



JÉSSICA RESENDE SOUZA

**INCLUSÃO DE DIFERENTES FONTES DE β -GLUCANO NA
ALIMENTAÇÃO DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS**

LAVRAS – MG

2019

JÉSSICA RESENDE SOUZA

**INCLUSÃO DE DIFERENTES FONTES DE β -GLUCANO NA
ALIMENTAÇÃO DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
Orientador

Prof. Dr. Diego Cunha Zied
Coorientador

**LAVRAS – MG
2019**

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

Souza, Jéssica Resende.

Inclusão de diferentes fontes de β -glucano na alimentação de leitões recém-desmamados / Jéssica Resende Souza. - 2019.

56 p.

Orientador(a): Eustáquio Souza Dias.

Coorientador(a): Diego Cunha Zied.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. β -glucano. 2. Leitões. 3. Desmame. I. Dias, Eustáquio Souza. II. Zied, Diego Cunha. III. Título.

JÉSSICA RESENDE SOUZA

**INCLUSÃO DE DIFERENTES FONTES DE β -GLUCANO NA
ALIMENTAÇÃO DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS**

**INCLUSION OF DIFFERENT β -GLUCANS SOURCES IN FEED OF
WEANING PIGLETS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de abril de 2019

Profa. Dra. Ana Paula Peconick UFLA

Prof. Dr. Leonardo de Figueiredo Vilela FCM/TR

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

Aos meus pais Magna e Toninho, meu maior exemplo de perseverança e fé, à minha segunda mãe, Tia Martha, a todos que acreditaram no meu potencial, mas principalmente aos que acreditaram ser impossível mais uma conquista.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado cada passo até a conclusão de mais uma etapa, renovando minhas forças e me fazendo acreditar que valeria a pena.

Aos meus pais Antônio e Magna que nunca mediram esforços para me impulsionar na profissão que escolhi e pela criação que me deram, criação esta que me ensinou a lutar honestamente pelos meus objetivos, me preparando para todos os desafios que enfrentei até aqui. Agradeço às minhas tias Martha e Diva, pela sorte de tê-las como duas outras mães que mesmo distantes acompanharam e torceram por todas as minhas conquistas desde sempre.

Sou grata ao meu namorado Breno pela cumplicidade, por todo cuidado e apoio nos momentos de dificuldade e por ser um grande incentivador da minha carreira.

Ao meu orientador, Prof. Eustáquio, pelo aprendizado e confiança no meu trabalho. Ao Prof. Vinícius Cantarelli por ter comprado e incentivado a ideia deste projeto viabilizando sua realização junto ao Departamento de Zootecnia da UFLA.

Aos amigos do Biofungi: ao técnico Paulinho e a todos os colegas de laboratório em especial Tati, Aline, Lídia e Cibelli pelo apoio e momentos de boas risadas. Aos amigos da Microbiologia Agrícola Suelen, Ana, Paulo, Maysa, companheiros de Mestrado e pra vida toda. Ao Dr. Leonardo e Jamily, pelos bons conselhos e carinho.

Aos membros do Núcleo de Estudos em Suinocultura (NESUI) que me ajudaram no período experimental e têm hoje minha grata amizade, em especial Joana, Maíra, Rhuan e Daniel, além das amigadas que fiz pelos laboratórios ao longo das análises, Cris e Paulinha, gratidão pela amizade e boa vontade. Aos irmãos que a vida me apresentou durante o mestrado, Jéssica e Silas, essenciais a esta conquista.

À minha segunda família, a República Pira Saia, que me acolheu de volta durante o início do Mestrado, vocês sempre serão uma das melhores partes desta história.

Aos membros da banca examinadora, que gentilmente aceitaram o meu convite.

À Universidade Federal de Lavras, aos Departamentos de Biologia, Zootecnia e Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Gratidão!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

RESUMO

Os β -glucanos têm sido explorados na alimentação de leitões recém-desmamados, especialmente pelo seu potencial imunomodulador, a fim de amenizar os efeitos do estresse pós-desmame sobre o desempenho dos animais. O objetivo deste estudo foi investigar o desempenho e a saúde intestinal de 84 leitões desmamados aos 21 dias, desafiados com *E. coli* K88⁺ e suplementados durante 21 dias com diferentes fontes de β -glucano, divididas em 5 tratamentos: Macrogard® contendo 0,07% (T1) ou 0,035% (T2) de β -glucano de *S.cerevisiae*; 0,07% de β -glucano de cogumelo *Pleurotus ostreatus* puro (T3); 0,07% de β -glucano de substrato pós-cultivo de *Pleurotus ostreatus* (T4) e além de dieta basal sem adição de β -glucano (T5). Foram avaliadas variáveis de desempenho como consumo de ração diário (CRD), ganho de peso diário (GPD) e conversão alimentar (CA) através da pesagem dos animais, da ração fornecida diariamente bem como suas sobras. A incidência de diarreia foi avaliada diariamente duas vezes ao dia e amostras de sangue foram coletadas de um animal por baia para realização de leucograma e quantificação das citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10). Aos 21 dias do experimento, um animal por baia foi abatido e segmentos do íleo e jejuno coletados para avaliação da morfologia intestinal. Houve um maior CRD nos grupos suplementados com β -glucano no período pós-inoculação (14 a 21 dias) e pelo grupo T4 ao longo de todo experimento. De 14 a 21 dias a CA foi pior em todos os tratamentos com β -glucano quando comparados ao controle (T5). Não houve diferença significativa na incidência de diarreia ou morfologia intestinal entre os tratamentos. Não houve alterações no leucograma fora dos valores de referência. Em relação às citocinas, os tratamentos não diferiram quanto aos níveis da anti-inflamatória IL-10, enquanto a pró-inflamatória TNF- α foi significativamente inibida por T2 quando comparado ao controle. Concluiu-se que, entre as diferentes fontes, apenas o β -glucano de *S. cerevisiae* do produto Macrogard® em sua menor dose apresentou ação imunomoduladora significativamente maior quando comparado ao controle (T5) o que implicou, em uma pior conversão alimentar a curto prazo. Já o β -glucano do composto pós-cultivo de *P.ostreatus* (T4), apesar de não ter incrementado o GPD, estimulou um consumo maior durante todo o experimento, mostrando-se uma alternativa para indução do consumo de ração nas primeiras semanas críticas de desmame.

Palavras chave: Desempenho, resposta imune, β -glucano, desmame.

ABSTRACT

β -glucans have been exploited in the feeding of recently weaned piglets especially for their immunomodulatory potential, in order to mitigate the effects of post-weaning stress on the performance of animals. The aim of this study was to investigate the performance and intestinal health of 84 weaned piglets at 21 days, challenged with *E. coli* K88⁺ and supplemented during 21 days with different sources of β -glucan divided into five treatments: Macrogard® containing 0,07% (T1) or 0,035% (T2) of *S.cerevisiae* β -glucan; 0,07% β -glucan of pure *Pleurotus ostreatus* mushroom (T3); 0,07% β -glucan of post-culture substrate of *Pleurotus ostreatus* (T4) and a basal diet without addition of β -glucan (T5). Daily ration consumption (CRD), daily weight gain (GPG) and feed conversion (CA) were evaluated by weighing the animals, daily ration as well as their leftovers. The incidence of diarrhea was assessed daily twice daily and blood samples were collected from one animal per well for leukogram and quantification of cytokines as tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 10 (IL-10). At 21 days of trial, a animal per pen was slaughtered and ileum and jejunum segments were collected for evaluation of intestinal morphology. There was a CRD in the groups supplemented with β -glucan in the post-inoculation period (14 to 21 days) and throughout the experiment by T4. From 14 to 21 days the CA was worse in all treatments with β -glucan when compared to the control (T5). There was no significant difference in the incidence of diarrhea or intestinal morphology between treatments. There were no changes in the leukogram outside the reference values. Regarding the cytokines, the treatments did not differ as to the levels of the anti-inflammatory IL-10, whereas the pro-inflammatory TNF- α was significantly inhibited by T2 when compared to the control. As a conclusion, among the different sources, only the β -glucan of *S.cerevisiae* of the Macrogard® product in its lower dose presented a significantly higher immunomodulatory action when compared to the control (T5), which implied, a worse short-term feed conversion . However, β -glucan from spent mushroom substrate of *P.ostreatus* (T4), despite not increasing GPD, stimulated a higher consumption during the whole experiment, showing whether an alternative for induction of feed consumption in the first critical weeks of post- weaning.

Keywords: Performance, immune response, β -glucan, weaning.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal e valores nutricionais das dietas utilizadas nas diferentes fases do experimento:	38
Tabela 2 - Nível de inclusão de diferentes β -glucanos por tratamento:	42
Tabela 3 - Efeito das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia em leitões alimentados com diferentes fontes de β -glucanos desafiados com <i>E. coli</i> K88 ⁺ *	42
Tabela 4 - Efeito das dietas experimentais sobre o peso, ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD) e conversão alimentar (CA) em leitões alimentados com diferentes fontes de β -glucanos desafiados com <i>E. coli</i> K88 ⁺	43
Tabela 5 - Efeito das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia em leitões alimentados com diferentes fontes de β -glucanos desafiados com <i>E. coli</i> K88 ⁺ *.	44
Tabela 6 - Efeito das dietas experimentais sobre a altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta (v:c), em μ m, em leitões desafiados <i>E. coli</i> K88 ⁺	45
Tabela 7 - Comportamento dos níveis de citocinas TNF- α (pró inflamatória) e IL-10 (anti-inflamatória) (pg/ml) ao longo do tempo e entre os tratamentos:	45

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Desafios do período pós-desmame para o leitão	12
2.2 Resposta imune no período pós-desmame	14
2.3 β-glucanos	17
2.3.1 Fontes de β-glucanos	18
2.3.2 Potencial imunomodulador dos β-glucanos	20
2.3.3 Utilização de β-glucanos na produção de suínos	22
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	25
REFERÊNCIAS	26
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
3 RESULTADOS	42
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO 1	55

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Após a restrição do uso de vários antibióticos e aditivos na produção animal como promotores de crescimento, tornou-se indispensável a busca por alternativas ao uso de antibióticos, não só no tratamento de infecções, mas principalmente, como melhoradores de desempenho. Sob este aspecto, têm se destacado os aditivos alimentares com ação moduladora sobre as defesas naturais do hospedeiro contra a colonização de patógenos, cuja inclusão na dieta visa melhorar a saúde intestinal e consequentemente o desempenho dos animais de produção.

Em se tratando da produção de suínos, o uso de aditivos faz-se especialmente necessário em fases críticas da produção como o pós-desmame. Neste período vários fatores de estresse como a separação da mãe, a mudança brusca da dieta e do ambiente bem como a exposição dos leitões a microrganismos estranhos podem ter implicações diretas nos parâmetros de desempenho a curto e longo prazo podendo gerar prejuízos ao suinocultor.

Os β -glucanos são polissacarídeos que compõem a parede celular de fungos filamentosos, leveduras, algas e cereais que têm sido explorados na produção animal. O reconhecimento desses polissacarídeos principalmente por células do sistema imune inato de mamíferos pode gerar respostas capazes de melhorar as barreiras naturais de defesa do animal promovendo proteção principalmente contra efeitos dos desafios durante a produção comercial, principalmente as infecções por patógenos intestinais.

Leveduras como *Sacharomyces cerevisiae* são uma das fontes mais comuns de β -glucanos disponíveis comercialmente, dada sua disponibilidade em resíduos de cervejaria e possibilidade de produção por fermentação em escala industrial. Entretanto, cogumelos comestíveis como *Pleurotus ostreatus* (shimeji) também apresentam β -glucanos na composição da sua parede representando uma fonte em alternativa desses polissacarídeos. Além do cogumelo propriamente dito, o resíduo da sua produção, o chamado composto pós-cultivo de cogumelo ou SMS (do inglês *spent mushroom substrate*) uma vez colonizado pelo fungo também se apresenta como uma fonte de β -glucano de baixo custo, uma vez que é descartado após encerrado o ciclo produtivo do cogumelo.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes de β -glucano sobre o desempenho e a saúde intestinal de leitões durante o período pós-desmame, no intuito de comparar o potencial imunomodulador de produtos comerciais com fontes alternativas do polissacarídeo bem como suas implicações sobre o crescimento dos animais durante uma das fases mais críticas da produção de suínos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Desafios do período pós-desmame para o leitão

O desmame é um processo caracterizado por complexas mudanças e fatores de estresse para o leitão. A separação precoce da mãe implica na interrupção abrupta da ingestão de leite e início de uma dieta sólida além de desafios ambientais, como o contato com possíveis patógenos e a necessidade do estabelecimento de hierarquia a partir do contato com animais provenientes de outras leitegadas nas criações comerciais (CAMPBELL, CRENSHAW E POLO, 2013) Em granjas comerciais o leitão é separado da mãe precocemente entre 3 a 4 semanas de vida, enquanto o desmame natural ocorreria por volta de 9 e 12 semanas (COLLINS et al., 2017), o que torna o processo por si só fator de stress e, conseqüentemente, um desafio para o animal.

Já a mudança na dieta é um dos eventos mais importantes do desmame. Isso porque o leitão precisa adaptar-se abruptamente a uma dieta seca, sólida, com menor digestibilidade e palatabilidade quando comparada ao leite que até então recebia da mãe. Como consequência, há uma queda brusca no consumo de ração nos primeiros dias após o desmame o que influencia negativamente seu desempenho (DIVIDICH, LE E SÈVE, 2000). O baixo consumo e por conseguinte baixo ganho de peso neste período têm impactos significativos sobre parâmetros de desempenho não só na creche mas durante toda a vida do suíno (COLLINS et al., 2017).

Existe ainda uma relação causal entre a redução do consumo de ração nos primeiros dias após o desmame e alterações morfológicas no intestino (AL MASRI et al., 2014). Considerando que boa parte da digestão enzimática e absorção de componentes da dieta ocorre em torno das vilosidades e criptas intestinais, a típica ocorrência de atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas durante o pós-desmame levam à uma diminuição temporária na capacidade digestiva e absorptiva de nutrientes,

prejudicando o desempenho dos leitões nesta fase (KITZ, MILLER e LEWIS, 2001; TSUKAHARA et al., 2013). O resultado são leitões recém-desmamados apresentando uma relação vilosidade: cripta significativamente menor que leitões lactentes (PLUSKE, HAMPSON e WILLIAMS, 1997).

Outro desafio do período pós-desmame é a adequação do perfil de enzimas intestinais à nova composição da dieta. Como consequência do encurtamento das vilosidades, ocorre uma redução na secreção e atividade de enzimas (lactase, sacarase e maltase) da borda em escova dos enterócitos imaturos de leitões recém-desmamados (MARION et al., 2005) bem como de proteases pancreáticas como tripsina e quimotripsina (HEDEMANN e JENSEN, 2004). Comprometendo a capacidade de digestão e absorção do leite, essas alterações enzimáticas podem gerar acúmulo de nutrientes não digeridos, promovendo no intestino a fermentação e proliferação de bactérias patogênicas causadoras de diarreia (TACTACAN et al., 2016).

A chamada síndrome da diarreia pós-desmame (SDPD) é caracterizada pela redução no número de bactérias comensais benéficas no intestino, principalmente as produtoras de ácido láctico do gênero *Lactobacillus*, o que aumenta o pH intestinal e favorece o crescimento de cepas patogênicas como *E. coli* enterotoxigênica (KIM et al., 2012; KONSTANTINOV et al., 2006; LALLÈS et al., 2007). As mudanças na estrutura do intestino e o comprometimento da barreira intestinal decorrentes do baixo consumo nos primeiros dias após o desmame facilitam ainda mais a adesão de patógenos (PIÉ et al., 2004).

Os efeitos do desmame também podem ser observados a nível molecular. Estudos relatam um aumento da expressão de genes que promovem estresse oxidativo e a resposta pró-inflamatória, ao mesmo tempo em que uma diminuição da expressão de genes relacionados à utilização de nutrientes e proliferação celular no intestino delgado de leitões é observada (WANG et al., 2008) reforçando o quão desafiador é manter a integridade intestinal e, conseqüentemente, uma efetiva absorção de nutrientes após a mudança da dieta neste período.

Existe, portanto, um amplo interesse em desenvolver estratégias de manejo e alimentação para estimular o desenvolvimento e a saúde intestinal em leitões recém-desmamados, a fim de melhorar indicadores de desempenho e, ao mesmo tempo,

minimizar o uso de antibióticos na prevenção e controle das diarreias pós-desmame (LANGE, de et al., 2010).

Com o objetivo de amenizar os desafios do período pós-desmame, diversos aditivos alimentares têm sido avaliados sob diferentes perspectivas de atuação sobre a utilização e metabolismo intestinal de nutrientes pelo leitão. Entre os potenciais explorados destacam-se a melhoria da resposta imune promovida principalmente por β -glucanos derivados de fungos (JIANG et al., 2015) bem como a estimulação da microbiota benéfica intestinal e consequente redução de patógenos intestinais por probióticos (DLAMINI et al., 2017) e prebióticos (VALPOTIĆ et al., 2018).

2.2 Resposta imune no período pós-desmame

A primeira linha de defesa do suíno contra microrganismos patogênicos, toxinas e antígenos presentes no intestino é a chamada “barreira intestinal” que apresenta componentes físicos, enzimáticos e imunológicos. A começar pela barreira física, esta é composta por uma camada contínua de células epiteliais interligadas por *tigh junction* e apresenta uma permeabilidade seletiva tanto transcelular quanto paracelular (SÖDERHOLM; PERDUE, 2001), de maneira a prevenir a transmigração de substâncias patogênicas como bactérias e toxinas do ambiente externo (lúmen) para a circulação (FUKATSU et al., 2011).

Entre as consequências associadas ao desmame está a indução de efeitos deletérios à estrutura física da barreira física intestinal. As células que formam a camada epitelial do intestino são dinâmicas, de maneira que aquelas encontradas na cripta são imaturas e se tornam cada vez mais diferenciadas à medida que se deslocam no sentido apical da vilosidade. A partir da transição cripta-vilosidade, até o topo da vilosidade, encontram-se apenas células maduras e diferenciadas (GU et al., 2001). Este *turn over* ocorre constantemente e, em condições normais, a renovação celular ocorre de uma forma ordenada aproximadamente a cada 5 ou 7 dias (FUKATSU et al., 2011) ao passo que, durante o desmame, a brusca transição alimentar e alteração da ingestão oral tende a comprometer a recuperação da camada epitelial, retornando aos níveis normais pré-desmame somente por volta de 14 dias (HU et al, 2013).

Além da camada células, sob as condições de grave estresse e alterações no consumo de alimento, como ocorre no desmame, são observadas reduções na camada de mucina, uma camada de microproteínas que reveste a mucosa, composta por elevadas concentrações de defensinas e outras moléculas antibacterianas tais como lactoferrina, lisozimas, entre outras, as quais, uma vez reduzidas aumentam a permeabilidade da mucosa tornando-a vulnerável à invasão bacteriana (FUKATSU et al., 2011) e, conseqüentemente à ocorrência de diarreia causando redução no desempenho dos animais (CAMPBELL, CRENSHAW E POLO, 2013).

Diferente do nascimento, o desafio antigênico ao desmame ocorre quando a imunidade de mucosa já se desenvolveu a ponto de produzir resposta imune ativa e quando os componentes imunorreguladores e imunoprotetores provenientes do leite materno já foram perdidos. A prova de que há uma imunidade ativa logo após o desmame, é que anticorpos contra proteínas provenientes da alimentação já podem ser detectadas nesta fase. Após algum tempo, porém, alguma forma de tolerância à proteínas da dieta consegue ser atingida por leitões (MILLER et al. 1994; BAILEY et al., 2004).

Além dos componentes físicos, o componente imunológico da barreira intestinal de leitões é representado pelo tecido linfóide associado ao intestino (GALT, do inglês *gut-associated lymphoid tissue*) constituído por árias células do sistema imunológico distribuídas pela lâmina própria, pelo epitélio e por tecidos linfáticos organizados, tais como linfonodos mesentéricos, folículos linfóides isolados além das placas de Peyer (PP's) localizadas através da mucosa e submucosa do intestino delgado, as quais agem como os sítios de indução da imunidade intestinal (FAN et al., 2009).

Na mucosa intestinal normal, principalmente na lâmina própria e PP, existe uma grande população de macrófagos e células dendríticas, os quais são a principal população de células apresentadoras de antígenos capazes de determinar o tipo de resposta celular mediadas por células T para antígenos luminiais. (KUCHARZIK et al., 2001). Os neutrófilos compõem juntamente com os macrófagos, uma das primeiras linhas de defesa do organismo enquanto células fagocíticas responsáveis pela internalização de partículas estranhas ou antígenos do lúmen intestinal, liberando citocinas e ativando outras células imunes para seu combate e eliminação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012)

A função de barreira intestinal é influenciada ainda pela regulação de citocinas inflamatórias principalmente durante o período pós-desmame. O aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), por exemplo, ocorre especialmente na primeira semana do processo de desmame (PIÈ et al 2004). Produzidas por macrófagos que se tornam inflamatórios a partir do estímulo de moléculas associadas a patógenos (PAMP's) ou danos teciduais (DAMP's) comuns no desmame, a citocina IL-6 atua no fígado induzindo a produção de proteínas séricas de defesa enquanto IL-1 e TNF- α apresentam efeito quimiotático sobre outros monócitos e neutrófilos. Uma vez na circulação, IL-1 e TNF- α alcançam receptores no hipotálamo induzindo hipertermia, redução do apetite e sonolência de maneira que o animal poupe energia para a resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Al-Sadi et al., (2009) e Hu et al., (2013) relatam ainda que o aumento da expressão de TNF- α e IL-6 não necessariamente ocorre em resposta a infecções durante o desmame, mas o stress do processo em si já induz o aumento das citocinas neste período (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Desta forma, a integridade e a função da barreira intestinal podem ser negativamente afetadas pela superprodução de citocinas pró-inflamatórias durante o desmame (LIU et al., 2008). Alguns estudos têm relatado que altas concentrações de TNF- α podem agir sinergicamente com Interferon- γ (INF- γ) reduzindo a função da barreira epitelial do intestino pela capacidade que estas citocinas têm de reduzir a expressão das chamadas *tigh junction*, proteínas que formam uma complexa junção apical entre as células do epitélio do intestino sendo as principais reguladoras da permeabilidade intestinal. Por outro lado, o TGF- β e IL-10 são citocinas anti-inflamatórias que podem atenuar efeitos deletérios à permeabilidade intestinal, com atuações no reparo do epitélio pela indução do aumento da migração celular epitelial e diminuição da permeabilidade epitelial paracelular (LIU et al., 2008; BLIKSLAGER et al., 2007).

Tudo indica que essa fase da vida do leitão está associada à expressão de genes codificadores de citocinas inflamatórias importantes, mas cuja super expressão pode contribuir para distúrbios que implicam em consequências negativas ao desempenho (PIÈ et al., 2004). Portanto, a redução ou mitigação do estresse pós-desmame bem como

seus efeitos subsequentes sobre a estrutura intestinal e ativação da resposta imune inflamatória é fundamental para melhorar o desempenho do leitão nesta fase.

2.3 β -glucanos

Os β -glucanos são um grupo heterogêneo de polissacarídeos naturais, compostos por monômeros de glicose ligados entre si por ligações β -glicosídicas. São encontrados como elementos estruturais importantes da parede celular ou como forma de armazenamento de energia em bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas e plantas, sendo ausentes em tecidos de vertebrados e invertebrados (STIER, 2014).

As pesquisas sobre os β -glucanos iniciaram-se nos anos 1960 e 1970 sob duas linhas de investigação. A primeira ocorreu principalmente nos Estados Unidos e na Europa enquanto a segunda começou na Ásia, principalmente no Japão. No meio euro-americano a pesquisa foi baseada no conhecimento dos efeitos imunomoduladores do *Zymosan*, uma mistura de polissacarídeos isolados das paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* cujo β -glucano foi identificado como o componente primário do seu efeito imunomodulador. Já na Ásia, em estudos sobre os efeitos biológicos dos tradicionalmente consumidos cogumelos medicinais, os β -glucanos foram novamente consideradas como uma das principais causas da imunomodulação observada (NOVAK e VETVICKA, 2008).

A compreensão da estrutura dos β -glucanos de diferentes origens é de grande importância uma vez que as diferentes propriedades bioativas destes polissacarídeos parecem depender principalmente da sua estrutura química primária, que varia de acordo com tipo de ligação entre as unidades de D-glicose da cadeia principal e, pelo grau e tipo de ramificações que se conectam a essa cadeia (STIER, 2014; BROWN e GORDON, 2001).

De maneira geral, os β -glucanos exibem um esqueleto principal uniformemente construído por ligações $\beta(1,3)$ com cadeias laterais de D-glicose ligadas por ramificações $\beta(1,4)$ ou $\beta(1,6)$ de vários comprimentos (STIER, 2014). Sugere-se que o número de resíduos de glicose das cadeias laterais da estrutura do β -glucano bem como seu grau de polimerização podem influenciar na solubilidade desses polímeros enquanto a solubilidade, por sua vez, pode influenciar no reconhecimento dos β -glucanos pelos

receptores celulares específicos e, portanto, na sua atividade biológica (TOKUNAKA et al., 2002).

Além da estrutura química e conseqüentemente a solubilidade, o peso molecular dos β -glucanos também parece influenciar na sua bioatividade. Estudos *in vitro* sugerem que β -glucanos de grande peso molecular, como os obtidos de fungos podem ativar diretamente os leucócitos. Já os β -glucanos intermediários possuem atividade biológica *in vivo*, mas seus efeitos celulares são menos claros, enquanto β -glucanos muito curtos são geralmente considerados inativos (AKRAMIENÉ et al., 2007).

2.3.1 Fontes de β -glucanos

Os β -glucanos presentes em cereais apresentam ramificações laterais do tipo β -1,4 e, aparentemente, não exibem efeitos imunomodulatórios (BOHN; BEMILLER, 1995). Sua baixa solubilidade em água permite que, a partir da administração oral, esse grupo de glucanos passe pelo trato digestivo intacto ou seja quebrado e fermentado por espécies de bactérias do cólon. Assim, exercem um efeito prebiótico ao estimularem o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas que residem no trato digestivo (NELSON et al., 2012; SNART et al., 2006).

Por outro lado, os β -glucanos derivados da parede de fungos e leveduras, apresentam cadeias laterais do tipo β -1,6 e são conhecidos pela sua capacidade de estimular células do sistema imune (BOHN; BEMILLER, 1995). Embora os modelos da parede celular fúngica difiram um pouco, eles concordam que o β -glucano não está localizado na superfície da parede, mas está mais ou menos imerso no material que a compõe (NOVAK e VETVICKA, 2008).

Tradicionalmente, os β -glucanos fúngicos são considerados estimuladores da imunidade celular, via ativação de células de defesa, especialmente macrófagos e neutrófilos. Essa ativação inclui a quimiotaxia de outras células imunes, o aumento da atividade fagocítica em si bem como de eventos intracelulares como a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres característicos da explosão respiratória decorrente da fagocitose de células invasoras, além da secreção de citocinas desencadeando efeitos sistêmicos (VETVICKA, 2011).

A parede celular de leveduras *S. cerevisiae*, por exemplo, tem os elementos de sua parede distribuídos em três camadas: uma camada interior de β -1,3 glucano insolúvel (30-35%) com menor quantidade de ligações β (1-6), uma camada média de β -1,3 glucano solúvel (20-22%) com maior quantidade de ligações β -1,6 e a camada externa composta por glicoproteínas e mananoproteínas (30%) (AKRAMIENÉ et al., 2007). Estruturalmente, essa parede é formada por uma espécie de armadura de fibrilas de β -1,3 glucano insolúvel em álcali, mergulhada em manoproteínas, e uma pequena quantidade de quitina nas cicatrizes de brotamento (STRATFORD, 1994).

Já a parede celular de fungos filamentosos como os cogumelos (basidiomicetos), é construída de maneira semelhante às leveduras (SELITRENNIKOFF, 2001; STRATFORD, 1994); diferindo-se apenas pela maior proporção de quitina (10 a 20%) (BOWMAN e FREE, 2006), pela presença de α -1,3-D-glucano, podendo variar ainda a proporção e comprimento das ramificações β -1,6 ligadas às cadeias de β -1,3 glucanos (BAO et al., 2002; DONG et al., 2002).

No caso das leveduras, os β -glucanos tem sido utilizadas sob diferentes apresentações em sua forma purificada (VETVICKA e OLIVEIRA, 2014; ZHOU et al., 2013), na forma de extrato de levedura que pode conter além dos β -glucanos outros componentes da parede fúngica (LI et al., 2006) além dos chamados produtos de leveduras, que podem ser um composto de paredes inteiras do fungo (YANG et al., 2016).

Da mesma forma, os β -glucanos de basidiomicetos tem sido estudadas tanto na sua forma purificada (MINOV et al., 2017) quanto de extratos (JEDINAK et al., 2011) ou mesmo o cogumelo em sua forma integral (CHAN et al., 2015; YU et al., 2009), principalmente quanto às suas propriedades imunomoduladoras. O β -glucano de basidiomicetos pode ser encontrado ainda no resíduo da produção destes fungos (PARK et al., 2012), o chamado composto pós-cultivo de cogumelos (SMS, do inglês, *spent mushroom substrate*) uma vez que, mesmo após o fim do processo produtivo, o substrato utilizado para seu crescimento encontra-se intensamente colonizado pelo micélio fúngico (MIZUNO et al., 1998).

Não menos importantes, mas de uso e estudo menos comuns, os β -glucanos também podem ser isoladas de algas marinhas destacando-se estudos com a laminarana (β -glucanos de *Laminaria* sp.) essencialmente composta por um esqueleto linear de β -

1,3 glucano com ramificações β -1,6 (BROWN e GORDON, 2005; SWEENEY et al., 2012). Estrutura parecida é encontrada ainda em β -glucanos da parede celular de bactérias como *Alcaligenes faecalis* também com propriedades imunomoduladoras (CAMILLI et al., 2018).

2.3.2 Potencial imunomodulador dos β -glucanos

Uma vez que não são componentes do organismo de mamíferos, os β -glucanos podem ser reconhecidos como padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP's) pelo sistema imune inato (BAERT et al., 2015), estimulando a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS's) em fagócitos para morte microbiana, além da produção de citocinas pró-inflamatórias melhorando de maneira inespecífica a resposta imune (VETVICKA, 2011).

Quando administrados via oral os β -glucanos tendem a interagir com células de defesa presentes nas placas de Peyer além de linfócitos presentes no espaço intraepitelial do intestino (VOLMAN et al. 2008). Estudos têm mostrado que uma quantidade muito baixa da β -glucano administrado via oral é absorvida, sugerindo que sua ação primária esteja em células de defesa presentes no intestino e os resultados secundários sejam efeito dessa interação (SANDIVICK et al., 2007). Os receptores Dectina-1, C3 do sistema complemento (CR3) e TLR-2/6 têm sido sugeridos como os principais receptores que medeiam a interação dos β -glucanos com células do sistema imune inato, principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (GANTNER et al., 2003; BROWN et al 2003).

Os TLR's (do inglês *toll like receptor's*) são uma família de 10 receptores de reconhecimento do sistema imune inato envolvidos na detecção de uma ampla gama de produtos microbianos (UNDERHILL e OZINSKY, 2002). Especialmente TLR-2 e TLR-6 parecem ser recrutados no reconhecimento de β -glucanos e são necessários para ativação de fatores nucleares de transcrição como κ B (NF- κ B) envolvido na produção de citocinas inflamatórias, entre elas TNF- α . McCan et al., (2005) descreve ainda que ao se ligar a receptores TLR-2 em macrófagos de camundongos, o estímulo que os β -glucanos geram sobre a via de NF- κ B e consequentemente sobre a produção de

citocinas, não depende necessariamente da sua fagocitose, mas apenas do seu reconhecimento e interação com o receptor.

Além dos TLR's, fontes de β -glucanos parecem ser diretamente reconhecidas também por receptores lectina do tipo C (receptores reconhecedores de carboidratos de maneira Ca^{++} dependente) como a Dectina-1. Identificado em macrófagos e células dendríticas, o receptor Dectina-1 parece atuar de maneira cooperativa com TLR-2 no reconhecimento das partículas fúngicas e nas respostas geradas. Enquanto a indução da produção de ROS contra microrganismos por Dectina-1 parece ser aumentada pela sinalização de TLR-2, a ligação do β glucano ao Dectina-1 parece aumentar as respostas geradas por TLR-2 tais como a geração de sinais intracelulares que medeiam a fagocitose e a ativação de fatores de transcrição (NF-kB) de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-12 (GANTNER et al., 2003).

Ainda sobre o receptor Dectina-1, o reconhecimento e fagocitose dos β -glucanos pode diferir entre os diferentes tipos de células onde ele é expresso. Segundo estudos feitos por McCan et al., (2005) enquanto a fagocitose de β -glucanos por macrófagos de camundongos parece ser completamente dependente da presença de Dectina-1, em células dendríticas em que o receptor de Dectina-1 foi experimentalmente bloqueado a fagocitose de β -glucanos foi apenas parcialmente inibida, sugerindo que no segundo tipo de célula investigada, outros receptores estão envolvidos no reconhecimento destes polissacarídeos

Já o receptor do sistema complemento C3 (CR3), reconhece um grande número de ligantes, entre eles os β -glucanos (ROSS et al., 1999). Expresso em neutrófilos, fagócitos mononucleares, mastócitos e células NK, esse receptor é um membro da família de integrinas de superfície celular. Em neutrófilos e monócitos, CR3 promove a fagocitose de microrganismos opsonizados pela proteína C3b (ABBAS, ABUL; LICHTMAN, ANDREW; PILLAI et al., 2012). Quando um fragmento C3b do complemento é simultaneamente ligado ao receptor com um β -glucano, essa ligação desencadeia fagocitose e degranulação de mastócitos (NOVAK e VETVICKA, 2008).

O reconhecimento de β -glucanos por receptores C3 também foi descrito em estudos *in vitro* com em neutrófilos de suínos, nos quais foi observada uma indução na produção de espécies reativas de oxigênio tipicamente produzidas por estas células para promover a morte microbiana durante uma infecção. Por outro lado, sob altas

concentrações além de não ter sido observado um estímulo na produção de linfócitos uma grande quantidade de debris celulares foi observada, indicando um potencial citotóxico dos β -glucanos quando administrados em grandes quantidades (SONCK et al., 2010).

Em relação à sua ação antitumoral, esta parece ocorrer sobre a imunidade inata, mas também adaptativa. Estudos mostraram que o β -glucano é extremamente ativo em cooperação com anticorpos que ocorrem naturalmente em casos de câncer. Após a ligação dos anticorpos na superfície das células cancerígenas, os fragmentos C3b do complemento opsonizam as células cancerígenas. As células estimuladas pela ligação com β -glucano, tais como neutrófilos sanguíneos, macrófagos e células NK, reconhecem especificamente estes complexos de anticorpo complemento com maior facilidade e matam as células tumorais (VETVICKA, 2011).

Vale ressaltar, ainda, que fatores como a fonte de obtenção, métodos de isolamento e a solubilidade variável das preparações com β -glucanos fazem com que estas preparações sejam heterogêneas, colocando em questão a acurácia dos resultados encontrados nas pesquisas sob o ponto de vista farmacológico. Assim, com o objetivo de evitar complicações, a maioria das preparações contendo β -glucano para ingestão é classificada e utilizada como alimento saudável ou suplemento nutricional, mas não como imunomodulador (NOVAK e VETVICKA, 2008).

2.3.3 Utilização de β -glucanos na produção de suínos

A proibição dos antibióticos promotores de crescimento do na alimentação animal iniciada em países europeus em 1995, resultaram em grandes perdas económicas devido ao aumento da morbidade e mortalidade de animais de produção (CASEWELL et al., 2003). Consequentemente, aumentou também a necessidade e a busca por alternativas que pudessem melhorar o crescimento e a saúde desses animais, incluindo suínos.

Os β -glucanos são originalmente utilizadas por seu potencial imunomodulador, podendo melhorar a saúde intestinal através do aumento das funções de barreira da mucosa de maneira a contribuir para o crescimento dos animais, uma vez que os nutrientes necessários ao crescimento são digeridos e absorvidos pelo organismo através

da mucosa intestinal. Esses polissacarídeos podem ter influência ainda sobre a composição da microbiota intestinal, a qual não só ajuda na digestão, mas pode apoiar direta e indiretamente as atividades imunológicas do tecido linfoide associado ao intestino (GALT), representando o maior órgão imune em mamíferos (VETVICKA, VANNUCCI e SIMA, 2014) .

O efeito mais frequentemente observado a partir da inclusão de fonte de β -glucanos na dieta de leitões, especialmente aquelas obtidas de leveduras, é a modulação da produção de citocinas pro-inflamatórias induzidas pela infecção por patógenos (SWEENEY et al., 2012; VETVICKA e OLIVEIRA, 2014; WAITITU et al., 2016; ZHOU et al., 2013; LI et al., 2006). Estas citocinas inflamatórias são muito importantes no início de qualquer processo inflamatório e/ou infeccioso devido ao seu efeito quimiotático sobre macrófagos e neutrófilos para o local agredido (ABBAS, ABUL; LICHTMAN, ANDREW; PILLAI et al., 2012). Entretanto sua produção exacerbada pode induzir à ruptura da monocamada de células do epitélio intestinal, aumentando a permeabilidade ao patógeno e ao próprio para a circulação, gerando efeitos sistêmicos (AL-SADI et al., 2009), sendo a utilização de β -glucanos uma forma de controle deste processo.

Outra forma de controle da inflamação causada por patógenos bem como pela mudança de dieta no período de desmame é a indução da produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) também observada em alguns estudos após a administração de β -glucanos (LI et al., 2006; WAITITU et al., 2016; YANG et al., 2016). Produzida principalmente por macrófagos, a IL-10 também pode inibir a ação destas células, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (ABBAS, ABUL; LICHTMAN, ANDREW; PILLAI et al., 2012).

Entretanto, a influência deste estímulo do sistema imunológico pelos β -glucanos sobre o desempenho dos leitões ainda é controversa havendo relatos tanto de incremento de parâmetros como ganho de peso (GP) associado à modulação da inflamação (LI et al., 2006; VETVICKA e OLIVEIRA, 2014), quanto da não observação de qualquer influência desses polissacarídeos sobre o crescimento dos animais (LEDUR et al., 2012; SWEENEY et al., 2012; YANG et al., 2016; ZHOU et al., 2013).

Diferentes resultados são atribuídos às diferentes fontes de obtenção e formas de purificação dos β -glucanos, as quais poderiam influenciar no seu reconhecimento e

mecanismo de ação no organismo. Isso porque alguns estudos revelaram que células do sistema imune de suínos podem não ser tão responsivos, por exemplo, ao estímulo de glucanos provenientes de algas do gênero *Laminaria*, fungos filamentosos como *Sclerotium rolfsii* (SONCK et al., 2010) que são solúveis, ou a leveduras não *Sacharomyces* como do gênero *Kluyveromyces* (KEIMER et al., 2018).

Alguns trabalhos relatam ainda a ação dos β -glucanos sobre a morfologia intestinal, reduzindo a atrofia de vilosidades de ocorrência comum em leitões recém-desmamados, seja pela mudança brusca na dieta, seja pela infecção por patógenos intestinais comuns nesta fase. Este efeito protetor sobre a principal estrutura de absorção de nutrientes no intestino dos leitões não necessariamente têm resultado em um incremento no desempenho dos animais (JIANG et al., 2015; WAITITU et al., 2016).

Quanto à ação dos β -glucanos sobre a microbiota intestinal de leitões, além do efeito sobre o sistema imune como aumento da atividade fagocítica e produção de espécies reativas de oxigênio contra patógenos (VETVICKA e OLIVEIRA, 2014) o caráter prebiótico dos β -glucanos também tem sido explorado. Alguns β -glucanos conseguem escapar da hidrólise no trato digestório superior e podem ser fermentadas no ceco e cólon, favorecendo a proliferação de microrganismos benéficos e consequentemente reduzindo microrganismos patogênicos comuns na fase de desmame (SWEENEY et al., 2012; ZHOU et al., 2013). Por sua vez, a fermentação de glucanos no intestino pode ser mensurada pelo aumento na produção de ácidos graxos voláteis, produtos do processo fermentativo que servem ainda como suprimento energético para os enterócitos possibilitando maior renovação das células que compõem a barreira intestinal (SWEENEY et al., 2012).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização dos β -glucanos tem sido descrita na alimentação animal principalmente pelo seu potencial imunomodulador. Especialmente em leitões, a utilização no período pós-desmame visa amenizar os possíveis impactos dos desafios imunológicos desta fase sobre o desempenho dos animais a curto e longo prazo. A existência de diferentes fontes desse polissacarídeo, amplia as possibilidades de sua utilização. Ao mesmo tempo, a heterogeneidade quanto às características físico-químicas e conseqüentemente às propriedades biológicas de cada β -glucano torna necessária a análise do tipo de resposta desencadeada por cada uma destas fontes para viabilização de sua utilização na alimentação de suínos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, ABUL; LICHTMAN, ANDREW; PILLAI, S. et al. *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2*. Elsevier Editora Ltda, n. 8, p. 631–667, 2012.
- AKRAMIENĖ, D. et al. APŽVALGINIS STRAIPSNIS Effects of b-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, Kaunas, v. 43, n. 8, p. 597–606, 2007.
- BAERT, K. et al. Cell type-specific differences in β -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. **Developmental and Comparative Immunology**, Mariakerke, v. 48, n. 1, p. 192–203, 2015.
- BAILEY, M. et al. Effects of Infection with Transmissible Gastroenteritis Virus on Concomitant Immune Responses to Dietary and Injected Antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, Bristol, v. 11, n. 2, p. 337–343, 2004.
- BAO, X. et al. Structural features of immunolog [1].pdf. v. 59, p. 175–181, 2002.
- BLIKSLAGER, Anthony T. et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. **Physiological reviews**, v. 87, n. 2, p. 545-564, 2007.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36–37, 2001. _____. Immune recognition of fungal β -glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 471–479, 2005.
- CAMILI, G. et al. Impaired phagocytosis directs human monocyte activation in response to fungal derived β -glucan particles. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 5, p. 757–770, 2018.
- CAMPBELL, J. M.; CRENSHAW, J. D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 2–5, 2013.
- CASEWELL, M. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 159–161, 2003.
- CHAN, P. M. et al. Attenuation of Inflammatory Mediators (TNF- α and Nitric Oxide) and Up-Regulation of IL-10 by Wild and Domesticated Basidiocarps of *Amauroderma rugosum* (Blume & T. Nees) Torrend in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–21, 2015.
- CHEN, D. et al. Effect of different dietary non-starch fiber fractions on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal development in weaned pigs.

Nutrition, v. 51–52, p. 20–28, 2018.

COLLINS, C. L. et al. Post-weaning and whole-of-life performance of pigs is determined by live weight at weaning and the complexity of the diet fed after weaning. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 372–379, 2017.

DAVID, J. C.; GRONGNET, J. F.; LALLES, J. P. Weaning affects the expression of heat shock proteins in different regions of the gastrointestinal tract of piglets. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 9, p. 2551–2561, 2002.

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

DLAMINI, Z. C. et al. Effects of probiotics on growth performance, blood parameters, and antibody stimulation in piglets. **South African Journal of Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 765, 2017.

DONG, Q. et al. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 15, p. 1417–1421, 2002.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, n. 1, p. 243–282, 1999.

FREIRE, J. P. B. et al. Effect of dietary fibre source on total tract digestibility, caecum volatile fatty acids and digestive transit time in the weaned piglet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, n. 1–2, p. 71–83, 2000.

FAN, J. et al. Effects of enteral nutrition supplemented with glutamine on intestinal mucosal immunity in burned mice. **Nutrition**, New York, n. 25, p. 233–239, 2009.

FUKATSU, K.; KUDSK, K. A. Nutrition and gut immunity. **Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, n. 91, p. 755–770, 2011.

GANTNER, B. N. et al. Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107–1117, 2003.

GU, Y. et al. Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. **Clinical Nutrition**, Saint Louis, v. 20, n. 2, p. 159–166, 2001.

HEDEMANN, M. S.; JENSEN, B. B. Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 47–59, 2004.

HU, C. H. et al. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1094-1101, 2013.

HUNTER, K. W.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 267–271, 2002.

JEDINAK, A. et al. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF- κ B and AP-1 signaling. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2011.

JIANG, Z. et al. Effects of different forms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early-weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2015.

JIN, S. K. et al. Effects of fermented oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) by-product supplementation on growth performance, blood parameters and meat quality in finishing Berkshire pigs. **Animal**, v. 1, n. 02, p. 301, 2007.

KEIMER, B. et al. Effect of time and dietary supplementation with processed yeasts (*Kluyveromyces fragilis*) on immunological parameters in weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 245, p. 136–146, 2018.

KIM, J. C. et al. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 3–16, 2012.

KIM, K. et al. Algae-derived β -glucan enhanced gut health and immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *E. coli*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 248, p. 114–125, 2019.

KITT, S.; MILLER, P.; LEWIS, A. Factors Affecting Small Intestine Development in Weanling Pigs. **Nebraska Swine Reports**, n. January, 2001.

KONSTANTINOV, S. R. et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1191–1199, 2006.

KUCHARZIK, T. et al. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 159, n. 6, p. 2001-2009, 2001.

LALLÈS, J. P. et al. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, n. 2, p. 260–268, 2007.

LAMBERT, G. P. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. **Journal of animal science**, v. 87, n. 14 Suppl, p. 101–108, 2009.

LANGE, C. F. M. DE et al. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. **Livestock Science**, v. 134, n. 1–3, p. 124–134, 2010.

LEDUR, V. S. et al. Respostas fisiológicas e de desempenho de leitões suplementados com β -glucanos e desafiados imunologicamente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 434–442, 2012.

LI, J. et al. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 9, p. 2374–2381, 2006.

LIU, Yulan et al. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 552–560, 2008.

MCCANN, Frances et al. Macrophage internalization of fungal β -glucans is not necessary for initiation of related inflammatory responses. **Infection and immunity**, v. 73, n. 10, p. 6340–6349, 2005.

MALAGO, J. J.; KONINKX, J. F. J. G.; DIJK, J. E. VAN. The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium. **Cell Stress and Chaperones**, v. 7, n. 2, p. 191–199, 2002.

MARION, J. et al. Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the posttranscriptional level. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 401–410, 2005.

MAYORGA, E. J. et al. Estimating glucose requirements of an activated immune system in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 11, p. 5020–5029, 2017.

MINOV, J. et al. Effects of Pleuran (β – Glucan from *Pleurotus Ostreatus*) Supplementation on Incidence and Duration of COPD Exacerbations. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 198, p. 1–6, 2017.

MURPHY, P. et al. Analysis of bacterial community shifts in the gastrointestinal tract of pigs fed diets supplemented with β -glucan from *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Animal**, v. 7, n. 7, p. 1079–1087, 2013.

NELSON, E. D. et al. Neurologic effects of exogenous saccharides: A review of controlled human, animal, and *in vitro* studies. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 149–162, 2012.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of Immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47–57, 2008.

PARK, J. H. et al. Hematological and serum biochemical parameters of Korean native goats fed with spent mushroom substrate. **Asian J Anim Vet Adv**, v. 7, p. 1139-1147, 2012.

PIÉ, S. et al. Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 641–647, 2004.

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

PRICE, K. L. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 12, p. 3896–3908, 2010.

SANDVIK, A. et al. Oral and systemic administration of β -glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 148, p. 168–177, 2007.

DE ASSIS et al.. Desempenho E Características Morfo- Intestinais De Leitoas Mananoligossacarídeo. **Archives of Veterinary Science**, p. 33–41, 2014.

SNART, J. et al. Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for *lactobacilli* in the rat cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1925–1931, 2006.

SÖDERHOLM, J. D.; PERDUE, M. H. Stress and intestinal barrier function. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 280, n. 1, p. 7-13, 2001.

SONCK, E. et al. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3–4, p. 199–207, 2010.

STRATFORD, M. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1741–1752, 1994.

SWEENEY, T. et al. Effect of purified β -glucans derived from *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* and *Saccharomyces cerevisiae* on piglet performance, selected bacterial populations, volatile fatty acids and pro-inflammatory cytokines in the gastrointestinal tract of pi. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 7, p. 1226–1234, 2012.

- TACTACAN, G. B. et al. Performance responses, nutrient digestibility, blood characteristics, and measures of gastrointestinal health in weanling pigs fed protease enzyme. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 7, p. 998–1003, 2016.
- TOKUNAKA, K. et al. Application of Candida solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 1, p. 59–67, 2002.
- TSUKAHARA, T. et al. Correlation between villous height and the disaccharidase activity in the small intestine of piglets from nursing to growing. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 1, p. 54–59, 2013.
- UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Toll-like receptors: Key mediators of microbe detection. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 103–110, 2002.
- VALPOTIĆ, H. et al. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide and clinoptilolite modulates innate and adaptive immune parameters of weaned pigs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 21, n. 1, p. 83–93, 2018.
- VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 2, n. 2, p. 115, 2011. _____. Comparison of Immunological Effects of Commercially Available β -Glucans: Part III. **International Clinical Pathology Journal**, v. 2, n. 4, 2016.
- VETVICKA, V.; OLIVEIRA, C. β -(1-3)(1-6)-D-glucans modulate immune status in pigs: potential importance for efficiency of commercial farming. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2, p. 16, 2014.
- VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The Effects of β -Glucan on Pig Growth and Immunity. **The Open Biochemistry Journal**, v. 1, n. 1, p. 89–93, 2014.
- VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. An Evaluation of the Immunological Activities of Commercially Available Beta1,3-Glucans. **Jana**, v. 10, n. 1, p. 25–31, 2007.
- VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. Comparison of immunological effects of commercially available β -glucans. **Applied Scientific Reports**, v. 1, n. 1, p. 2, 2014.
- VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 276–284, 2008.
- WAITITU, S. M. et al. Short-term effect of supplemental yeast extract without or with feed enzymes on growth performance, immune status and gut structure of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, 2016.
- WANG, J. et al. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and

dietary glutamine supplementation. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1025–32, 2008.

YANG, H. et al. Effects of yeast products on the intestinal morphology , barrier function , cytokine expression , and antioxidant system of weaned piglets . v. 17, p. 752–762, 2016.

YANG, X. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection alters intestinal immunity in mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 1, p. 825–830, 2016.

YU, S. et al. The effects of whole mushrooms during inflammation. **BMC Immunology**, v. 10, p. 1–13, 2009.

ZHOU, T. X. et al. Effect of dietary β -glucan on growth performance, fecal microbial shedding and immunological responses after lipopolysaccharide challenge in weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 179, n. 1–4, p. 85–92, 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Inclusão de diferentes fontes de β -glucano na alimentação de leitões recém-desmamados

RESUMO

Os β -glucanos têm sido explorados na alimentação de leitões recém-desmamados, especialmente pelo seu potencial imunomodulador, a fim de amenizar os efeitos do estresse pós-desmame sobre o desempenho dos animais. O objetivo deste estudo foi investigar o desempenho e a saúde intestinal de 84 leitões desmamados aos 21 dias, desafiados com *E. coli* K88⁺ e suplementados durante 21 dias com diferentes fontes de β -glucano, divididas em 5 tratamentos: Macrogard® contendo 0,07% (T1) ou 0,035% (T2) de β -glucano de *S.cerevisiae*; 0,07% de β -glucano de cogumelo *Pleurotus ostreatus* puro (T3); 0,07% de β -glucano de substrato pós-cultivo de *Pleurotus ostreatus* (T4) e além de dieta basal sem adição de β -glucano (T5). Foram avaliadas variáveis de desempenho como consumo de ração diário (CRD), ganho de peso diário (GPD) e conversão alimentar (CA) através da pesagem dos animais, da ração fornecida diariamente bem como suas sobras. A incidência de diarreia foi avaliada diariamente duas vezes ao dia e amostras de sangue foram coletadas de um animal por baia para realização de leucograma e quantificação das citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10). Aos 21 dias do experimento, um animal por baia foi abatido e segmentos do íleo e jejuno coletados para avaliação da morfologia intestinal. Houve um maior CRD nos grupos suplementados com β -glucano no período pós-inoculação (14 a 21 dias) e pelo grupo T4 ao longo de todo experimento. De 14 a 21 dias a CA foi pior em todos os tratamentos com β -glucano quando comparados ao controle (T5). Não houve diferença significativa na incidência de diarreia ou morfologia intestinal entre os tratamentos. Não houve alterações no leucograma fora dos valores de referência. Em relação às citocinas, os tratamentos não diferiram quanto aos níveis da anti-inflamatória IL-10, enquanto a pró-inflamatória TNF- α foi significativamente inibida por T2 quando comparado ao controle. Concluiu-se que, entre as diferentes fontes, apenas o β -glucano de *S. cerevisiae* do produto Macrogard® em sua menor dose apresentou ação imunomoduladora significativamente maior quando comparado ao controle (T5) o que implicou, em uma pior conversão alimentar a curto prazo. Já o β -glucano do composto pós-cultivo de *P.ostreatus* (T4), apesar de não ter incrementado o GPD, estimulou um consumo maior durante todo o experimento, mostrando-se uma alternativa para indução do consumo de ração nas primeiras semanas críticas de desmame.

Palavras chave: Desempenho, resposta imune, β -glucanos, desmame.

**Trabalho escrito de acordo com normas *Journal of Animal Science*

ABSTRACT

β -glucans have been exploited in the feeding of recently weaned piglets especially for their immunomodulatory potential, in order to mitigate the effects of post-weaning stress on the performance of animals. The aim of this study was to investigate the performance and intestinal health of 84 weaned piglets at 21 days, challenged with *E. coli* K88⁺ and supplemented during 21 days with different sources of β -glucan divided into 5 treatments: Macrogard® containing 0,07% (T1) or 0,035% (T2) of *S.cerevisiae* β -glucan; 0,07% β -glucan of pure *Pleurotus ostreatus* mushroom (T3); 0,07% β -glucan of post-culture substrate of *Pleurotus ostreatus* (T4) and a basal diet without addition of β -glucan (T5). Daily ration consumption (CRD), daily weight gain (GPG) and feed conversion (CA) were evaluated by weighing the animals, daily ration as well as their leftovers. The incidence of diarrhea was assessed daily twice daily and blood samples were collected from one animal per well for leukogram and quantification of cytokines as tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 10 (IL-10). At 21 days of trial, a animal per pen was slaughtered and ileum and jejunum segments were collected for evaluation of intestinal morphology. There was a CRD in the groups supplemented with β -glucan in the post-inoculation period (14 to 21 days) and throughout the experiment by T4. From 14 to 21 days the CA was worse in all treatments with β -glucan when compared to the control (T5). There was no significant difference in the incidence of diarrhea or intestinal morphology between treatments. There were no changes in the leukogram outside the reference values. Regarding the cytokines, the treatments did not differ as to the levels of the anti-inflammatory IL-10, whereas the pro-inflammatory TNF- α was significantly inhibited by T2 when compared to the control. As a conclusion, among the different sources, only the β -glucan of *S.cerevisiae* of the Macrogard® product in its lower dose presented a significantly higher immunomodulatory action when compared to the control (T5), which implied, a worse short-term feed conversion. However, β -glucan from spent mushroom substrate of *P.ostreatus* (T4), despite not increasing GPD, stimulated a higher consumption during the whole experiment, showing whether an alternative for induction of feed consumption in the first critical weeks of post- weaning.

Keywords: Performance, immune response, β -glucans, weaning.

1 INTRODUÇÃO

Os β -glucanos são polissacarídeos constituintes da parede celular de leveduras, fungos filamentosos, cereais, algas e algumas bactérias. Esses compostos podem ser reconhecidos principalmente por células do sistema imune inato animal gerando respostas capazes de melhorar suas barreiras naturais de defesa (Volman, Ramakers e Plat, 2008).

Na suinocultura, o potencial imunomodulador dos β -glucanos têm sido explorados especialmente em leitões durante o período pós-desmame, na tentativa de amenizar os efeitos dos desafios comuns nesta fase bem como os prejuízos causados sobre o desempenho. Neste sentido os benefícios dos β -glucanos têm se mostrado principalmente sobre a saúde intestinal pela ativação de células de defesa, especialmente macrófagos e neutrófilos levando ao aumento da atividade fagocítica, produção de substâncias antimicrobianas (Baert, et al., 2015), diminuição da colonização por patógenos (Murphy et al., 2013; Zhou et al., 2013), modulação da secreção de citocinas inflamatórias (Vetvicka; Oliveira, 2014) e produção de proteínas envolvidas na manutenção da integridade intestinal (Kim et al., 2018)

Leveduras da espécie *Sacharomyces cerevisiae* são uma das fontes mais comuns de β -glucanos comercialmente disponíveis e utilizadas na alimentação de suínos. Entretanto, fungos comestíveis como *Pleurotus ostreatus* (shimeji) (Minov et al., 2017) bem como o resíduo da sua produção, o chamado substrato pós-cultivo de cogumelos (SMS, do inglês *spent mushroom substrate*) também apresentam β -glucano na sua composição (Park et al., 2012). Assim, além de leveduras, cogumelos comestíveis e os subprodutos do seu cultivo também podem ser considerados fontes alternativas desses polissacarídeos para alimentação animal.

A depender da fonte da qual o β -glucano é obtido, podem ocorrer diferenças em características físico-químicas como número e tipo de ramificações, estrutura tridimensional, peso molecular, solubilidade (Vetvicka, 2016) e até mesmo o processo utilizado na purificação do polissacarídeo (Hunter, Gault e Berner, 2002) pode influenciar no seu reconhecimento por receptores específicos do sistema imune e consequentemente nas respostas desencadeadas a partir da sua administração.

O objetivo deste trabalho, portanto, foi avaliar o potencial de diferentes fontes de β -glucano (leveduras e fungos filamentosos) na modulação da resposta imune de leitões desafiados durante o período pós-desmame, bem como seu efeito sobre a saúde intestinal e o desempenho destes animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro Experimental de Suínos (CES) do departamento de Zootecnia (DZO) e no Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, Brasil. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFLA, protocolo no 060/17.

*Obtenção do cogumelo *Pleurotus ostreatus* e SMS*

Para obtenção de cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* foi utilizada a técnica de cultivo axênico, na qual 1,8 kg de substrato a base de bagaço de cana (80%), capim coast cross (20%) e farelo de trigo (2%) foram acondicionados em sacos de polipropileno e submetidos a processo de esterilização em autoclave a 121°C por 2 horas. Após resfriamento, o substrato foi inoculado com 3% de matriz secundária de *Pleurotus ostreatus* espalhada superficialmente no substrato. Foram produzidos 26 blocos de cogumelos os quais foram distribuídos ao acaso em prateleiras sob a mesma condição de temperatura (26°C \pm 3), mantendo-se a umidade acima de 70%. Uma vez atingida a completa colonização do substrato, parte dos blocos foi separada para secagem e obtenção do SMS e a outra parte retirada das embalagens para indução da frutificação.

Os blocos separados para obtenção do SMS foram submetidos a secagem em estufa a 105° posteriormente moídos e peneirados. Já os blocos separados para obtenção do cogumelo puro, uma vez frutificados tiveram os cogumelos submetidos a secagem a 60°C durante 48 horas em secadora elétrica. Após secagem foram moídos e peneirados para inclusão na ração de leitões recém desmamados. Os blocos produziram em média de 100 a 200g de cogumelo úmido no primeiro dia de colheita, o que corresponde a 10 e

20 g de cogumelo seco respectivamente. Neste sentido, foi necessária apenas a produção de um dia dos 26 blocos para obtenção de 200g de cogumelo seco e triturado para inclusão na ração

Quantificação de β -glucano

A porcentagem de β -glucanos nas diferentes fontes de β -glucanos foi determinada quantitativamente em triplicata, usando kit para determinação de β -glucanos para cogumelos e leveduras K-YBGL 09/2009 da Megazyme (Megazyme Internacional Ireland Ltd., Wicklow, UK) de acordo com as instruções do fabricante. A partir dos resultados, o nível de inclusão na ração foi calculado de modo a se obter para os tratamentos T3 e T4 uma concentração final de β -glucanos equivalente àquela do tratamento T1 (0,07% da ração), por ser a dose recomendada pelo produto comercial Macrogard®, enquanto o tratamento T2 foi preparado para testar o produto comercial na metade da dose recomendada (0,035%).

Animais, instalações e dietas experimentais

Um total de 84 leitões machos castrados (70% DanBred e 30% PIC), desmamados aos 21 dias de idade e 5,6 kg (\pm 0,5) kg de peso inicial, foram alojados na unidade de creche. As instalações são compostas por baias suspensas, com piso vazado, comedouros tipo calha e bebedouros tipo chupeta. A temperatura foi monitorada com o uso de datalogger e controlada pela abertura ou fechamento de janelas bem como pelo uso de lâmpadas aquecedoras para manter o ambiente próximo ao adequado para a idade do animal.

As rações foram formuladas para atender às exigências nutricionais mínimas segundo as Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (ROSTAGNO et al., 2017), em dois períodos da fase de creche: Pré-inicial 1 (0 a 07 dias de experimento), Pré-inicial 2 (08 a 21 dias de experimento) (**Tabela 1**).

A fim de manter as dietas isoenergéticas e isoproteicas, foi reservado um espaço da formulação para a inclusão dos aditivos, quando necessário, esse espaço era completado com caulim.

Tabela 1 - Composição centesimal e valores nutricionais das dietas utilizadas nas diferentes fases do experimento:

Ingredientes (%)	Pré-inicial 1	Pré-inicial 2
Milho	29,25	44,14
Soja Integral Micronizada	23,33	15,71
Farelo de Soja 45%	13,33	18,57
Plasma	5,83	2,86
Núcleo ¹	25,00 ¹	15,00 ²
Fosfato bicálcico	1,67	1,43
Calcáreo Calcítico	0,83	1,14
Sal comum	0	0,14
L-Lisina	0,08	0,21
DL-Metionina	0,08	0,14
L-Treonina	0,08	0,14
Caulim	0,50	0,50
Níveis nutricionais calculados	Pré-inicial 1	Pré-inicial 2
E.M. Suínos kcal/kg	3562,92	3405,067
Proteína Bruta (%)	24,65	21,97
Lisina Dig. (%)	1,616	1,484
Metionina Dig. (%)	0,406	0,401
Metionina+Cist. Dig. (%)	0,834	0,754
Treonina Dig. (%)	0,972	0,902
Triptofano Dig. (%)	0,276	0,256
Valina Dig. (%)	1,095	0,961
Fibra Bruta (%)	1,654	2,058
Lactose (%)	14,400	7,200
Cálcio (%)	0,880	0,973
Fósforo Disponível (%)	0,550	0,481
Sódio (%)	0,28	0,23

¹ Composição por kg do produto: Ácido fólico (4,5 mg); Ácido pantotênico (75 mg); Biotina (0,9 mg); Co (2 mg); Cu (370 mg); Colina (1000 mg); Fe (250 mg); I (5000 mg); Mn (100 mg); Niacina (120 mg); Se (1,5 mg); Vitamina B1 (12 mg); Vitamina B12 (0,1 mg); Vitamina B2 (25 mg); Vitamina B6 (15 mg); Vitamina C (150 mg); Vitamina A (36000 UI); Vitamina D3 (75000 UI); Vitamina E (270 UI); Vitamina K3 (15 UI); Zinco (7750 mg). 2 Composição por kg do produto: Ácido fólico (20 mg); Ácido pantotênico (470 mg); Biotina (3,75 mg); Co (25 mg); Cu (4,650 mg); Colina (9000 mg); Fe (3000 mg); I (45 mg); Mn (1400 mg); Niacina (700 mg); Se (10 mg); Vitamina B1 (50 mg); Vitamina B12 (0,6 mg); Vitamina B2 (130 mg); Vitamina B6 (75 mg); Vitamina C (500 mg); Vitamina A (200000 UI); Vitamina D3 (40000 UI); Vitamina E (1170 UI); Vitamina K3 (90 UI); Zinco (4100 mg)

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, no qual a unidade experimental foi de três leitões por baia, o peso inicial utilizado como fator bloco e cada tratamento composto por cinco repetições. Os tratamentos experimentais foram determinados levando em consideração diferentes as quantidades de β -glucano presente nas diferentes fontes sendo eles: dieta basal + Macrogard® contendo 0,07% de β -glucano de *S.cerevisiae* (T1); dieta basal + Macrogard® contendo 0,035% de β -glucano de *S.cerevisiae* (T2); dieta basal + cogumelo *Pleurotus ostreatus* puro contendo 0,07% de β -glucano (T3); dieta basal + substrato pós-cultivo de *Pleurotus ostreatus* contendo 0,07% de β -glucano (T4) e dieta basal sem adição de β -glucano (T5).

Procedimentos experimentais

O experimento teve a duração de 21 dias durante os quais água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Para o controle de doenças respiratórias, no dia 0 do experimento os animais receberam uma dose de 0,15ml de antibiótico à base de tulatromicina (Draxxin®, Zoetis), o qual não possui ação entérica, de maneira a não interferir na resposta desencadeada pelo desafio com o patógeno intestinal *E.coli* K88⁺.

Nos dias 0, 7, 13, 16 e 21 foram coletadas amostras de sangue de um animal por baia (unidade experimental) com peso vivo mais próximo à média da baia. As amostras foram coletadas em tubos com anticoagulante para realização de leucograma e sem anticoagulante visando a separação do soro sanguíneo para realização de Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA), através do qual foi avaliada a concentração de Interleucina-10 (IL-10) como marcador anti-inflamatório e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) como marcador pró-inflamatório.

Nos dias 14 e 16 do experimento, todos os animais receberam oralmente 1 ml de inóculo contendo 10^6 UFC/ml da estirpe bacteriana *Escherichia coli* enterotoxigênica K88⁺ (LT⁺, STa⁺ e STb⁺), proveniente da Universidade de São Paulo, totalizando uma dose de 2 ml, ou 2×10^6 UFC por animal (SILVEIRA, 2014). A preparação dos inóculos foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Zootecnia da UFPA a partir do cultivo da cepa em meio de cultura Agar Mconkey por 16 horas a

37° C, seguido de diluição seriada em PBS para obtenção de uma concentração final de 10⁶ UFC/ml.

Aos 21 dias de experimento foi realizado o abate de um animal por baia com base no peso médio, por meio de eletronarcorese (> 300V, 1,25A, de 6 segundos), seguida de exsanguinação em frigorífico devidamente registrado, totalizando 28 animais abatidos. A ocasião foi feita a coleta de segmentos de jejuno para análise histológica.

Desempenho e incidência de diarreia

Os animais foram pesados nos dias 0, 7, 14 e 21 para o cálculo do ganho de peso diário (GPD), sendo a mesma balança utilizada em todas as pesagens. A ração fornecida e as sobras foram quantificadas duas vezes ao dia para o cálculo do consumo de ração diário (CRD) e conversão alimentar (CA) por fase.

Duas vezes ao dia, durante todo o experimento, foi realizada a análise do escore fecal através da classificação das fezes na baia e calculada a incidência de diarreia em percentagem relacionada aos dias de estudo. Seguindo a metodologia de Casey et al. (2007), a ausência de diarreia foi determinada pela observação de fezes normais e a presença de diarreia foi determinada pela observação de fezes líquidas e pastosas

Análise histológica

Foram coletados segmentos de 5 cm de jejuno e íleo para análise histológica. Após remoção do conteúdo luminal as amostras foram lavadas com solução fisiológica e fixadas em solução de formol 10% por 24 horas, desidratadas, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo (4µm) e as lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina, seguindo metodologia de Pluske, Williams e Aheme (1996).

Duas lâminas foram confeccionadas para cada amostra de tecido (quatro cortes) a partir das quais quinze vilosidades e quinze criptas foram mensuradas por animal, para avaliação de altura de vilosidade, profundidade de cripta e a relação entre estas medidas. A análise das lâminas histológicas foi feita no Laboratório de Histologia e Microbiologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras,

utilizando microscópio óptico OLYMPUS CX31, com câmera OLYMPUS SC30 associada e software Axio Vision Release 4.9 (ZEISS) para análise de imagens.

Análises imunológicas: quantificação de citocinas em soro e leucograma

Foram usados Kits ELISA Sanduiche específicos para suínos para determinar os níveis das citocinas IL-10 (Interleukin-10, Sandwich ELISA Kit, FineTest, Wuhan, China) e TNF- α (Porcine Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit, Sigma Aldrich) a partir do soro coletado em cinco momentos do experimento. As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi registrada a 450 nm utilizando um leitor de placas ELISA (Multiskan GO Espectrofotômetro para Microplacas, ThermoScientific, Vantaa, Finland). Cada amostra foi testada em duas repetições. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (\pm EPM); sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

As amostras de sangue coletadas para leucograma foram imediatamente enviadas para laboratório de análises clínicas credenciado.

Análise estatística

Os dados foram analisados em blocos casualizados, considerando a baía como parcela experimental para as médias de CRD e CA e o animal para as médias de GPD e PF, utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e, quando estes não apresentaram essa distribuição, foi realizada a transformação usando PROC RANK (SAS INSTITUTE INC, 2009). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância, exceto a incidência de diarreia. Quando houve diferença estatística pelo teste F ($F < 0,05$), foi adotado o teste de Tukey para comparação das médias, considerando diferença significativa o P -valor $< 0,05$ e tendência $0,05 \leq P$ -valor $< 0,10$. Na variável incidência de diarreia, foi analisada a influência de cada tratamento na ocorrência de diarreia, através da aplicação do modelo linear generalizado binomial no procedimento GENMOD.

3 RESULTADOS

Quantificação de β -glucanos

A quantificação das diferentes fontes de β -glucano e seu nível de inclusão em cada um dos tratamentos estão descritas na **Tabela 2**:

Tabela 2 - Nível de inclusão de diferentes β -glucanos por tratamento:

Tratamento*	Fonte de β -glucano (aditivo)	Quantidade de β -glucano na fonte (%)	Inclusão da fonte de β -glucano na ração (%)	Quantidade final de β -glucano na ração (%)
T1	Macrogard®	70	0,1	0,07
T2	Macrogard®	70	0,05	0,035
T3	Cogumelo puro <i>P.ostreatus</i>	30	0,233	0,07
T4	SMS de <i>P.ostreatus</i>	17	0,412	0,07
T5	-	0	0	0

Incidência de diarreia

Conforme mostrado na **Tabela 3**, não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as fontes de β -glucano (ou entre os tratamentos) para incidência de diarreia durante todo o período experimental:

Tabela 3 - Efeito das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia em leitões alimentados com diferentes fontes de β -glucanos desafiados com *E. coli* K88+*.

Incidência de diarreia	Tratamentos					P-Valor
	1	2	3	4	5	
0-7 dias	24,762	28,571	22,222	23,015	22,222	0,791
7-14 dias	21,905	30,476	18,254	23,809	25,397	0,278
14-21 dias	3,810	6,667	5,556	5,555	8,730	0,619

Desempenho

Os resultados de desempenho dos animais estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Efeito das dietas experimentais sobre o peso, ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD) e conversão alimentar (CA) em leitões alimentados com diferentes fontes de β -glucanos desafiados com *E. coli* K88+.

Variáveis	Tratamentos					CV	P-Valor
	T1	T2	T3	T4	T5		
Peso inicial	5,587	5,587	5,587	5,586	5,587	4,871	1,000
0 a 7 dias							
Peso	6,316	6,108	6,288	6,460	6,228	10,016	0,619
GP	0,729	0,521	0,701	0,874	0,641	91,882	0,608
GPD	0,112	0,080	0,108	0,135	0,099	91,801	0,606
CRD	0.147 b	0.135 b	0.159 ab	0.183 a	0.136 b	29,462	0,0032
CA	1,157	1,477	1,771	1,975	1,512	91,166	0,662
7 a 14 dias							
Peso	8,249	8,069	8,384	8,629	8,217	11,857	0,552
GP	1,933	1,961	2,097	2,169	1,989	22,991	0,514
GPD	0,275	0,281	0,301	0,309	0,285	23,013	0,514
CRD	0.263 b	0.279 b	0.284 b	0.321 a	0.260 b	20,366	0,0002
CA	0,986	0,953	0,929	1,027	0,928	20,864	0,585
0 a 14 dias							
GP	2,662	2,482	2,798	3,043	2,630	36,605	0,542
GPD	0,197	0,184	0,207	0,226	0,195	36,618	0,541
CRD	0.207 b	0.210 b	0.211 b	0.254 a	0.200 b	21,995	0,001
CA	1,145	1,163	1,086	1,157	1,105	30,073	0,962
14 a 21 dias							
Peso	10,901	10,469	11,108	11,232	10,807	12,440	0,573
GP	2,653	2,400	2,723	2,603	2,590	21,207	0,556
GPD	0,379	0,343	0,389	0,372	0,370	21,193	0,558
CRD	0.500 b	0.490 b	0.506 b	0.558 a	0.458 c	14,031	<.0001
CA	1.350 b	1.433 a	1.279 b	1,565 a	1.270 c	20,436	0,0049
0 a 21 dias							
GP	5,315	4,882	5,521	5,646	5,220	25,469	0,564
GPD	0,253	0,233	0,263	0,269	0,249	25,479	0,565
CRD	0,301b	0,296b	0,305b	0,350a	0,283c	16,573	<.0001
CA	1,235	1,266	1,203	1,381	1,190	22,558	0,289

*Médias na linha, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

O tratamento T4 apresentou diferença significativa no consumo de ração (CRD) durante todo período experimental quando comparado ao controle. Além de T4, no período de 14 a 21 dias todos os demais tratamentos com β -glucanos (T1, T2 e T3) também apresentaram CRD significativamente maior quando comparados ao controle.

Também foi observada diferença significativa para a variável conversão alimentar (CA) no período pós-inóculo (14 a 21) dias, para a qual os melhores resultados foram apresentados pelo grupo controle T5, seguido por T1 e T3, sendo os tratamentos T2 e T4 os que apresentaram pior conversão.

Incidência de diarreia

Conforme mostrado na **Tabela 5**, não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as fontes de β -glucano (ou entre os tratamentos) para incidência de diarreia durante todo o período experimental:

Tabela 5 - Efeito das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia em leitões alimentados com diferentes fontes de β -glucanos desafiados com *E. coli* K88+*.

Incidência de diarreia	Tratamentos					P-Valor
	1	2	3	4	5	
0-7 dias	24,762	28,571	22,222	23,015	22,222	0,791
7-14 dias	21,905	30,476	18,254	23,809	25,397	0,278
14-21 dias	3,810	6,667	5,556	5,555	8,730	0,619

Histologia

Como descrito na **Tabela 6**, os tratamentos não resultaram em diferenças na altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta nos animais avaliados.

Tabela 6 - Efeito das dietas experimentais sobre a altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta (v:c), em μm , em leitões desafiados *E. coli* K88⁺.

Variáveis	Tratamentos					CV	EPM	P-valor
	1	2	3	4	5			
Altura Vilosidade	442,2	458,25	549,50	368,00	345,60	18,25	16,19	0,527
Profundidade Cripta	292,00	269,00	289,00	298,20	273,80	15,20	53,11	0,646
Relação V:C	1,51	1,58	1,74	1,49	1,57	15,44	8,81	0,847

Leucograma

Apesar de diferenças significativas terem sido observadas para níveis de alguns subgrupos de leucócitos, estes níveis não se apresentaram acima dos valores de referências para leitões. Os valores do Leucograma estão dispostos no Anexo 1.

Quantificação de citocinas (IL-10 e TNF- α)

Conforme mostrado na **Tabela 7** não houve interação entre as variáveis datas de “coletas” e “tratamentos” ($P > 0,05$), indicando que os tratamentos se comportaram da mesma forma ao longo dos intervalos de coleta.

Tabela 7- Comportamento dos níveis de citocinas TNF- α (pró inflamatória) e IL-10 (anti-inflamatória) (pg/ml) ao longo do tempo e entre os tratamentos:

Variável	Coletas					P-valor Coleta
	Dia 0 Desmame	Dia 7	Dia 13 Pré-Inóculo	Dia 16 Pós-Inóculo	Dia 21 Abate	
TNF α (pg/ml)	429.37 b	455.35 a	466.13 a	411.13 b	430.85 b	<.0001
IL-10	485.45 b	716.51a	557.71ab	672.68a	374.23b	0,001

Variável	Tratamentos					P-Valor Tratamento	P-Valor CxT ¹
	1	2	3	4	5		
TNF α (pg/ml)	435.22 ab	429.41 b	441.19 ab	432.98 ab	454.02 a	0,042	0,5642
IL-10 (pg/ml)	440.56	548.92	554.63	615,83	646.64	0,1802	0,4722

*Médias na linha, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$

¹CXT: Interação entre Coletas e Tratamentos

Analisando o comportamento dos níveis de citocinas ao longo de 21 dias de experimento e considerando a média de todos os tratamentos, observa-se que do momento do desmame (dia 0) quando os tratamentos começaram a ser administrados até o dia 7, tanto TNF- α quanto de IL-10 apresentaram aumento em seus níveis séricos

Até o dia 13 de experimento, imediatamente antes da administração do inóculo, TNF- α e IL-10 não apresentaram aumento significativo. Já no dia 16 de experimento, 72 horas após a administração da primeira dose de inóculo, observou-se queda significativa de TNF- α e aumento nos níveis séricos de IL-10. Até o fim do experimento, foi observada uma queda de ambas as citocinas e um aparente retorno à homeostasia.

Ao analisar o efeito de cada tratamento sobre os níveis destas citocinas, não foi observada diferença significativa na produção de IL-10 em nenhum dos grupos tratados com β -glucano quando comparados ao controle. Já para a citocina TNF- α , apenas o tratamento T2 composto pela menor dose de Macrogard® (β -glucano de *S.cerevisiae*) apresentou produção significativamente menor em relação ao controle.

4 DISCUSSÃO

O potencial imunomodulador dos β -glucanos em suínos vem sendo explorado em animais recém-desmamados como alternativa para amenizar o impacto dos desafios desta fase sobre o desempenho dos animais. Entretanto, o presente estudo não apresentou incrementos significativos no crescimento dos animais demonstrando, inclusive, um impacto negativo nos valores de conversão alimentar (CA) para todos os grupos tratados com β -glucanos quando comparados ao controle.

Todas as diferentes fontes de β -glucano estimularam um consumo de ração diário (CRD) significativamente maior que o controle durante o período pós-inóculo, mas não tiveram ganho de peso (GPD) proporcionalmente maior, o que pode explicar a pior conversão nesses grupos de 14 a 21 dias. Por outro lado, este aumento de consumo logo após a infecção por *E.coli* K88⁺ indica que os animais tratados com glucanos sofreram menos com o efeito anorexigênico da infecção comparados ao controle, quer seja pelo potencial para redução da colonização pelo patógeno, conforme já descrito por Zhou et al., (2013) e Murphy et al., (2013) ou para inibição de citocinas pró-

inflamatórias que tendem a reduzir o consumo durante a infecção (Li et al., 2006; Vetvicka; Vannucci; Sima, 2014).

Além do período pós-inóculo, para o grupo T4 o consumo foi o mais alto durante todo o período experimental. O β -glucano usado em T4 é oriundo do substrato à base de materiais ricos em fibras insolúveis como de bagaço de cana e capim *coast-cross* utilizado para cultivo do cogumelo *P.ostreatus* e descartado após seu ciclo produtivo (SMS). A inclusão de fontes de fibra insolúvel na dieta de suínos tende a reduzir o tempo de trânsito, devido ao aumento no peristaltismo e, conseqüentemente, na taxa de passagem da digesta, podendo aumentar o consumo de ração (Freire et al., 2000). Além de leitões recém-desmamados, este aumento no consumo de ração após a administração do substrato pós-cultivo de *P.ostreatus* também foi descrito por Jin et al., (2007) em porcas na fase de terminação, concordando com os resultados apresentados pelo tratamento T4.

Sugere-se que a inclusão do SMS na ração de leitões recém-desmamados, mesmo que não tenha gerado um incremento no crescimento a curto prazo, pode ser uma alternativa interessante para estimular o consumo de ração por leitões especialmente na primeira semana pós-desmame, visto que a anorexia decorrente da transição alimentar neste período gera grandes perdas econômicas, determinadas por quedas no ganho de peso e piora na conversão alimentar (Collins et al., 2017)

Já no tratamento T2, cuja fonte de β -glucano foi um produto comercial à base de leveduras *S.cerevisiae*, apesar do ganho de peso também não ter sido incrementado, o consumo não foi tão alto quanto T4 para justificar uma conversão alimentar igualmente pior destes dois tratamentos em relação ao controle e aos demais β -glucanos. Mas T2 foi o tratamento que apresentou menor produção da citocina pró-inflamatória TNF- α geralmente aumentada em infecções por patógenos e situações de desafio, sugerindo que nutrientes do crescimento podem ter sido redirecionados para a modulação da resposta imune neste grupo, impactando em parâmetros de desempenho como a CA. Mayorga et al., (2017) reforça a hipótese, relatando que durante o contato com patógenos no pós-desmame, os nutrientes da dieta tornam-se um elemento tanto mais crítico para montagem da resposta imunitária quanto maior for a imunoativação em leitões.

Estudos recentes relatam que a administração de 0,01% de β -glucano tanto de leveduras *S.cerevisiae* (Zhou et al., 2013) quanto de algas (Kim et al., 2019) são capazes de reduzir a produção de TNF- α sem prejuízo de parâmetros de desempenho de leitões desafiados no desmame. Já Vetvicka; Oliveira, (2014) utilizando uma menor concentração do mesmo produto administrado no tratamento T2 (Macrogard®), assim como Li et al., (2006) usando 0,005% de β -glucano de *S.cerevisiae* observaram supressão de TNF- α e, ao contrário do presente estudo, relataram um incremento no GPD de leitões recém-desmamados sugerindo que, especialmente para esta fonte de β -glucano, doses menores podem garantir uma modulação da inflamação induzida pelo desafio sem comprometimento do desempenho.

Em uma infecção por *E.coli* K88⁺ o aumento de TNF- α induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) é inicialmente importante e benéfico, pois a citocina tem efeito quimiotático sobre macrófagos e neutrófilos para o local da infecção, no intuito de facilitar sua resolução (Abbas, Abul; Lichtman, Andrew; Pillai et al., 2012). Mesmo assim, a produção de TNF- α significativamente menor em T2 foi vista como benéfica no presente estudo porque além do próprio estresse pós-desmame, infecções severas ou não controladas podem induzir à produção níveis exacerbados da citocina, os quais, em contato crônico com a barreira intestinal podem aumentar sua permeabilidade intensificando reações inflamatórias locais e até sistêmicas (Hu et al., 2013).

A citocina anti-inflamatória IL-10 também foi avaliada neste estudo por ser considerada um regulador de retroalimentação negativa de TNF- α (Abbas, Lichtman & Pillai, 2015). Entretanto, diferente do que foi descrito por Li et al. (2006) a redução dos níveis de TNF- α observada em T2 não foi acompanhada de níveis séricos significativamente maiores de IL-10 quando comparados ao controle e aos demais tratamentos, o que sugere não ter sido apenas o estímulo de IL-10 o único mecanismo de regulação da inflamação ocorrido no grupo tratado com o produto Macrogard® na menor dose. A concentração de β -glucano em um produto tem forte relação com seu efeito imunológico, mas não somente. É importante ressaltar que a depender da fonte, os β -glucanos diferem-se em propriedades físico-químicas como número e tipo de ramificações, peso molecular, estrutura tridimensional e solubilidade os quais também podem afetar sua resposta (Vetvicka, 2016).

A este respeito, Sonck et al., (2010) e Baert et al., 2015) após estudos *in vitro* com macrófagos e neutrófilos específicos de suínos, concordam que o β -glucano proveniente de *S.cerevisiae* (T2) mostra atividade imunomoduladora significativamente maior em menores doses como a utilizada em T2 e atribuem este efeito à presença e disposição das ramificações β -1,6 em sua estrutura. Segundo estes autores, ramificações β -1,6 parecem se ligar com maior avidéz, por exemplo, a alguns dos principais receptores de β -glucano, como Dectin-1 e CR3, quando doses baixas são fornecidas. Ao contrário, sob concentrações maiores, estas ramificações tendem a interagir mais entre si do que com receptores, gerando assim menor resposta sobre a produção de citocinas e atividade fagocítica além de uma aparente atividade citotóxica.

O β -glucano presente em cogumelos *P.ostreatus* (T3) e no seu substrato pós-cultivo (T4) apresenta estrutura química muito semelhante ao β -glucano de levedura (T2), inclusive ramificações β -1,6 ligadas a um esqueleto principal β -1,3, embora mais curtas (Borcher, 2004). No entanto, além de terem sido administradas em doses maiores, supostamente menos imunomoduladoras para este tipo de estrutura, as fontes de β -glucano de T3 e T4 foram incluídas na ração em sua forma bruta, apenas desidratadas e moídas, enquanto a levedura presente em T2, foi submetida a um processo de purificação do β -1,3-1,6 glucano de sua parede celular. Hunter; Gault; Berner, (2002) relatam que este processo é capaz de eliminar outros componentes indesejáveis da parede de *Saccharomyces cerevisiae* como proteínas, lipídios, ácidos nucléicos, minerais e mananas, o que pode ter favorecido o reconhecimento do glucano de T2 por receptores do sistema imune, garantindo maior imunomodulação.

A hipótese é reforçada aos resultados encontrados por Vetvicka; Vetvickova, (2007, 2014) e Vetvicka, (2016) que, após uma sequência de 3 trabalhos de comparação entre a atividade imunomoduladora de diferentes fontes comerciais de β -glucano, ressaltam que é necessário o monitoramento constantemente de todas as condições durante os processos de isolamento e purificação do β -glucano ou o produto final terá atividade biológica limitada, se houver. Os mesmos autores concluem que a heterogeneidade de todas as fontes e até mesmo de diferentes produtos comerciais produzidos a partir de uma mesma fonte como *S.cerevisiae*, continuam sendo considerados a principal causa das diversidade de respostas encontradas em estudos sobre a atividade biológica dos β -glucanos.

Concordando com Chen et al., (2018) e De Assis et al., (2014) para outros parâmetros de saúde intestinal como altura de vilosidade e profundidade de cripta, nenhum dos tratamentos com β -glucano apresentou diferença significativa, indicando que não houve contribuição das diferentes fontes para a taxa de renovação celular dos enterócitos. Já Price et al., (2010) e Jiang et al., (2015) observaram incremento da relação vilosidade:cripta nos animais tratados com doses bem maiores de β -glucanos de *S.cerevisiae*. Hu et al. (2013) descreve ainda que vilosidades mais curtas e criptas mais profundas podem ser observadas entre 3 e 7 dias pós-desmame, mas a morfologia intestinal danificada já mostra recuperação para valores pré-desmame no 14º dia, o que pode ter ocorrido no presente estudo, uma vez que as amostras de intestino foram coletadas apenas 21 dias decorridos do desmame.

A não observância de um efeito protetor significativamente maior dos β -glucanos sobre a barreira física intestinal, pode ter contribuído para que uma mesma incidência de diarreia tenha ocorrido nestes tratamentos e no controle, concordando com os resultados de De Assis et al., (2014). Curiosamente, no período logo após o inóculo (14 a 21 dias) foi observada uma redução na incidência de diarreia em todos os tratamentos, sugerindo que sua ocorrência esteve muito mais relacionada ao stress pós-desmame e ao seu efeito inflamatório sobre a barreira intestinal, do que aos efeitos da infecção por *E.coli* K88⁺ propriamente dita.

A hipótese é reforçada pelos resultados encontrados por Hu et al, (2013) que ao avaliarem a produção de citocinas inflamatórias em leitões em situação de stress pós-desmame, observaram que ela é significativamente maior principalmente nas duas primeiras semanas do período e independente da ocorrência de infecção por patógenos. Entre estas citocinas está o TNF- α , cujo aumento da produção durante o desmame pode diminuir a expressão de proteínas que garantem a integridade da barreira intestinal aumentando, conseqüentemente, a permeabilidade intestinal e a incidência de diarreia (Al-Sadi et al., 2009).

Enfim, a maior inibição de TNF- α apresentada por T2, sugere que a β -glucano de *S.cerevisiae* apresenta maior potencial imunomodulador em menores doses (0,035%) quando comparado às fontes *P.ostreatus* em sua forma bruta, ao resíduo da produção deste cogumelo (SMS) e ao próprio β -glucano de *S.cerevisiae* em maiores doses (0,07%). Entretanto, além de ter influenciado negativamente na conversão alimentar a

curto prazo, essa maior imunomodulação parece não ter sido capaz de evitar o aumento de permeabilidade intestinal e, conseqüentemente a incidência de diarreia ocasionada pelo aumento de citocinas inflamatórias durante o stress pós-desmame, sendo sugerido que mais estudos sejam feitos para avaliação dos efeitos a longo prazo da inclusão destes β -glucanos.

5 CONCLUSÃO

Entre as diferentes fontes, apenas o β -glucano de *S. cerevisiae* do produto Macrogard® em sua menor dose apresentou ação imunomoduladora significativamente maior quando comparado a animais não tratados o que implicou, porém, em uma pior conversão de alimentar a curto prazo. Já o β -glucano do substrato pós-cultivo de *P. ostreatus* (SMS), apesar de não ter incrementado o ganho de peso, estimulou um consumo maior durante todo o experimento, mostrando-se uma alternativa para indução do consumo de ração por leitões nas primeiras semanas críticas de desmame.

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Abul; Lichtman, Andrew; Pillai, S., A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai. 2012. *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2*. Elsevier Ed. Ltda. 631–667.
- Baert, K., E. Sonck, B. M. Goddeeris, B. Devriendt, and E. Cox. 2015. Cell type-specific differences in β -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Dev. Comp. Immunol.* 48:192–203. doi:10.1016/j.dci.2014.10.005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.005>
- Chen, D., Y. Luo, X. Wu, B. Yu, P. Zheng, J. He, J. Yu, and X. Mao. 2018. Effect of different dietary non-starch fiber fractions on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal development in weaned pigs. *Nutrition.* 51–52:20–28. doi:10.1016/j.nut.2018.01.011. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.01.011>
- Freire, J. P. B., A. J. G. Guerreiro, L. F. Cunha, and A. Aumaitre. 2000. Effect of dietary fibre source on total tract digestibility, caecum volatile fatty acids and digestive transit time in the weaned piglet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87:71–83. doi:10.1016/S0377-8401(00)00183-8.
- Hunter, K. W., R. A. Gault, and M. D. Berner. 2002. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:267–271. doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01201.x.
- Jiang, Z., S. Wei, Z. Wang, C. Zhu, S. Hu, C. Zheng, Z. Chen, Y. Hu, L. Wang, X. Ma, and X. Yang. 2015. Effects of different forms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early-weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:1–8. doi:10.1186/s40104-015-0046-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40104-015-0046-8>
- Jin, S. K., R. Chowdappa, S. D. Lee, H. Y. Kim, I. S. Kim, and Y. M. Song. 2007. Effects of fermented oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) by-product supplementation on growth performance, blood parameters and meat quality in finishing Berkshire pigs. *Animal.* 1:301. doi:10.1017/s1751731107683785.
- Kim, K., A. Ehrlich, V. Perng, J. A. Chase, H. Raybould, X. Li, E. R. Atwill, R. Whelan, A. Sokale, and Y. Liu. 2019. Algae-derived β -glucan enhanced gut health and immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *E. coli*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 248:114–125. doi:10.1016/j.anifeedsci.2018.12.004. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.12.004>
- Li, J., D. F. Li, J. J. Xing, Z. B. Cheng, and C. H. Lai. 2006. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 84:2374–2381. doi:10.2527/jas.2004-541.

- Mayorga, E. J., M. V. Sanz-Fernandez, M. Abuajamieh, L. H. Baumgard, E. A. Horst, and S. K. Kvidera. 2017. Estimating glucose requirements of an activated immune system in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 95:5020–5029. doi:10.2527/jas2017.1830.
- Murphy, P., F. Dal Bello, J. O'Doherty, E. K. Arendt, T. Sweeney, and A. Coffey. 2013. Analysis of bacterial community shifts in the gastrointestinal tract of pigs fed diets supplemented with β -glucan from *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Animal*. 7:1079–1087. doi:10.1017/S1751731113000165.
- Price, K. L., H. R. Totty, H. B. Lee, M. D. Utt, G. E. Fitzner, I. Yoon, M. A. Ponder, and J. Escobar. 2010. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. *J. Anim. Sci.* 88:3896–3908. doi:10.2527/jas.2009-2728.
- de Assis, S. D., de Luna, U. V., Junior, J. G. C., Correa, G. S. S., Correa, A.B. E. 2014. Desempenho E Características Morfo- Intestinais De Leitoas Mananoligossacarídeo. *Arch. Vet. Sci.* 33–41.
- Sonck, E., E. Stuyven, B. Goddeeris, and E. Cox. 2010. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135:199–207. doi:10.1016/j.vetimm.2009.11.014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.11.014>
- Vetvicka, V. 2016. Comparison of Immunological Effects of Commercially Available β -Glucans: Part III. *Int. Clin. Pathol. J.* 2. doi:10.15406/icpjl.2016.02.00046.
- Vetvicka, V., and C. Oliveira. 2014. beta(1-3)(1-6)-D-glucans modulate immune status in pigs: potential importance for efficiency of commercial farming. *Ann. Transl. Med.* 2:16. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.01.04. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=pem&NEWS=N&AN=25332992>
- Vetvicka, V., L. Vannucci, and P. Sima. 2014. The Effects of β -Glucan on Pig Growth and Immunity. *Open Biochem. J.* 1:89–93. doi:10.2174/1874091X01408010089.
- Vetvicka, V., and J. Vetvickova. 2007. An Evaluation of the Immunological Activities of Commercially Available Beta1,3-Glucans. *Jana.* 10:25–31.
- Vetvicka, V., and J. Vetvickova. 2014. Comparison of immunological effects of commercially available β -glucans. *Appl. Sci. Reports.* 1:2. doi:10.7243/2054-9903-1-2.
- Zhou, T. X., J. H. Jung, Z. F. Zhang, and I. H. Kim. 2013. Effect of dietary β -glucan on growth performance, fecal microbial shedding and immunological responses after lipopolysaccharide challenge in weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179:85–92. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.10.008. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.10.008>

