenterology and Motility**, Oxford, v. 9, n.1, p. 25–32, mar. 1997.

GOZZOLINO, S. M. F. et al., **Biodisponibilidade de nutrientes**, Barueri-SP, Manole, 2005, 878 p.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, London, v. 361, n. 9353, p. 512-519, feb. 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Medica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

HÄGEWALD, S. et. al. Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, DK, v. 37, n. 5, p. 333-339, oct. 2002.

HAMPSON, D. J.; KIDDER, D. E. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. **Research in Veterinary Science**, London, v.40, n.1, p.24-31, 1986.

HEDEMANN, M. S. et al. Small intestinal peptidases in piglets around weaning. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.87, n. 1-2, p. 32-41, feb. 2003.

HIDAKA, H. et al. Effects of fructooligosaccharides in the intestinal microflora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v.5, n.1, p.37-50, 1986.

HIDAKA, H.; EIDA, T. Role of fructooligosaccharides in the the improvement of bacterial flora and in the control of decomposition product formation. **Shokuhin Kogyo Food Industry**, v.31, n.15, p.52-558, 1998.

HUMPHREY, B. D.; KOUTSOS, E. A.; KLASSING, K.C. Requeriments and priorities of the immune system for nutrients. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FED AND FOOD INDUSTRIES, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** . Nottingham: Nottingham University Press, 2000. p.69-77.

HUSBAND, A. J.; BEAGLEY, K. W.; MCGHEE, J. R. **Mucosal Cytokine**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 541–557.

INSTITUTO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. 2007. Apresenta informações sobre suas ações, revista do IDEC, código de defesa do consumidor, educação e outros. Disponível em: < <http://www.idec.org.br>>. Acesso em 12 out. 2005.

ITO, N. M. K. et al. Saúde gastrointestinal. manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: Produção de Frangos de Corte, 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004. p.206-260.

JOHNSON, R. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. **The Journal of Animal Science**, Savoy, IL, v.75, n. 5, p.1244-1255, 1997.

JONES, F. T.; RICKE, S. C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. **Poultry Science**, Champaign, Ill., US, v.82, N. 4, p. 613-617, abr. 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540 p.

KASPER, L., COURRET N., DARCHE S., LUANGSAY S., MENNECHET F., MINNS L., RACHINEL N., RONET C., BUZONI-GATEL D. Toxoplasma gondii and mucosal immunity, **International Journal for parasitology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 401-409, mar. 2004.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1008 p.

KISIELINSKY, K. et al. A Simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v.2, n.3, p.131-135, nov. 2002.

KLASING, K. C.; AUSTIC, R. E. Changes in plasma, tissue and urinary nitrogen metabolites due to an inflammatory challenge. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v.176, n. 3, p.276-284, jul.1984.

KLASSING, K.C.; LESHCHINSKY, T. V. Functions, costs and benefits of the immune system during development and growth. In: INTERNATIONAL ORNITHOLOGY CONGRESS, 22., 1999, Durban BirdLife South Africa, Johannesburg. **Proceedings...** Duban: [s.n], 1999. p.2817-2832

KONSTANTINOV, S. R. et. al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as reveled by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribossomal DNA. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 225-235, 2003.

KOTLER, Philip. **Administração de marketing: a edição do novo milênio**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2000.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. **Revue Scientifique et Technique de l'Ofisse International des Epizooties**, Paris, v.8, n.2, p.517-531,1989.

KUNKEL, E. J. et al. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.111, n. 7, p. 1001–1010, apr. 2003.

KUNKEL, E. J. et al. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestine compartment: epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 192, n. 5, p. 761-767, set. 2000.

LAN, Y. et. al. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, NY, v. 61, n. 1, p. 95-104, mar. 2005.

LEAL, L. H. M. (Coord.). **Atlas digital de histologia**. [200-]. Disponível em < <http://www.micron.uerj.br/atlas/Menu.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

LICHTMAN SN. Bacterial overgrowth. Allan Walker, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JÁ, Watkins JB. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. 3rd ed. Decker, Hamilton, 2000. p. 569-82.

LOU, R. **Dietary mannin-oligosaccharide as an approach for altering prevalence of antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance determinants in fecal bacteria from swine**. 1995. 128 f. Thesis (Master Science) -- University of Kentucky, Kentucky, 1995.

LOVATTO, P. A. et al. Alimentação de leitões na creche com dietas sem aditivos antimicrobianos, com alho (*Alium sativum*, L.) ou colistina. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.35, n.3, p. 656-659, maio/Jun. 2005.

LUCHIARI FILHO, A. E por falar em carnes vermelhas. **Pecuária de Corte**, São Paulo, V. 10, n. 84, p. 28-30, jan./fev. 1999.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotic. **Best Practice.& Research: Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, :287-298, apr. 2004.

MARCHINI, C. F. P. **Efeito da temperatura ambiente cíclica elevada sobre os parâmetros produtivos, fisiológicos, morfométricos e proliferação celular da mucosa intestinal de frango de corte**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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. **Journal of Animal Science**, Savoy, IL, v. 71, n. 6, p. 1503-1509, jun.1993.

MCINTYRE, T. M.; STROBER, W. Gut-associated Lymphoid Tissue: Regulation of IgA B-cell Development. In: OGRA, P. L. (Ed.). **Mucosal immunology**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 319–356.

MENTEN, J. F. M. **Eficácia, efeito sinérgico e modo de ação de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento em suínos**. 1995. 106 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1995.

MESTECKY, J.; MCGHEE, J. R. Immunoglobulin A: Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. **Advances in Immunology**, San Diego, v. 40, p. 153-245, 1987.

MILLER, B.G.; NEWBY, T.J.; STOKES, C.R.; BOURNE,F.J. Influence of diet on post weaning malabsorption and diarrhoea in the pig. **Research in Veterinary Science**, v.36, p.187-193, 1984.

MILTENBURG, G. Promotores e aditivos de crescimento em Avicultura: estado da arte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. v.2, p. 205-215.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Washington. v. 27, n. 2, p. 283-287, fev. 1980.

MONTES, A. J.; PUGH, D.G. The use of probiotics in food-animal practice. **Veterinary Medicine**, Prague, v.88, n.2218, p. 282-288, mar.1993.

MORAIS, M. B. de; FAGUNDES NETO, U. Enteropatia Ambiental. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 17, n. 48, p. 137-148, maio-ago. 2003.

MORES, N. et al. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: SOBESTIANSKY, J. (Ed.). **Suinocultura intensiva**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1998. p.135-162.

NEWMAN, K. Mannan-oligosaccharides: natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 10., 1994, Loughborough, UK. **Proceedings....** Loughborough, UK: University Press, 1994.

OBA, J.; CUKIER, C.; MAGNONI, D. **Probióticos em pediatria**. In: INSTITUTO DE METABOLISMO E NUTRIÇÃO. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.nutricaoclinica.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=125&Itemid=16>. Acesso em: 3 jan. 2006.

OFECK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature**, London, v. 265, n. 5595, p. 623-625, feb. 1977.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Geneva, 2007. Apresenta informações sobre a entidade, os países, publicações, dados e estatísticas, programas e projetos. Disponível em: <http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 20 jul. 2005.

OUWEHAND, A. C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**. Amsterdan, v.9, n. 1, p.43-52, 1999.

OYOFO, B. A. et. al. Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, Champaign, US, v. 68, n. 10, p. 351-1356, 1989.

PARKER, D. S. Manipulation of the funtional activity of thegut by dietary and other means (antibiotics/probiotics) in ruminants. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.120, n. 6, p. 639-648, 1990.

PASCUAL, D. W.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R. The enteric nervous and immune system: interactions for mucosal immunity and inflammation. **Immunomethods**, Orlando, v. 5, n. 1, p. 56–72, aug. 1994.

PORTER, P.; BARRAT, M. E. I. In: HERENSIGN, W., COLE, D.J.A. **Recents advances in animal nutrition**. London: Butterworth, 1987. p.107-116. 1987.

QUELLETTE, A.; SANDLER, D. Medicina: estudo acha célula antibiótica do intestino. **Folha de S. Paulo**, São Paulo, 18 ago. 2000. Ciência. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/fsp/ciencia/fe1808200001.htm>>. Acesso em: 11 out. 2007.

RASTALL, R. A. et. al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: a overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, NL, v. 52, n. 2, p. 145-125, apr. 2005.

REGMI, A.; GELTHAR, M. Consumer preference and concerns shape global food trade. **Food Review**, v. 24, n 3, p. 2-8, Sept.-dec., 2001.

RIBEIRO, P. R. **Efeitos da adição de diferentes níveis de ácido fumárico na ração de suínos, sobre o desempenho e morfologia duodenal**. 1996 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, 1996.

RICHTER, K. P. Moléstias do intestino grosso. In: ETTINGER, S. J. (Ed), **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. São Paulo; Manole, 1992, p.1462-1486, 1992.

RODRIGUES, M. A. M. **Resposta imune e modificações morfológicas de vilosidades intestinais de leitões suplementados com probióticos**. 2002. 96 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para suínos e aves: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.

SAKATA, S. et al. Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to Bifidobacterium species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 243, n. 2, p. 417-423, feb. 2005.

SALMINEN, S. J. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, Amsterdam, 2002. **Proceedings ...** November, 2002.

SALMINEN, S. J.; DEIGHTON, M.; GORBACH, S. Lactic acid bacteria in health and disease. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V. (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 199-205.

SANTOS JUNIOR, A. A. et. al. Reduction of Intestinal Salmonella spp. Colonization in turkeys by dietary wheat, triticale and enzyme supplementation. In: ANNUAL MEETING OF THE SOUTHERN POULTRY SCIENCE SOCIETY, 25., 2005, Atlanta. **Proceeding ...** Atlanta: [s.n.], 2005.

SAUBER, T. E.; STAHL, T. S.; NONNECKE, B. J. Effect of level of chronic immune system action on the lactational performance of sows. **Journal of Animal Science**, Savoy, IL, v.77, n.8, p.1985-1993, 1999.

Schiffrin EJ, Blum S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. **Eur J Clin Nutr** 2002;56(Suppl 3):S60-S64.

SHURSON, J.; JOHNSTON, I. Swine nutrition and health connections. In ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 25., 1998, St Paul. **Proceedings...**St. Paul: University of Minnesota, 1998. p. 77-95.

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.

SISSONS, J. W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals – a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.49, n.1, p.1-13, 1989.

SMEETERS-PEETERS, M. et al. A review of the physiology of the canine digestive tract related to the development of in vitro systems. **Nutrition Research Review**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 45-69, 1988.

SMINK, W. Oregano oil boost. **Pig Progress**, Doetinchem, v. 19 , n. 3, p. 24-26 , 2003.

SOTO, W. L. C. **Digestibilidade da levedura desidratada e efeitos da sua utilização sobre a morfologia intestinal atividade das enzimas digestivas e desempenho de suínos.** 1999. 82 p.. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal,1999.

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

STAHL, T. Immune system activation affects pig growth, nutrients needs. **Feedstuffs**, Minnetonka, v.24, p. 12-13, oct. 1994.

STANISZ, A. M.; BEFUS, D. ; BIENENSTOCK, J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 136, n. 1, p. 152–156, 1986.

STATISTICA. Tulsa: StatSoft, 2007. Disponível em < <http://www.statsoft.com/v7.htm> >. Acesso em: 10 nov. 2005.

STOKES, C. R.; BAILEY, M.; HABERSON, K. Development and function of the pig G.I. immune system. In: LINDBERG, J. E.; OGLE, B. (Ed.). **Digestive physiology of pigs.** Wallingford: CAB Publishing, 2001. p..59-66.

SWANSON, K. S. Prebiotics and probiotics: impact on gut microbial populations, nutrient digestibilities, fecal protein catabolite concentrations and immune functions of humans and dogs. **Dissertation Abstract International**, Ann Arbor, Mich., US, v. 63, p. 746, 2002.

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

Tannock GW. New perceptions of the gut microbiota: implications on future research. **Gastroenterol Clin North Am** 2005;34:361-82.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology**: an introduction. 6. ed. Philadelphia: Saunders Press, 2000. 289 p.

UTIYAMA, C. E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extrato de vegetais como promotores de crescimento de leitões recém-desmamados**. 2004. 94 f. Tese (Doutorado em agronomia) --Escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz" USP, Piracicaba, 2004.

VAN HEUTGEN, E.; SPEARS, J. W.; COFFEY, M.T. The effect of dietary protein on performance and immune response in weaning pigs subjected to an inflammatory challenge. **Journal Animal Science**, Savoy, IL, v.72, n. 10, p. 2661-2669, 1994.

VANBELLE, M.; TELLER, E; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, Berlim, v. 40, n. 7, p.543-567,1990.

VANDERHOOF J. A.; YOUNG, R. J. Current and potential uses of probiotics. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 93, p. 33-37, 2004. Supplement 3.

WALDEMARIN, K. C. A. ; BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. **Real-Time Imaging**, London, v10, n.4, p.197-204, 2004.

YAMASHIRO, Y. et al. Biotherapeutic and nutraceutical agents: working group report of the second world congress of pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 39, p. S596-S600, jun. 2004.

YAZAWA, K.; TAMURA, Z. Search for sugar sources for selective increase of bifidobacteria. **Bifidobacteria Microflora**, v.1, n. 1, p.39-44, 1982.

YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Intestinal immune response to coccidiosis. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 24, n. 2-3, p. 303-324, 2000.